

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ
ДЕПАРТАМЕНТ НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПОЛИТИКИ И
ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБОУ ВО КОСТРОМСКАЯ ГСХА

Кафедра эпизоотологии,
паразитологии и микробиологии

ИММУНОЛОГИЯ

ПРАКТИКУМ
ДЛЯ СТУДЕНТОВ СПЕЦИАЛЬНОСТИ 36.05.01 «ВЕТЕРИНАРИЯ»
ОЧНОЙ, ОЧНО-ЗАОЧНОЙ И ЗАОЧНОЙ ФОРМ ОБУЧЕНИЯ

КАРАБАЕВО
КГСХА
2015

УДК 57.083.3:619
ББК 48.47
И 53

Составители: сотрудники кафедры эпизоотологии паразитологии и микробиологии Костромской ГСХА к.вет.н., доцент, декан факультета ветеринарной медицины и зоотехнии *Н.Ю. Парамонова*, к.с.-х.н., доцент *С.В. Фириченкова*.

Рецензент: к.вет.н., доцент кафедры анатомии и физиологии животных Костромской ГСХА *М.Ю. Якубовская*

Рекомендовано к изданию методической комиссией факультета ветеринарной медицины и зоотехнии, протокол №7-от 3 июля 2015 г

В 39 **Иммунология:** практикум для студентов специальности 36.05.01 «Ветеринария» очной, очно-заочной и заочной форм обучения / сост. Н.Ю. Парамонова, С.В. Фириченкова. — КАРАВАЕВО : КГСХА, 2015. — 84 с.

В издании содержатся методические указания по выполнению лабораторных работ, самостоятельному изучению дисциплины в целом и отдельных разделов, приведены вопросы для самопроверки знаний, задания для приобретения практических навыков.

Учебное пособие предназначено для студентов 3 курса специальности 36.05.01 «Ветеринария» очной, очно-заочной и заочной форм обучения.

УДК 57.083.619
ББК 48.47

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ОБЩИЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ИЗУЧЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ	7
2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ИЗУЧЕНИЮ РАЗДЕЛОВ ДИСЦИПЛИНЫ И ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ	9
2.1. ПРЕДМЕТ И ЗАДАЧИ ИММУНОЛОГИИ, ИММУНОЛОГИЯ КАК НАУКА.....	9
Самостоятельная работа 1. Подготовка реферата на тему: «Роль отечественных учёных в развитии иммунологии». Составление презентаций «Нобелевские лауреаты в области иммунологии»	
2.2. ПОНЯТИЕ ОБ ИММУННОЙ СИСТЕМЕ.....	10
Лабораторная работа №1. Правила работы с экспериментальными животными. Прижизненное взятие крови у мышей, морских свинок, кроликов.	
2.3. МЕХАНИЗМЫ ИММУНИТЕТА. АНТИГЕНЫ И ИММУНОГЛОБУЛИНЫ.....	16
Лабораторная работа № 2. Иммуноглобулины (Ig). Структура и функции антител. Гибридомы. Моноклональные антитела.	
Самостоятельная работа 2. Изготовление макетов «Классы иммуноглобулинов», «Виды иммунитетов»	223
2.4. РЕГУЛЯТОРНЫЕ КЛЕТКИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ИХ ПОВЕРХНОСТНЫЕ СТРУКТУРЫ (РЕЦЕПТОРЫ, МАРКЕРЫ И ДР).....	25
Лабораторная работа № 3. Гуморальные факторы естественной резистентности (лизоцим, комплемент, бактерицидная активность, цитокины, белки острой фазы и др.)	25
Самостоятельная работа 3. Изготовление макетов «Клетки иммунной системы».....	28
2.5. ГОРМОНЫ И МЕДИАТОРЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ	29
Лабораторная работа № 4. Выделение лимфоидных органов и клеток у мыши	29
Самостоятельная работа 4. Составление презентаций «Основные цитокины, принимающие участие в иммунном ответе».....	31
2.6. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ИММУННОГО ОТВЕТА. АПОПТОЗ. ГЛАВНЫЙ КОМПЛЕКС ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ.....	32
Лабораторная работа № 5. Приготовление клеточных суспензий определённой концентрации и жизнеспособности.	32
Самостоятельная работа 5 Составление презентаций «Классификация антигенов главного комплекса гистосовместимости».....	34
2.7 ИММУННЫЙ ОТВЕТ. АФФЕРЕНТНАЯ, ЦЕНТРАЛЬНАЯ, ЭФФЕКТОРНАЯ ФАЗЫ ИММУНИТЕТА	35

Лабораторная работа № 6. Цитотоксическая активность лимфоцитов. Методы тестирования цитотоксической активности Т-киллеров и естественных клеток-киллеров.	35
Самостоятельная работа 6. Решение диагностических задач (индивидуальное домашнее задание).....	40
2.8. ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ	43
Самостоятельная работа 7. Подготовка рефератов на тему: «Искусственная толерантность. Практическое значение толерантности»	43
2.9. ТЕОРИИ ИММУНИТЕТА.....	44
Лабораторная работа № 7. Антисыворотки, способы получения, выделение иммуноглобулиновой фракции из сыворотки крови животных.....	44
2.10. ФИЛОГЕНЕЗ И ОНТОГЕНЕЗ СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА	49
Самостоятельная работа 8. Составление презентаций «Защитные силы животных и их функции на разных филогенетических уровнях»	49
2.11. МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ В ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ПРИКЛАДНОЙ ИММУНОЛОГИИ	50
Лабораторная работа № 8. Модельные системы в иммунологии. Различные способы введения антигенов животным.	50
Самостоятельная работа 9. Подготовка к тестированию	56
Фонд тестовых заданий	56
СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	83

Введение

Основная цель освоения дисциплины «Иммунология» – дать студентам современные знания о фундаментальной иммунологии, привить практические навыки по использованию достижений иммунологии в клинической практике и исследовательской работе.

Дисциплина «Иммунология» относится к базовой части общепрофессионального ветеринарно-биологического цикла.

В результате освоения дисциплины студент должен формировать следующие компетенции:

стремление к установлению международных контактов для повышения профессионального уровня и обмена опытом (ОК-10);

способность и готовность анализировать закономерности функционирования органов и систем организма, использовать знания морфо-физиологических основ, основные методики клинико-иммунологического исследования (ПК-5).

В результате изучения дисциплины «Иммунология» студент должен знать:

- современные представления об иммунологии и органно-тканевой структуре системы иммунитета животных и птиц;
- иммунокомпетентные клетки и их рецепторы;
- механизмы регулирования иммунных процессов на организменном и клеточном уровнях на основе международной классификации;
- антигены и антитела, их взаимодействие;
- главный комплекс гистосовместимости и его биологическую значимость;
- генетическое разнообразие и особенности формирования антиген распознающих рецепторов Т- и В-лимфоцитов;
- методические основы оценки иммунного статуса;
- о иммунозависимых патологических состояниях.

Студент должен уметь:

- на организменном, клеточном и молекулярном уровнях, с использованием современного лабораторного оборудования, моделировать нормальные и патологические процессы;
- оценивать иммунный статус животных и формулировать интерпретации иммунных нарушений на основе международной классификации.

Студент должен владеть:

- основными методами экспериментальной иммунологии на основе международных стандартов;
- моделировать иммунные реакции на организменном и клеточном уровне;
- методами диагностики иммунопатологий и прогнозирования развития иммунозависимых заболеваний.

1. ОБЩИЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ИЗУЧЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ

Структура и содержание дисциплины (модуля) «Иммунология».

Общая трудоемкость дисциплины составляет две зачётные единицы, 72 часа.

Таблица 1 Разделы учебной дисциплины (модуля), виды учебной деятельности и формы контроля

№ п/п	Наименование раздела (темы) учебной дисциплины (модуля)	Всего часов на раздел дисциплины	Формы текущего контроля успеваемости
1	Предмет и задачи иммунологии, иммунология как наука.	4	Опрос, реферат
2	Понятие об иммунной системе.	8	Опрос
3	Механизмы иммунитета. Антигены и иммуноглобулины.	10	Опрос
4	Регуляторные клетки иммунной системы и их поверхностные структуры (рецепторы, маркеры и др.).	7	Опрос
5	Гормоны и медиаторы иммунной системы.	9	Опрос Коллоквиум
6	Генетический контроль иммунного ответа. Апоптоз. Главный комплекс гистосовместимости.	8	Опрос
7	Иммунный ответ. Афферентная, центральная, эффекторная фазы иммунитета.	6	Решение диагностических задач (индивидуальные домашние задания)
8	Иммунологическая толерантность.	6	Реферат
9	Теории иммунитета.	5	Опрос

10	Фило- и онтогенез системы иммунитета.	4	Тестирование
11	Модельные системы в фундаментальной и прикладной иммунологии.	5	Тестирование
	ИТОГО:	72	

Предмет необходимо изучать по темам (разделам), завершая его выполнением заданий – написанием рефератов (эссе), составлением таблиц по предлагаемым образцам, решением тестов, диагностических задач или представлением ответов на вопросы для самоподготовки. Контрольные задания по самостоятельной работе необходимо иметь на занятиях. Они помогут определить, насколько полно и правильно усвоен материал, и будет служить вспомогательным пособием при подготовке к коллоквиумам, зачёту, итоговым испытаниям. **Запомнить специальную терминологию обязательно.**

Лекционный курс знакомит студентов с основными положениями дисциплины, новыми достижениями иммунологической науки и передового опыта.

Лабораторные занятия помогут студентам овладеть основными методами экспериментальной иммунологии на основе международных стандартов, моделировать иммунные реакции на организменном и клеточном уровне, освоить диагностику иммунопатологий и прогнозирования развития иммунозависимых заболеваний. Подготовка к предстоящему лабораторному или индивидуальному занятию, использование различных методов контроля полученной информации способствует более эффективному усвоению учебного материала.

В процессе самостоятельной подготовки по всем разделам необходимо прорабатывать материал *фонда тестовых заданий*, представленный в конце данного пособия.

Студенты, полностью выполнившие рабочий план дисциплины «Иммунология», включая защиту лабораторных и собеседование по индивидуальным заданиям, и набравшие по всему курсу не менее 50 баллов считаются успешно освоившими курс.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ИЗУЧЕНИЮ РАЗДЕЛОВ ДИСЦИПЛИНЫ И ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1. Предмет и задачи иммунологии, иммунология как наука.

Самостоятельная работа 1. Подготовка реферата на тему: «Роль отечественных учёных в развитии иммунологии». Составление презентаций «Нобелевские лауреаты в области иммунологии».

Методические указания при подготовке реферата и презентаций. В реферате необходимо раскрыть следующие вопросы: роль и творческий вклад соотечественников – И.И. Мечников, Н.Ф. Гамалея, Л.А. Зильбер, Р.В. Петров, В.Л. Троицкий, В.М. Чумаков, В.М. Жданов, В.В. Анджапаридзе, П.Н. Косяков, П.Ф. Здродовский, В.И. Иоффе и др., в развитии иммунологии и аллергологии. Необходимо показать: владение культурой мышления, способностью к обобщению, анализу, восприятию информации, постановке цели и выбору путей её достижения; осознание сущности и значения информации в развитии современного общества; владение основными методами, способами и средствами получения, хранения, переработки информации; способность и готовность осуществлять сбор научной информации, составление рефератов, анализировать отечественный и зарубежный опыт по тематике.

При составлении презентаций «Нобелевские лауреаты в области иммунологии», кратко изложите выдающиеся открытия в области иммунологии, используя при подготовке материал международных электронных источников и сайт Нобелевского комитета [Medicine Prize Nobelprize.org](http://MedicinePrize.Nobelprize.org), Official web site of the Nobel Prize (nobelprize.org)

Вопросы для самоподготовки

1. Предмет и задачи современной иммунологии.
2. Определение понятия «иммунитет».
3. История развития иммунологии. Исследования Э. Дженнера. Луи Пастер – основоположник иммунологии.
4. Возникновение инфекционной иммунологии (И.И. Мечников, П. Эрлих, Ж. Борде, К. Ландштейнер). Открытие иммунологической толерантности (П. Медавар, Я. Гашек). Открытие системы антигенов гистосовместимости человека (Ж. Доссе). Работы М. Бернета.

5. Развитие отечественной иммунологии (И.И. Мечников, Н.Ф. Гамалея, Л.А. Зильбер, Р.В. Петров, В.Л. Троицкий, В.М. Чумаков, В.М. Жданов, В.В. Анджаридзе, П.Н. Косяков, П.Ф. Здродовский, В.И. Иоффе и др.).

6. Исторические этапы развития аллергологии. Вклад отечественных учёных в развитие аллергологии (И.И. Мечников, Г.П. Сахаров, А.А. Сиротинин, А.А. Богомолец, А.Д. Адо).

7. Лауреаты Нобелевской премии по физиологии и медицине, удостоенные награды за открытия в области иммунологии.

8. Основополагающие открытия, не удостоенные Нобелевской премии.

2.2. Понятие об иммунной системе.

Лабораторная работа №1. Правила работы с экспериментальными животными. Прижизненное взятие крови у мышей, морских свинок, кроликов.

Цель занятия. Познакомится с правилами работы с лабораторными животными в соответствии с отечественными нормативами и современными международными биоэтическими стандартами. Получить навыки приготовления цитратной крови, взвеси эритроцитов, плазмы, сыворотки.

Задание для выполнения лабораторной работы.

1. Изучить санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).
2. Взять кровь из вены уха кролика, с целью выполнения последующих заданий.
3. Приготовить цитратную кровь.
4. Приготовить из крови кролика 5% взвесь эритроцитов.
5. Приготовить из крови кролика сыворотку.
6. Приготовить плазму крови.

Материалы и оборудование. Кролики, ножницы, спиртовые (70%) ватные тампоны, стерильная вата, ксилол, жидкий парафин, одноразовые шприцы, перекись водорода, стерильная колба со стеклянными бусами, стерильные пробирки с ватно-марлевыми пробками, пробирки с 5% раствором цитрата натрия, колбы, трехслойный марлевый фильтр, центрифужные пробирки, центрифуга на 2000...3000 об/мин, пастеровские пипетки, изотонический раствор хлорида натрия, свернувшаяся кровь в

пробирках, стеклянные стерильные палочки или металлические спицы, отстоянная цитратная кровь для получения плазмы.

Методические указания.

Правила работы с экспериментальными животными.

1. Опыты, в которых используются живые позвоночные и ткани живых организмов для проведения исследований, должны выполняться под контролем квалифицированных учёных-биологов, физиологов или медиков (ветеринарных врачей).

2. Размещение, уход и кормление всех экспериментальных животных должны находиться под контролем квалифицированного ветеринарного врача или другого учёного, компетентного в данных вопросах.

3. Исследование по своему характеру должно дать полезные результаты на благо общества и не должно быть случайным и бесполезным.

4. Эксперимент должен опираться на знание исследуемой болезни или проблемы и планироваться так, чтобы ожидаемые результаты оправдывали его проведение.

5. Статистический анализ, математические модели или биологические системы *in vitro* должны использоваться, если они соответственно дополняют результаты опытов на животных и позволяют сократить число используемых животных.

6. Опыты должны проводиться так, чтобы не подвергать животное ненужным страданиям и не наносить ему вреда.

7. Учёный, отвечающий за опыт, должен быть готов прекратить его, если он/она считает, что продолжение опыта может вызвать ненужное увечье или страдание животных.

8. Если сам опыт вызывает больше дискомфорта у животного, чем наркоз, то необходимо довести животное (путём применения наркоза) до состояния, когда оно не воспринимает боль, и поддерживать это состояние до тех пор, пока опыт или процедура не будут завершены. Исключение составляют только те случаи, когда наркоз может повредить цели опыта, а данные нельзя получить никаким иным способом, кроме как проведением подобных опытов. Такие процедуры должны тщательно контролироваться руководством или другим квалифицированным старшим сотрудником.

9. Постэкспериментальный уход за животным должен свести до минимума дискомфорт и последствия травмы, нанесенной жи-

вотным в результате опыта, в соответствии с принятой практикой ветеринарной медицины.

10. Если необходимо умертвить экспериментальное животное, то это делают так, чтобы достичь мгновенной гибели. Ни одно животное не должно быть уничтожено до тех пор, пока не наступит его смерть.

11. Ответственность за нарушение Правил проведения работ с использованием животных несут руководители учреждений, где проводятся эксперименты, и лица, специально выделенные для проведения этой работы.

12. Нарушение правил гуманного обращения с животными и проведение экспериментов в условиях, ставящих под сомнение научную достоверность полученных данных, может повлечь за собой, в установленном порядке, применение к виновным лицам мер дисциплинарного воздействия, а также запрещение научных публикаций, защиты диссертационных работ и запрещение дальнейшего использования экспериментальных животных в научных и учебных целях.

13. При любых манипуляциях необходимо соблюдать отечественные нормативы и современные международные биоэтические стандарты по работе с лабораторными животными.

Прижизненное взятие крови у мышей, морских свинок, кроликов. Небольшое количество крови получают у кроликов и морских свинок из вен уха, у мышей и крыс – из вен хвоста, а большие количества – из сердца. В особых случаях прибегают к полному, или тотальному, обескровливанию, после которого животное погибает.

Взятие крови из вены уха кролика. Для получения крови из краевой вены нужно, прежде всего, вызвать гиперемия уха, протирая его ладонями рук и слегка ударя кончиками пальцев. Затем вдоль наружного края уха удаляют пушок и протирают ватой, увлажнённой 70% спиртом. Если в результате всех перечисленных процедур сосуды не инъецируются, ухо смазывают ксилолом или толуолом. После того как сосуды набухнут и чётко обозначатся на поверхности ушной раковины, наружную поверхность её покрывают тонким слоем жидкого парафина (во избежание быстрого свертывания крови) и делают прокол вены.

Для получения небольшого количества крови (менее 1 мл) прокалывают одну из небольших периферических ветвей, а для

получения больших объемов крови (5...10 мл) вскрывают краевую вену уха. С этой целью иглу шприца вводят в вену почти параллельно поверхности уха, чтобы не повредить противоположную стенку вены. При проколе вены иглой шприца кровь, как правило, выходит отдельными каплями с большими интервалами, и кровотечение прекращается быстро. Для того, чтобы вызвать обильное кровотечение, нужно сделать ранку с рваными краями. С этой целью пользуются обломком тонкого капилляра пастеровской пипетки. При таком способе прокола из уха кролика получают до 30 мл крови. После взятия крови к проколу вены прикладывают на 2...3 минуты кусочек сухой стерильной ваты, не нажимая сильно на стенку сосуда, так как при этом кровотечение может усилиться. Если кровотечение долго не прекращается, хорошие результаты даёт нанесение на ранку нескольких капель перекиси водорода.

Взятие крови из вен у морских свинок, крыс и мышей. У морских свинок кровь в количестве 0,3...0,5 мл получают после нанесения насечек на край уха или прокола мягких подушек лапы. У белых крыс и мышей для получения 1...3 капель крови приходится прибегать к ампутации кончика хвоста после продолжительного прогревания его в воде температурой 45...50 °С или протирания ксилолом. Взяв кровь, рану прижигают перекисью водорода.

Для пункции сердца животных фиксируют к доске брюшком вверх. Шерсть в области груди тщательно выстригают, кожу обрабатывают спиртовым раствором йода и после этого приступают к проколу, который в зависимости от вида животного имеет некоторые различия.

Пункция сердца кроликов. Определяют II пальцем, обработанным спиртом и смазанным спиртовым раствором йода, сердечный толчок, т. е. точку наиболее сильно выраженной пульсации сердца. Обычно она прощупывается в третьем межреберье. Прокол грудной клетки делают в области сердечного толчка на расстоянии 2...4 мм от левого края грудины; иглу ведут в направлении к средней линии на глубину 2...2,5 см. При попадании иглы в полость сердца рука, в которой находится шприц, начинает ощущать ритмичные толчки, связанные с пульсацией сердца и приподнимающие иглу. Поршень шприца легко выдвигается.

гается наружу и в цилиндре его тотчас появляется кровь. Взятие крови должно производиться по возможности быстрее во избежание её свёртывания. По этой же причине шприц и иглу рекомендуется промывать перед опытом стерильным раствором цитрата или оксалата натрия. Взяв необходимое количество крови, быстрым движением, без рывка, вынимают иглу и на месте укола накладывают ватный тампон, пропитанный спиртовым раствором йода. Животному подкожно вводят подогретый до температуры тела стерильный изотонический раствор хлорида натрия или глюкозу в количестве, равном двойному объёму взятой крови. Пункцией сердца можно получить у кролика 25...30 мл крови.

Пункция сердца у морских свинок. Кончиками III–IV пальцев левой руки нащупывают сердечный толчок, в направлении которого вертикально на глубину 1,5...2 см вкалывают иглу, отступя на 1...2 мм от левого края грудины. У морских свинок можно получить таким образом 10...12 мл крови.

Пункция сердца у крыс. Как и в предыдущих случаях, пальпаторно определяют место сердечного толчка. На 1 см выше от установленной точки и на 1...2 мм левее от края грудины делают прокол на глубину 1,5...2 см, держа иглу вертикально. Одновременно у крыс можно получить 6...8 мл крови.

Получение дефибринированной крови. Кровь животного сливают в стерильную колбу со стеклянными бусами и непрерывно в течение 10...15 мин встряхивают. В результате встряхивания находящийся в крови фибрин выпадает в осадок, обволакивая бусы, а дефибринированная кровь, слитая в другую колбу или пробирку, утрачивает способность свёртываться.

Приготовление взвеси эритроцитов. Для освобождения от плёнок фибрина дефибринированную кровь фильтруют через трехслойный марлевый фильтр. Фильтрат наливают в центрифужные пробирки и центрифугируют при 2000...3000 об/мин в течение 10...15 минут. Эритроциты оседают на дно пробирки, а прозрачная, слегка желтоватого цвета плазма образует надосадочный слой. После центрифугирования уровень жидкости в пробирке отмечают карандашом, отсасывают плазму пастеровской пипеткой, эритроциты промывают, доливая до метки стерильный изотонический раствор хлорида натрия, и вновь центрифугируют. Промывание эритроцитов с добавлением свежего

раствора производят 2-3 раза, чтобы последняя порция промывной жидкости была бесцветна.

Из промытых эритроцитов готовят 3% или 5% взвесь, прибавляя к 3...5 мл эритроцитов соответственно 97...95 мл изотонического раствора хлорида натрия.

Взвесь эритроцитов можно хранить в холодильнике при температуре 3...4 °С в течение 5...6 дней.

Приготовление сыворотки крови. Кровь, собранную в стерильную пробирку, закрывают ватно-марлевой пробкой, ставят на 20...30 мин в термостат или водяную баню, отрегулированную на 37 °С, так как в тепле кровь свёртывается быстрее и лучше. Во время свёртывания сгусток крови обычно прилипает к стенкам пробирки. Поэтому после взятия пробирок из термостата сгусток отделяют от стенок пробирки круговым движением капилляра стерильной пастеровской пипетки или стеклянной стерильной палочкой (металлической спицей).

После отделения сгустка сыворотку ставят в холодильник при температуре 3...4 °С. В течение 3...4 часов сыворотка обычно отделяется полностью, и её можно отсосать стерильной пастеровской пипеткой. Для того чтобы во время отсасывания содержимое пробирки было хорошо видно, пастеровскую пипетку соединяют со стеклянной трубкой — «мундштуком» (резиновая трубка длиной 20...25 см). При отсасывании кончик пипетки не должен соприкасаться со сгустком крови, чтобы в сыворотку не попали эритроциты.

Окрашенную в розовый цвет сыворотку центрифугируют при 2000...3000 об/мин в течение 10...15 мин для осаждения форменных элементов крови.

Приготовление цитратной крови. Полученную из сердца или вены кровь сливают в пробирку с 5% раствором цитрата натрия (10 мл крови, 1 мл цитрата натрия). Цитратная кровь не свёртывается.

Приготовление плазмы крови. Цитратную кровь ставят на 18...20 ч в холодильник или подвергают центрифугированию. В результате над осадком эритроцитов образуется прозрачный слой жидкости желтоватого цвета — плазмы.

Вопросы для самоподготовки

1. Иммунная система как совокупность органов, тканей и клеток, осуществляющих иммунологические функции. Центральные и периферические органы иммунной системы.
2. Костный мозг как источник клеток иммунной системы.
3. Тимус – строение, роль в развитии и селекции Т-лимфоцитов, секреторная функция, структура и биологическая роль гормонов тимуса; проблема внетимусного развития Т-лимфоцитов.
4. Лимфатические узлы и селезенка – строение, Т- и В-клеточные зоны.
5. Лимфоидные структуры кожи и слизистых оболочек – структурированная и диффузная лимфоидная ткань, специфика распределения Т- и В-лимфоцитов, дендритных клеток.
6. Роль печени в иммунитете. Микроокружение лимфоцитов – дифференциация стромальных клеток в различных лимфоидных структурах.
7. Лимфоцит – центральная фигура в иммунной системе. Современные представления о развитии лимфоцитов.
8. Представление о стволовой (родоначальной) кроветворной клетке. Происхождение стволовой клетки, её характеристики. Циркуляция стволовой клетки.
9. Модели изучения циркуляции стволовых клеток и лимфоидных клеток (организмы парабионты, лучевые химеры и др.). Миграция стволовых клеток в лимфоидные органы. Колониеобразующая способность стволовых клеток, метод селезеночных колоний и их значение в иммунологии.
10. Понятие о предшественниках Т- и В-лимфоцитов, их характеристика, идентификация. Тимусзависимый путь развития лимфоцитов (Т-клетки).
11. Фолликулы Кларка, тельца Гассалья.

2.3. Механизмы иммунитета. Антигены и иммуноглобулины.

Лабораторная работа № 2. Иммуноглобулины (Ig). Структура и функции антител. Гибридомы. Моноклональные антитела.

Цель занятия. Познакомиться с методиками определения содержания Ig различных классов в сыворотке крови и других биологических жидкостях (конкретно, в сыворотке молозива). Изучить основные принципы получения моноклональных антител. Получить навыки количественного определения иммуноглобулинов в сыворотке молозива коровы.

Задание для выполнения лабораторной работы.

1. Изучить принципы и методики определения Ig в реакции радиальной иммунодиффузии (РРИД) по Манчини.

2. Познакомиться с основными принципами получения моноклональных антител. Составьте схему получения гибридом, пригодных для получения моноклональных антител.
3. Определить уровень Ig в сыворотке молозива и сделать заключение об иммунобиологическом статусе маточного поголовья.

Материалы и оборудование. Центрифуга, термостат, ФЭК, центрифужные пробирки (3 на рабочее место), сыворотка молозива – первого, второго и третьего дня удоя (замороженная), 0,0208%-ный раствор сульфата цинка, дистиллированная вода, фильтровальная бумага, 18%-ный раствор гидроксида натрия, 10%-ный раствор сульфата меди.

Методические указания.

Для количественного определения Ig широкое применение нашли различные варианты постановки реакции преципитации в геле и в жидкой среде, а также метод ИФА.

Определение Ig в реакции радиальной иммунодиффузии (РРИД) по Манчини. Метод основан на феномене преципитации, когда взаимодействие антигенов с антителами в геле сопровождается образованием видимого осадка – преципитата. При постановке реакции используются моноспецифические сыворотки против Ig – G, M и A. Контрольная сыворотка представляет собой смесь сывороток крови с известным содержанием Ig. В условиях опыта исследуемые сыворотки вносят в лунки, вырезанные в слое агара, в котором предварительно диспергированы моноспецифические сыворотки. Размер образующегося кольца преципитации вокруг лунки прямо пропорционален концентрации исследуемого Ig, содержание которого определяют относительно контрольной сыворотки.

Для постановки реакции на поверхности стеклянной пластины готовят слой 3% агара на веронал-мединаловом буфере в смеси с монорецепторной сывороткой в двойном титре. В толще агара пробойником вырезают лунки диаметром 2 мм на расстоянии 15 мм одна от другой. На пластине делают несколько рядов лунок. В лунки первого ряда с помощью микродозатора вносят по 0,2 мл стандартной сыворотки неразведённой и в разведениях 1:2, 1:4, 1:8. Лунки следующих рядов заполняются исследуемыми сыворотками. Пластины выдерживают во влажной камере в течение 24 часов для определения IgG и IgA, и 48 часов для определения

IgM при комнатной температуре. Для учёта результатов измеряют диаметр образовавшихся колец преципитации с помощью линейки Behringwerke. Уровень Ig определяют по калибровочному графику, выражающему зависимость между уровнем Ig и диаметром преципитации.

Моноклональные антитела, "моноклоны" (МАТ) – выделенные и очищенные, либо синтезированные искусственно, высокоспециализированные фракции антител, взаимодействующие со строго определёнными биологическими структурами. В исследуемом (обычно под микроскопом) биологическом материале моноклоны выделяют, маркируют объекты с определёнными свойствами. Нередко название выявляемого объекта заменяют унифицированным названием маркирующего его моноклона. Так, лимфоциты-хелперы обозначают как CD4 (или ОКТ4+), а лимфоциты-супрессоры – CD8 (ОКТ8+).

Основные принципы получения моноклональных антител. В основу метода положена способность нормальных плазматических клеток иммунного организма сохранять продукцию антител после слияния с перевиваемыми опухолевыми клетками. В результате образуется популяция гибридных клеток (гибридом), которой родительские селезеночные клетки передали способность вырабатывать специфические антитела, а родительские миеломные – способность к неограниченному росту и индукции асцитных и солидных опухолей.

В настоящее время предложено несколько модификаций метода получения гибридом, но все они сводятся в целом к проведению следующих этапов (рис.1):

- 1) иммунизация животных;
- 2) слияние иммунных лимфоцитов животных с миеломными клетками;
- 3) селекция гибридных клеток;
- 4) наращивание клонов и скрининг их на способность продуцировать специфические антитела;
- 5) клонирование гибридом и наращивание клонов гибридом в культуре и организме сингенных мышей;
- 6) изучение свойств полученных МАТ.

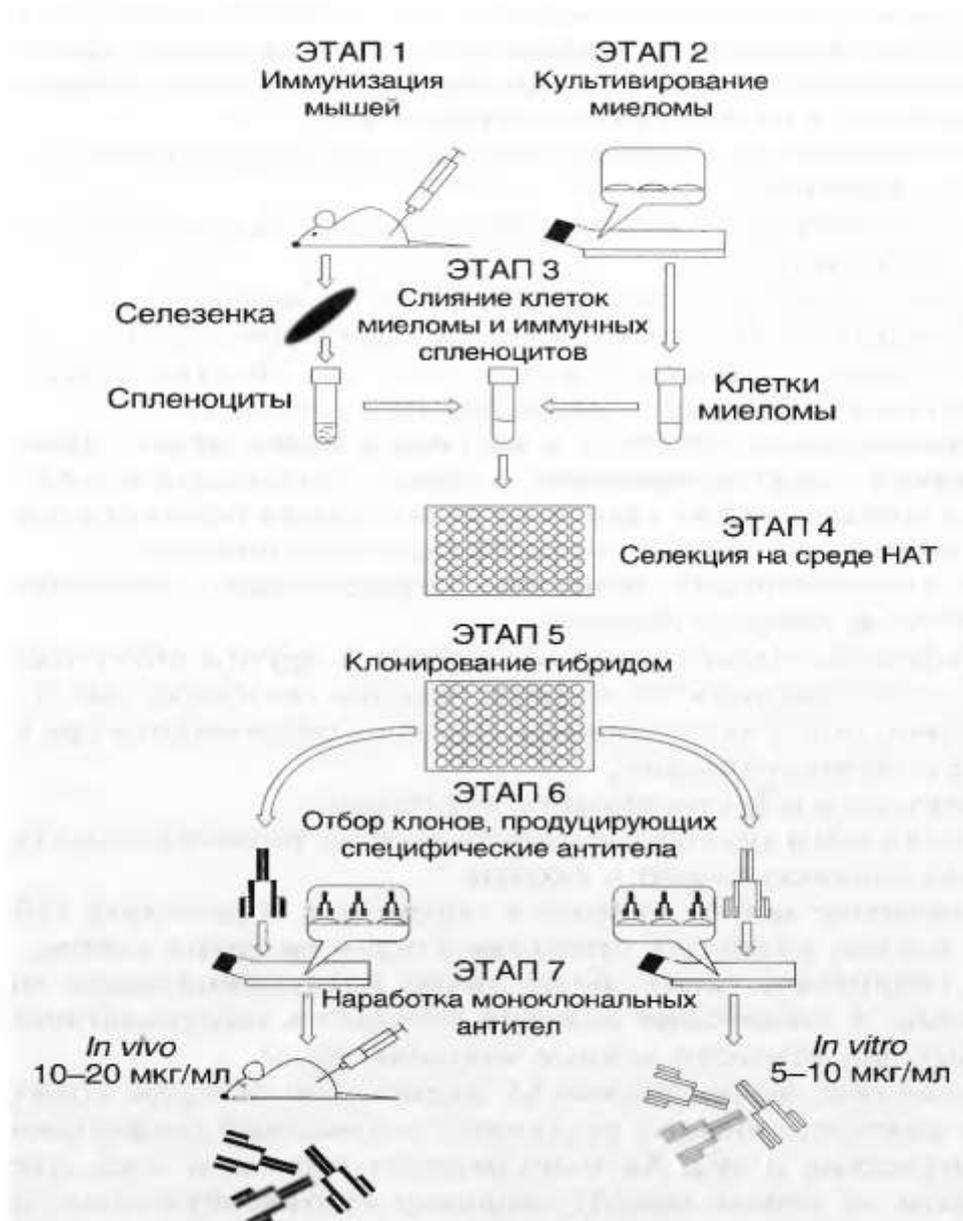


Рисунок 1. Схема получения гибридом

Методы иммунизации при получении гибридом. Иммунизацию при получении гибридом проводят с целью выработки у животного-донора спленоцитов увеличивающейся популяции В-лимфоцитов, продуцирующих антигенспецифичные иммуноглобулины. При этом В-лимфоциты, как один из партнёров для получения гибридом, должны быть способны к слиянию с плазматическими клетками и находиться в стадии неполной дифференцировки в зрелые плазматические клетки. Поэтому все процеду-

ры гибридизации предусматривают взятие лимфоцитов у иммунизированного животного в первые шесть дней после введения последней дозы антигена. Существует два основных способа иммунизации при получении гибридом: иммунизация *in vivo* и иммунизация *in vitro*. В качестве иммуногенов при получении гибридом к вирусным антигенам обычно используют лизаты заражённых клеток, нативные препараты очищенного вируса, высокоочищенный вирус (обработанный детергентами или ультрафиолетом), а также химически модифицированные вирусные белки и синтетические полипептиды. Особое значение придаётся иммунизации *in vitro* в целях получения гибридом на основе лимфоцитов человека, в силу императивного запрета на иммунизацию *in vivo*. Анализ данных по иммунизации спленоцитов *in vitro* показывает, что данный метод имеет ряд преимуществ по сравнению с иммунизацией мышей *in vivo*. Это, во-первых, сокращение сроков иммунизации до четырёх-пяти суток. Во-вторых, непосредственный контакт антигена с иммунокомпетентными клетками, минуя все барьеры живого организма, что имеет большое значение для слабых иммуногенов. В-третьих, метод даёт возможность контролировать эффективность иммунного ответа. Однако, несмотря на преимущества, иммунизация *in vitro* имеет ряд недостатков технического плана, которые сдерживают широкое внедрение этого метода в практику. В частности, нужна качественная культуральная среда и посуда, необходимо добавление в культуральную среду биологически активных иммунофакторов, а также необходима стерильность используемого антигена.

Методы гибридизации. Методы гибридизации иммунных спленоцитов с миеломными клетками бывают биологические (с помощью вирусов типа Сендай), химические (с помощью веществ типа лизолецитина или полиэтиленгликоля) и физические (с помощью электрического поля).

После гибридизации, через 7...14 дней, в лунках вырастают колонии гибридных клеток и возникает необходимость тестирования супернатантов на наличие специфических антител. В зависимости от целей, поставленных исследователями, тестирование может проводиться различными иммунологическими тестами, в том числе РТГА, НМФА, РСК, РДП. Наиболее широкое распространение получил иммуноферментный анализ (ИФА), обладаю-

щий нанограммовой чувствительностью, максимальной специфичностью и позволяющий обрабатывать сотни проб объёмом за рабочий день. Реже используется метод иммунофлюорометрического анализа и радиоиммунологического анализа.

Идентифицированные гибридомы клонируют. Следует подчеркнуть, что клонирование является тем этапом гибридомной технологии, который лимитирует пропускную способность всего метода. Поэтому очень важно тщательно провести скрининг, отобрать необходимые гибридомы и, во избежание перерастания антителопродуцирующих клеток клетками, потерявшими способность секретировать антитела, как можно скорее провести клонирование. Широко используется два методических подхода: клонирование методом предельных (лимитирующих) разведений и клонирование в полужидком агаре. Сформировавшуюся популяцию клеток после клонирования тестируют. При первом клонировании гибридом-продуцентов наблюдается расщепление клонов по способности продуцировать специфические антитела. Для получения достаточно стабильной линии гибридных клеток требуется 2-3 (иногда больше) клонирования.

Рост гибридом в организме экспериментальных животных (мышей) обеспечивает продукцию МАт на один-два порядка выше. Для культивирования гибридных клеток *in vivo* и для получения асцитической жидкости, содержащей МАт, мышам, предварительно праймированным пристаном (2, 6, 10, 14-тетраметилпентадекан) или неполным адьювантом Фрейнда, вводят внутрибрюшинно гибридные клетки в дозе $(2...4) \times 10^7$ на животное. Асциты формируются на 7...14 сутки после инокуляции клеток.

Полученные МАт подвергаются тщательному анализу с целью определения их свойств и дальнейшего практического использования. Таким образом, технология получения гибридом, секреторирующих моноклональные антитела, состоит из множества важных этапов, правильное и качественное выполнение которых обеспечивает успех работы и достижение поставленных целей.

Способ определения иммуноглобулинов в сыворотке молозива. Метод может использоваться для диагностики иммунологического статуса маточного поголовья. Способ количественного определения иммуноглобулинов в сыворотке молозива ос-

нован на осаждении иммуноглобулинов сульфатом цинка и определении экстинции надосадочной жидкости. Расчёт количества иммуноглобулинов проводят по калибровочному графику, построенному по результатам исследования аналогичным способом серии растворов стандартной сыворотки.

Ход работы.

1. В три центрифужные пробирки с 0,1 мл сыворотки молозива разного удоя (1-й, 2-й и 3-й день удоя) внести 6 мл 0,0208%-ного раствора сульфата цинка, перемешать.

2. Инкубировать в термостате 53 мин при 20 °С.

3. Содержимое пробирок центрифугировать 10 мин при 3000 об/мин.

4. Надосадочную жидкость слить, а к осадку прилить 10 мл дистиллированной воды, перемешать.

5. Центрифугировать 10 мин при 3000 об/мин.

6. Надосадочную жидкость слить, осадок высушить на фильтровальной бумаге.

7. К высушенному осадку последовательно добавить 8 мл дистиллированной воды, 1,5 мл 18%-ного раствора гидроксида натрия, 0,5 мл 10%-ного раствора сульфата меди.

8. Пробирки закрыть, встряхнуть до получения равномерной смеси, выдержать 60 мин при комнатной температуре для развития цветной реакции.

9. Содержимое пробирок центрифугировать 5 мин при 2000 об/мин для уплотнения осадка.

10. Спектрофотометрировать надосадочную жидкость при длине волны 540 нм в кюветах с длиной оптического пути 10 мм.

Оформление работы. Записать результаты в протоколе испытания. По приведённому калибровочному графику определить количество иммуноглобулинов в пробах (г/л).

Сделать заключение об иммунобиологическом статусе маточного поголовья. Пониженное содержание иммуноглобулинов в молозиве менее 30,2 г/л способствует высокой заболеваемости, а нередко и гибели новорожденных животных. По-видимому, это обусловлено слабой биологической защитой и качеством молозива, отражающим пониженный иммунологический статус матерей, а следовательно, и приплода.

Самостоятельная работа 2. Изготовление макетов «Классы иммуноглобулинов», «Виды иммунитетов».

Методические указания по изготовлению макетов. Макет «Классы иммуноглобулинов» должен отображать различные классы иммуноглобулинов, их структуру, строение молекулы иммуноглобулина. Укажите на макете тяжёлые H-цепи; лёгкие L-цепи; дисульфидные мостики; вариабельная V-область; константная C-область; некристаллизующийся Fab-фрагмент (I и II); кристаллизующийся Fc-фрагмент; участок молекулы, реагирующий с антигеном; участок связывания с комплементом; участок связывания с Fc-рецепторами макрофагов.

Макет «Виды иммунитетов» должен содержать суть противомикробной защиты в организме, которую осуществляют три системы – конституционная (факторы резистентности, передающиеся по наследству), макрофагальная и иммунная (лимфоидная), с помощью двух групп факторов — иммунных и неспецифических. Необходимо указать общепризнанную международную классификацию различных видов иммунитетов, отличие активной от пассивной специфической защиты.

Вопросы для самоподготовки

1. Определение иммунитета. Врождённый иммунитет. Особенности и различия врождённого и приобретённого (адаптивного) иммунитета.
2. Факторы, опосредующие иммунологические реакции разных форм иммунитета. Физические, гуморальные и клеточные факторы врождённого иммунитета.
3. Неспецифические факторы защиты (барьерные структуры кожи и слизистых, печень, острофазные белки, секреты и биологические жидкости организма, ферменты, лизоцим, пропердин, воспалительные реакции, микрофлора организма), их роль в сопротивляемости организма к инфекциям, принципиальное отличие от специфических иммунных факторов.
4. Фагоцитарная реакция, клетки её осуществляющие, их происхождение и дифференцировка.
5. Основные этапы и механизмы фагоцитоза.
6. Кислородозависимая и кислородонезависимая цитотоксичность.
7. Антифагоцитарные свойства микробов.
8. Система комплемента и её роль в защитных и регуляторных реакциях.
9. Классический и альтернативный пути активации комплемента.
10. Система естественной цитотоксичности (натуральные киллеры, интерфероны α , β , γ).
11. Иммунитет в онто- и филогенезе.
12. Антигены. Определение и характеристика вещества как антигена.
13. Химическая природа антигена.

14. Понятие чужеродности, антигенности, иммуногенности, специфичности антигена.
15. Характеристика молекул с антигенными свойствами (белки, полисахариды, липополисахариды и др.).
16. Полные и неполные антигены. Гаптены.
17. Структура макромолекулы антигена. Антигенные детерминанты (эпитопы) и их роль в формировании специфичности антигенов.
18. Тимусзависимые и тимуснезависимые антигены.
19. Многообразие антигенов. Аутоантигены.
20. Антигенные структуры бактерий, вирусов и других микроорганизмов.
21. Аллергены, определение и характеристика. Распространение в окружающей среде. Бытовые, эпидермальные, пищевые, пыльцевые и микробные аллергены.
22. Аллергены лекарственной природы и производственного происхождения.
23. Изоантигены: система антигенов эритроцитов, лимфоцитов, granulocytes, тромбоцитов.
24. Антигены гистосовместимости человека и животных.
25. Эмбриоспецифические антигены.
26. Искусственные антигены, их типы, химическая природа, применение.
27. Этапы биотрансформации антигена при введении в организм.
28. Иммуноглобулины (антитела), определение.
29. Клеточные основы антителогенеза, природа клеток, синтезирующих и секретирующих антитела. В-лимфоцит – предшественник антителообразующих клеток. Пути дифференцировки В-лимфоцита, роль поверхностных иммуноглобулинов. Биосинтез антител, роль внутриклеточных структур.
30. Методы выявления антителообразующих клеток (метод локального гемолиза в агаре, непрямой и прямой метод иммунофлюоресценции и др.).
31. Специфичность и гетерогенность антител.
32. Аффинность и авидность.
33. Динамика антителогенеза в иммунном ответе.
34. Иммуноглобулиновая природа антител.
35. Химическая структура антител, схема строения молекулы иммуноглобулина, лёгкие и тяжёлые цепи, переменные и константные домены. Активный центр молекулы антител.
36. Изотипия. Классы и субклассы иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgA, IgE, IgD), особенности строения, физико-химические свойства, функциональное значение каждого класса иммуноглобулинов.
37. Аллотипия. Идиотипия, идиотип-антиидиотипическое взаимодействие.
38. Антигенная характеристика иммуноглобулинов.
39. Эффекторные механизмы гуморального иммунитета.

40. Моноклональные антитела, работы Дж. Келера, С. Мильштейна.
41. Определение, характеристика, принципы получения гибридом, возможности и область применения.
42. Иммунологические феномены, основанные на взаимодействии антиген-антитело: агглютинация, преципитация, лизис, нейтрализация и др., их идентификация. Взаимодействие антитела с комплементом.
43. Цитотоксическое действие антител.
44. Лимфоцитотоксический тест в иммунологии.
45. Цитофильные антитела, их значение в фагоцитозе.
46. Иммунодиффузионный анализ в иммунологии.
47. Иммуноэлектрофорез, принцип метода, области его применения.
48. Определение концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови и в жидкостях методом радиальной иммунодиффузии.
49. Современные методы, основанные на взаимодействии антиген-антитело: иммунофлюоресцентный, радиоиммунный, иммуноферментный; принципы их постановки, области применения.
50. Иммуносорбция. Определение, виды и характеристика иммуносорбентов, области применения.
51. Генетика иммуноглобулинов. Структурные гены тяжёлых и лёгких цепей иммуноглобулинов, их перегруппировка.
52. Природа разнообразия антител. Работы С. Тонегавы.

2.4. Регуляторные клетки иммунной системы и их поверхностные структуры (рецепторы, маркеры и др.).

Лабораторная работа № 3. Гуморальные факторы естественной резистентности (лизоцим, комплемент, бактерицидная активность, цитокины, белки острой фазы и др.).

Цель занятия. Изучить гуморальные факторы естественной резистентности (лизоцим, комплемент, бактерицидная активность, цитокины, белки острой фазы и др.) и их роль в регуляции иммунитета.

Задание для выполнения лабораторной работы.

1. Определить лизоцимную активность слюны у курящих и некурящих студентов.
2. Изучить лизоцимную активность яичного белка птиц.

Материалы и оборудование. Чашки Петри со стерильным МПА, флакончик со стерильными дисками из фильтровальной бумаги (диаметр дисков 6 мм), стерильные пробирки, флакончики или чашки Петри для взятия исследуемого материала. Стерильные пастеровские и градуированные пипетки. Спиртовка, растворы красителей для окраски по методу Грама, фильтровальная бумага, прибор для промывания мазков, пинцет, иммерсион-

ное масло, микроскоп, измерительная линейка. Односуточная бульонная культура *Micrococcus lysodeicticus* (*M. lysodeicticus*) или смывы с денег стерильным физраствором. Слюна студентов (курящих и некурящих).

На каждую пробу яйца нужно иметь по 6 бактериологических пробирок с 9 мл стерильного физиологического раствора. Физраствор, яйца птичьих (промышленного производства куриные, домашние куриные, куриные фабричные с селеном, перепелиные).

Методические указания.

Лизоцим это белок-фермент (мурамидаза). Он разрушает клеточную стенку бактерии, в результате чего происходит её растворение. Лизоцим действует на один из основных компонентов бактериальной клетки – на гликопептиды бактерий

Определение лизоцимной активности слюны.

Ход работы.

1. Приготовить мазок из односуточной бульонной культуры *M. lysodeicticus* или из смыва с денег, окрасив его по методу Грама.

2. Стерильной градуированной пипеткой внесите односуточную бульонную культуру *M. lysodeicticus* в чашки Петри с МПА (0,4 мл) и с помощью шпателя, изготовленного из пастеровской пипетки, равномерно распределить культуру, слегка втирая её, по всей поверхности агаровой среды.

3. Поставить чашки в термостат на 2 часа для подсушивания, чтобы не допустить растекания проб исследуемого субстрата.

4. Подготовить две пробы исследуемого материала – слюны, поместив каждую в отдельную стерильную пробирку, флакончик или чашку Петри. Соблюдая правила стерильности при работе, открыть вблизи пламени спиртовки флакончик с дисками, с помощью пинцета захватить щепотку дисков и внести их во взятые пробы, после пропитывания дисков исследуемым субстратом разложить их в 4...6-повторениях на поверхность МПА в чашках Петри, засеянных тест-культурой *M. lysodeicticus*.

5. Чашки с дисками поставить в термостат на 24 часа.

6. Лизоцимную активность исследуемого материала определяют по зонам задержки роста (ЗЗР) тест-культуры вокруг дисков. При просмотре чашки в проходящем свете, зоны задержки

роста тест-культуры выглядят прозрачными и чётко вырисовываются на бактериальном фоне выросшей культуры *M. lysodeicticus* в виде мелких колоний. С помощью линейки измерьте диаметр ЗЗР. Оценку лизоцимной активности дайте по показателям: слабая – диаметр ЗЗР от 7 до 7,5 мм; средняя – диаметр ЗЗР от 7,6 до 8,5 мм; сильная – диаметр ЗЗР от 8,6 мм и выше.

Оформление работы. Рассчитать ЗЗР у каждой пробы, сделать вывод о влиянии табакокурения на лизоцимную активность слюны и общую резистентность организма.

Определение лизоцимной активности яичного белка птиц.

Ход работы.

1. Тупой конец яйца протереть ватным тампоном, смоченным в спирте, скорлупу надколоть, не нарушая подскорлуповой оболочки, удалить пластинку скорлупы, в образовавшееся отверстие ввести стерильную пипетку и, не касаясь желтка, набрать 1 мл белка и внести в первую пробирку с 9 мл физиологического раствора. Белок с помощью пипетки осторожными круговыми движениями тщательно размешать в физиологическом растворе до исчезновения сгустков.

2. Получив в первой пробирке разведение белка 1:10, перенести из неё 1 мл содержимого во вторую пробирку с 9 мл физиологического раствора, размешать, набирать пипеткой 1 мл, перенести в третью пробирку и тем же способом – в последующие до разведения яичного белка 1:1000000.

3. В пробирки каждого разведения яичного белка, начиная 1:100, погрузить стерильные диски из фильтровальной бумаги. Одновременно подготовить чашки Петри, засеянные культурой *M. lysodeicticus* по методике, описанной в предыдущей работе. Каждую чашку, предназначенную для исследования одной пробы яичного белка, расчертить восковым карандашом с наружной стороны дна на пять секторов, обозначив разведения: 1:100, 1:1000, 1:10000; 1:100000; 1:1000000, уменьшая при этом площадь сектора по мере возрастания степени разведения яичного белка.

4. С помощью пинцета из пробирок с разведениями яичного белка извлекают диски и в количестве 3-4 раскладывают в каждый обозначенный сектор чашки Петри на поверхность МПА, за-

сеянного тест-культурой *M. lysodeicticus*. Затем чашки ставят в термостат на 24 часа крышками вниз во избежание размыва выросших на агаровой среде колоний конденсационной водой.

Оформление работы. Рассчитать ЗЗР микроорганизмов вокруг бумажных дисков в чашках Петри в проходящем свете, сделать выводы о силе лизоцимной активности белка птичьих яиц в зависимости от вида птиц, от характера кормления кур.

Лизоцимную активность яичного белка учитывают по показателям зон задержки роста (ЗЗР) тест-культуры, начиная с разведения 1:100 со следующей оценкой: слабая – в разведении 1:100; средняя – в разведении 1:1000...1:10000; сильная – в разведении 1:100000...1:1000000.

Самостоятельная работа 3. Изготовление макетов «Клетки иммунной системы».

Методические указания по изготовлению макетов. Макет «Клетки иммунной системы» должен отображать Т- и В-лимфоцитов и их субпопуляций. Функционально различимые В- и Т-лимфоциты неразличимы морфологически, дифференцируются по поверхностным молекулам-антигенам (кластеры дифференцировки или CD-молекулы), которые обозначаются номерами (например, CD1).

Вопросы для самоподготовки

1. Определение феномена межклеточных взаимодействий. Трёхклеточная схема взаимодействия клеток.
2. Регуляторные Т-клетки гуморального и клеточного иммунного ответа. Т-хелперы 1 и 2 типов, Т-супрессоры, происхождение, структурные и функциональные особенности.
3. Механизмы специфического и неспецифического регуляторного действия.
4. Методы идентификации рецепторов и маркеров иммунорегуляторных Т-клеток.
5. Регуляторные В-лимфоциты, происхождение, возможные механизмы действия.
6. Регуляторная активность макрофагов, механизмы активирующего и супрессорного действия, природа регуляторных факторов.
7. Клиническое значение иммунорегуляторных субпопуляций лимфоцитов, взаимосвязь между Т-хелперами 1 и 2 типов, хелперными и супрессорными влияниями в норме и при различных патологических состояниях.
8. Стадии иммунного ответа: фагоцитоз, процессинг и презентация антигена А-клетками, распознавание, активация клеток клона, пролиферация и дифференцировка клеток-эффекторов.

9. Феномен двойного распознавания, работы Р. Цинкернагеля.
10. Специфический и неспецифические сигналы для активации.
11. Морфологические изменения в органах периферической иммунной системы в ходе иммунного ответа.
12. Первичный и вторичный гуморальный ответ. Переключение синтеза иммуноглобулинов с одного класса на другой, роль мутаций в ходе повышения аффинности антител.
13. Формирование Т- и В-эффекторов и клеток памяти.
14. Рецепторы (адгезивные молекулы) иммунокомпетентных клеток. Структура, основные функции, зависимость экспрессии от различных факторов.
15. CD-номенклатура.
16. Антигенспецифические рецепторы Т- и В-лимфоцитов: иммуноглобулиновые, TCR.
17. Антигеннеспецифические рецепторы: к Fc-фрагменту иммуноглобулинов, к комплементу, цитокинам, медиаторам и т.д.
18. Рецепторы и маркеры субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, клеток макрофагально-моноцитарного ряда. Использование моноклональной технологии для их идентификации.
19. Феномен розеткообразования в иммунологии. Е- и ЕАС-розеткообразующие клетки, история применения. Розеткообразование в теофиллиновом тесте.
20. Адгезивные молекулы из разных семейств: суперсемейство иммуноглобулинподобных молекул, интегрины, селектины, муцины, гомологичные ФНО/ФРН, мембранассоциированные эктоферменты и компоненты экстрацеллюлярного комплекса.

2.5. Гормоны и медиаторы иммунной системы.

Лабораторная работа № 4. Выделение лимфоидных органов и клеток у мыши.

Цель занятия. Овладеть методическими особенностями работы с клетками иммунной системы.

Задание для выполнения лабораторной работы.

1. Изучить принципы выделения органов, тканей и клеток иммунной системы.
2. Получить клеточную суспензию из лимфатических узлов мыши.

Материалы и оборудование. Весы, белые мыши, кюветы для вскрытия и препарирования мышей, наборы для вскрытия (ножницы, скальпели, пинцеты и др.), препаровальные иглы, шприц с иглой, термос (кювета) со льдом, среда 199, стерильные

чашки Петри, бюксы, центрифужные пробирки, воронки с капроновой сеткой.

Методические указания. Для выявления отдельных популяций клеток, оценки количественных закономерностей их появления и накопления, изучения маркеров и рецепторов различных популяций лимфоцитов необходимо овладеть методами работы с клетками иммунной системы.

Выделение органов и тканей иммунной системы.

Ход работы.

1. Животное убить, взвесить (вес тела животного необходимо знать при вычислении селезёночного индекса), сделать разрез по средней линии брюшка, кожу отпрепарировать и оттянуть на иглах.

2. Найти паховые и подмышечные лимфатические узлы. Сделать разрез мышц брюшины и извлечь брыжеечные лимфатические узлы.

3. Из брюшной полости извлечь селезёнку.

4. Вскрыть грудную полость и за грудиной найти тимус.

5. Вырезать бедренные и большие берцовые кости.

6. Выделенные ткани и органы поместить в среду 199 и хранить при температуре тающего льда ($0... -2^{\circ}\text{C}$). ***Приготовление клеточных суспензий идёт при температуре тающего льда в чашках Петри или бюксах в стерильных условиях.***

7. Получить клеточную суспензию из костного мозга.

7.1. Использовать бедренные и большие берцовые кости.

7.2. Кости очистить от прилегающих тканей при помощи пинцета и скальпеля, остатки тканей счистить марлей, срезать эпифизы и при помощи шприца с иглой соответствующего диаметра вымыть 2...3 мл костного мозга средой 199 (охлаждённой до $0... -2^{\circ}\text{C}$) в центрифужную пробирку.

7.3. Осторожно, избегая образования пены, клетки суспензировать, пропуская взвесь небольшими порциями через шприц.

7.4. Полученную суспензию клеток дважды отмыть средой 199 при центрифугировании (250...500 об/мин в течение 10 мин). Надосадочную жидкость слить (отбирают), клетки ресуспензировать в свежей среде 199.

8. Получить клеточную суспензию из лимфатических узлов, тимуса и селезёнки.

8.1. Лимфатические узлы (подмышечные, паховые, брыжеечные и др.), тимус или селезенку очистить от жира и соединительной ткани.

8.2. Очищенные лимфатические узлы, тимус или селезенку перенести в чашку Петри или бюкс с небольшим количеством среды 199 (0,5 мл) и фрагментировать ножницами (можно осторожно ворсить скальпелем, разрывать препаровальными иглами или раздавливать в гомогенизаторе) до получения однородной клеточной взвеси.

8.3. К полученной взвеси добавить 2,5 мл среды 199 и фильтровать её через капроновую сетку в центрифужную пробирку.

8.4. Дважды отмывают средой 199 при центрифугировании в течение 5 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляют, а к осадку добавляют свежей среды 199 и ресуспензируют пастеровской пипеткой, шприцем с иглой или автоматическим дозатором.

9. Пробирки с клеточной суспензией маркируют и хранят при температуре тающего льда (0... -2 °С) для определения жизнеспособности клеток.

Самостоятельная работа 4. Составление презентаций «Основные цитокины, принимающие участие в иммунном ответе»

Методические указания при подготовке презентаций. При составлении презентаций «Основные цитокины, принимающие участие в иммунном ответе», кратко изложите роль биологически активных макромолекул, молекулярный язык межклеточного общения. Раскройте все механизмы действия цитокинов. Дайте характеристику интерфероны (ИНФ), интерлейкины (ИЛ), хемокины, факторы некроза опухоли (ФНО), колониестимулирующие факторы (КСФ), факторы роста.

Вопросы для самоподготовки

1. Иммунологически активные факторы вилочковой железы, костного мозга, других органов иммунной системы. История вопроса.
2. Принципы получения иммуноцитомединов, основные физико-химические свойства, механизмы действия, тестирование. Лекарственные препараты на основе экстрактов из иммунных органов.
3. Иммуноцитокينات, история открытия, систематизация.
4. Интерлейкины, клетки-продуценты, структура, функции в иммунных процессах.

5. Колониестимулирующие факторы, клетки-продуценты, структура и функции.

6. Интерфероны α , β , γ , клетки-продуценты, структура, физико-химические свойства, механизмы действия, роль в иммунных процессах.

7. Факторы некроза опухоли (ФНО), клетки-продуценты, структура и функции.

8. Иммуноцитокнины-хемоаттрактанты.

9. Перспективы использования рекомбинантных цитокинов в качестве лекарственных препаратов.

10. Простагландины в иммунных процессах. Клиническое значение гормонов и медиаторов иммунной системы, действие их на нервную, эндокринную и другие системы организма.

2.6. Генетический контроль иммунного ответа. Апоптоз. Главный комплекс гистосовместимости.

Лабораторная работа № 5. Приготовление клеточных суспензий определённой концентрации и жизнеспособности.

Цель занятия. Овладеть методическими особенностями работы с клетками иммунной системы.

Задание для выполнения лабораторной работы.

1. Определить в клеточной суспензии из двух проб (№ 1 – из костного мозга и № 2 – из лимфатических узлов, тимуса и селезёнки мыши):

1.1. Число клеток в 1 мл суспензии.

1.2. Общее число ядросодержащих клеток.

1.3. Жизнеспособность клеток.

Материалы и оборудование. Клеточная суспензия № 1 из костного мозга мыши; клеточная суспензия № 2 – из лимфатических узлов, тимуса и селезенки (приготовлены на предыдущем занятии); шприцы с иглой или автоматические дозаторы, круглодонные планшеты, предметные и покровные стёкла, 5%-ный раствор уксусной кислоты, камера Горяева, микроскопы, 0,1%-ный раствор трипановой сини, фильтровальная бумага

Методические указания.

Подсчёт числа ядросодержащих клеток в суспензии.

Ход работы.

1. Взвесь клеток тщательно перемешать шприцем с иглой или автоматическим дозатором.

2. В лунке круглодонного планшета смешать 0,2 мл взвеси клеток и 1,8 мл 5%-ного раствора уксусной кислоты. Таким образом, первоначальная взвесь клеток разводится в 10 раз (эритроциты под влиянием уксусной кислоты лизируются, у ядросодержащих клеток разрушается оболочка, но ядра сохраняются).

3. Полученную смесь тщательно перемешать и заполнить ею камеру Горяева. Под микроскопом в сетке камеры Горяева подсчитать число клеток в 100 больших квадратах (25 «окон»). Подсчёт производят в 2 сетках камеры и выводят среднее число клеток.

Принцип подсчёта числа клеток в 1 мл суспензии.

Полученное число клеток соответствует объёму в 100 больших квадратах, т.е. $0,4 \text{ мм}^3$ (площадь квадрата $1/25 \text{ мм}^2$, высота камеры 0,1 мм). Следовательно, если в камере насчитали 100 клеток, т.е. в $0,4 \text{ мм}^3$ находится 100 клеток, то в 1000 мм^3 – 250000 клеток, а с учётом разведения клеток в 10 раз общее число ядросодержащих клеток в 1 мл составит 50×10^6 . По упрощённой схеме подсчёта полученное среднее число клеток делят на 4 и умножают на 10^5 .

$$X = (A / 4) \times 10^5,$$

где X – количество клеток в 1 мл клеточной суспензии;

A – количество клеток в 25 квадратах.

Для определения общего числа ядросодержащих клеток в органе количество клеток в 1 мл умножают на количество среды, в которой были суспензированы орган или ткань.

Определение жизнеспособности клеток.

Определение жизнеспособности клеток производится методом суправитальной окраски 0,1% раствором трипановой сини.

Ход работы.

1. На предметное стекло нанести каплю взвеси клеток и 1 каплю 0,1%-ного раствора трипановой сини.

2. Через 30...60 секунд окрашенную каплю взвеси покрыть покровным стеклом. Избыток суспензии удалить промакиванием фильтровальной бумагой.

3. Под микроскопом подсчитать число живых (неокрашенных) и погибших (синих) клеток на 100 кариоцитов.

4. Вывести процент гибели клеток.

Раствор трипановой сини готовят заранее. Порошок растворяют в бидистиллированной воде из расчёта получения 0,2% раствора, который фильтруют. Это маточный раствор. Рабочий раствор готовят перед опытом: маточный раствор разбавляют 4,25% раствором хлористого натрия до нужной концентрации (1 капля гипотонического физиологического раствора + 3 капли трипановой сини).

Оформление работы. Рассчитать и записать в суспензиях № 1 и № 2 : число клеток в 1 мл, общее число ядросодержащих клеток и процент гибели клеток. Сделать выводы об использовании клеточных суспензий.

Самостоятельная работа 5. Составление презентаций «Классификация антигенов главного комплекса гистосовместимости».

Методические указания при подготовке презентаций. При составлении презентаций кратко изложите роль и характеристику антигенов главного комплекса гистосовместимости, группы генов и кодируемых ими антигенов клеточной поверхности, которые играют важнейшую роль в распознавании чужеродного и развитии иммунного ответа. Укажите, на какие классы подразделяются эти антигены, в чём их отличие.

Вопросы для самоподготовки

1. Генетические основы несовместимости тканей. Понятие о генах и антигенах гистосовместимости.
2. Система главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) человека и животных. История открытия, наиболее существенные этапы, номенклатура, расположение локусов A, B, C, D/DR, DP, DQ, E, F, G, Bf, C2, C4, B2M, TNF в 6 хромосоме.
3. Структура трансплантационных антигенов классов I и II и их роль в межклеточных взаимодействиях.
4. Методы исследования и типирования антигенов ГКГ (серологические, клеточно-опосредованные). Практические аспекты типирования антигенов ГКГ в популяциях.
5. Биологическое значение системы ГКГ.
6. Изоантигены эритроцитов, связь с заболеваниями, реакции несовместимости при переливаниях крови.
7. Лейкоцитарные антигены.
8. Значение главного комплекса гистосовместимости для трансплантологии, установления личности, судебной медицины и ветеринарии, антропологии.

9. Генетические аспекты антителогенеза. Характер наследования силы иммунного ответа, гены иммунного ответа.

10. Генетический контроль структуры антител и Т-клеточного рецептора (TCR). Роль мутаций и генных рекомбинаций.

11. Трансплантационный иммунитет.

12. Аутологичная, сингенная, аллогенная и ксеногенная трансплантации. Эффект сингенного предпочтения (аллогенной ингибиции) и его генетический контроль

2.7 Иммунный ответ. Афферентная, центральная, эффекторная фазы иммунитета.

Лабораторная работа № 6. Цитотоксическая активность лимфоцитов. Методы тестирования цитотоксической активности Т-киллеров и естественных клеток-киллеров.

Цель занятия. Изучить методы тестирования цитотоксической активности лимфоцитов.

Задание для выполнения лабораторной работы.

1. Оценить наличие в крови реципиента антител к клеточным антигенам предполагаемого донора с помощью микролимфоцитотоксического теста.

Материалы и оборудование. Сыворотка периферической крови реципиента (в разведении 1:2, 1:4, 1:8 и 1:16), лейкоциты донора (в концентрации 2×10^5 в 1 мл), микропланшеты, CO₂-инкубатор, комплемент (заранее оттитрованная сыворотка морской свинки), 0,5% раствор трипанового синего, камера Горяева, микроскоп.

Методические указания.

Основными клетками, обладающими *цитотоксичностью*, являются антигенспецифические цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ), НК (естественные киллеры), а также клетки миелоидного ряда (макрофаги, нейтрофилы).

Классический феномен цитотоксичности заключается в способности Т-лимфоцитов распознавать клеточные элементы, несущие признаки генетической чужеродности (в частности, клетки модифицированные вирусом, опухолевые клетки, аллогенные и ксеногенные клетки), и уничтожить их. НК-клетки, в отличие от Т-лимфоцитов, распознают чужеродные клетки организма, утратившие антигены главного комплекса гистосовместимости (молекулы МНС). Другие клетки (например, В-лимфоциты, моноцитарно-макрофагальные клетки, эозинофилы, нейтрофилы и т.п.) также способны к цитотоксичности, но эта функция связана с привлечением антител против клетки мише-

ни – КМ (антителозависимая клеточная цитотоксичность), цитокинов (ФНО α) и иных агентов. В физиологических условиях, т.е. в норме, цитотоксичность клеток иммунной системы направлена на разрушение и элиминацию стареющих и повреждённых клеток, таким образом обеспечивая клиренс многоклеточного организма от отживших клеток и продуктов их распада.

Цитотоксическая активность клеток-киллеров реализуется при непосредственном синаптическом контакте лимфоцита (клетки эффектора – КЭ) с КМ. При этом в КМ индуцируется апоптоз.

В зрелом дифференцированном цитотоксическом лимфоците формируются гранулы, содержащие перфорин и гранзимы. После образования синапса между КЭ и КМ гранулы концентрируются в области контакта и затем освобождаются в направлении КМ. Перфорин при контакте с мембраной КМ полимеризуется и встраивается в мембрану, формируя в ней пору диаметром около 100 Å. В эту пору проникают гранзимы – ферменты, инициирующие апоптоз КМ. В системе *in vitro* степень разрушения КМ приближается к лизису.

Методы оценки функциональной активности ЦТЛ:

1. Хромовый тест.
2. Оценка цитотоксической активности с использованием точной цитометрии.
3. Оценка антителозависимой клеточной цитотоксичности с использованием эритроцитов барана, покрытых IgG – антителами к ним.
4. Определение перфорины методом ELISPOT

Хромовый тест считается «золотым стандартом». Под «хромом» имеют в виду соль хромата натрия, содержащую радиоактивный изотоп хрома – $\text{Na}_{251}\text{CrO}_4$, которую используют для мечения КМ. Такую метку подобрали опытным путём как относительно удовлетворяющую следующим критериям: свободно проникать в живые клетки и не выходить оттуда, пока клетка жива. Метка не вступает в прочные соединения с внутриклеточными структурами и имеет возможность выйти во внеклеточную среду из погибающей КМ. Чаще всего в качестве КМ используют опухолевые или зараженные вирусом клетки. Когда КМ выбраны, дальнейшая схема эксперимента кратко представляет собой следующее.

Ход работы.

1. 1×10^6 КМ инкубируют в среде, содержащей изотоп $\text{Na}_{251}\text{CrO}_4$ (37×10^5 Вq или 100 мкКю, специфическая активность 5 мкКю/моль), при 37°C в течение 1...1,5 часов, после чего тщательно отмывают от не вошедшего в клетки изотопа.

2. КМ подсчитывают и раскапывают в подобранной дозе в лунки культуральных круглодонных микропланшетов.

3. В те же лунки вносят КЭ. Соотношение КМ и КЭ обычно составляет от 1:10 до 1:500 в пользу КЭ.

4. Плашки подвергают мягкому центрифугированию – 150 g в течение 1 мин, после чего помещают в CO_2 -инкубатор при 37°C на 4...6 часов.

5. По завершении культивирования плашки центрифугируют при 250 g в течение 5 минут для плотного осаждения клеток.

6. Супернатанты собирают в специальные пробирки, в которых радиоактивность подсчитывают в γ -счётчике.

7. В качестве контроля используют:

а) лунки с КМ, в которые не вносят КЭ, – это контроль спонтанного выхода метки;

б) лунки с КМ, в которые вместо КЭ вносят детергент Triton X-100 1% (v/v), – это контроль максимально возможного высвобождения метки из КМ.

Цитотоксичность в опытных лунках рассчитывают обычно по следующей формуле:

$$\text{ЦИ} = \frac{\text{СРМ}_n}{\text{СРМ}_{\text{спонтанно}}} \times 100\%,$$

где СРМ – это число импульсов в минуту соответственно в экспериментальных лунках (СРМ_n), в лунках со спонтанным высвобождением метки ($\text{СРМ}_{\text{спонтанно}}$) и в лунках с максимально возможным высвобождением метки (СРМ_{max}).

Оценка цитотоксической активности с использованием проточной цитометрии. В данном случае для мечения клеток используют два реагента. Сначала метят КМ флуорохромом, который проникает в клетки, не повреждая их, и флуоресцирует, возбужденный лазерным излучением. Затем к КМ добавляют КЭ, инкубируют их совместно, чтобы дать возможность реализоваться киллерной атаке, и добавляют к смеси второй реагент, превращающийся во флуорохром только в живых клетках под дей-

ствием их ферментов-эстераз. В результате в итоговой картине КЭ станут светиться одним цветом «живого флуорохрома», живые КМ будут двухцветными, погибшие КМ – одноцветными по первому флуорохрому.

Известен метод **оценки антителозависимой клеточной цитотоксичности с использованием в качестве КМ эритроцитов** (например, барана), покрытых IgG – антителами к ним. КЭ, несущие Fc-рецепторы к IgG, разрушают (лизируют) КМ, и по уровню освобождаемого в культуральную среду гемоглобина судят об активности таких киллеров (NK, В-клетки, моноциты, макрофаги и др.).

Определение перфорины методом ELISPOT. Белок перфорин является необходимым компонентом лизиса, осуществляемого ЦТЛ и NK-клетками для уничтожения КМ. Метод ELISPOT широко применяется для определения выработки цитокинов антигенспецифическими Т-клетками. Метод ELISPOT достаточно чувствителен для выявления перфорины после активации ЦТЛ соответствующими антигенными эпитопами, например вирусными (потенциально годен для использования любой эпитоп). При выполнении данного метода на дне лунки пластикового планшета фиксируются моАТ к перфोरину. Недостаток метода – отсутствие возможности определить фенотип клеток, секретирующей перфорин, что частично компенсируется обогащением фракции ЦТЛ магнитной сепарацией. В экспериментах с использованием иммуномагнитной сепарации показано: основную популяцию клеток, образующих «пятна», составляют CD8+.

Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность. *In vivo* случается чаще всего в патологических условиях и направлена на безъядерные клетки – эритроциты и тромбоциты, реже на ядродержащие клетки крови, например нейтрофилы. Проявляются эти процессы в форме гемолитических анемий, тромбоцитопений, нейтропений. Этиология, как правило, либо инфекционная, либо лекарственная.

Комплементзависимая цитотоксичность.

Микролимфоцитотоксический тест. Этот вариант иммунной цитотоксичности используют в качестве лабораторного теста в трансплантологии для оценки возможного наличия в крови реципиента антител к клеточным антигенам предполагаемого донора.

Ход работы.

1. Сыворотку периферической крови реципиента в предложенных разведениях (1:2, 1:4, 1:8 и 1:16) накапать в лунки планшета.

2. Добавить лейкоциты донора (например по 2×10^5 на лунку) в лунки с разведениями сыворотки реципиента. Для контроля – лейкоциты донора переносят в лунки без сыворотки.

3. Планшеты инкубируют в CO₂-инкубаторе при 37 °С в течение 45...60 минут.

4. Затем в лунки добавить комплемент.

5. Продолжают инкубацию еще 30...45 минут.

6. Добавить в лунки 0,5% раствор трипанового синего.

7. В камере Горяева подсчитывают число прокрашенных (повреждённых) и непокрашенных (живых) клеток опытных образцов (разведение сыворотки 1:2, 1:4, 1:8 и 1:16 и контроле). Методика подсчёта – смотрите лабораторную работу №5. Поврежденные клетки выявляют по включению суправитального красителя – трипанового синего.

Оформление работы. Рассчитать и записать процент повреждённых клеток. Оценить результаты микролимфоцитотоксического теста по таблице № 1. Сделать выводы об использовании донора для трансплантации.

В случае если достоверно превышает таковой в контроле (т.е. в лунках, в которые не вносили сыворотку реципиента), то данный донор получает отвод.

Таблица 1

Оценка результатов микролимфоцитотоксического теста
(A. Zachary, G. Teresi (eds.). *ASHI Laboratory Manual (2nd ed.)*. Lenexa. KS: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 1990.)

Число погибших клеток, %	Балл	Результат
0—10	1	Отрицательный
11—20	2	Сомнительный
21—50	4	Слабо положительный
51—80	6	Положительный
81—100	8	Резко положительный

Самостоятельная работа 6. Решение диагностических задач (индивидуальное домашнее задание)

Комплект диагностических задач

1. Допишите фразы

Фагоцитоз –

Примеры активного иммунитета –

Пути активации комплемента –

2. Разработайте схему получения гемолитической сыворотки.

3. Заполните таблицу **ГЛАВНЫЕ ЗАДАЧИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ**

Задачи	Клетки	Макромолекулы
1.		
2.		
3.		
4. Допишите фразы		

Клетки участвующие в фагоцитозе –

МАК –

Перечислите механизмы распознавания генетически чужеродной структуры –

Рабочая паренхима ИС –

5. Заполните таблицу **ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ИЛ**

ИЛ	Продуцируются клетками	Действие (активация)
ИЛ1		
ИЛ2		
ИЛ3		
ИЛ4		
ИЛ5		

6. Допишите фразы

Комплемент –

Перечислите стадии фагоцитоза

Механизмы запоминания генетически чужеродной структуры –

Молекулярный язык межклеточного общения – это

7 Заполните таблицу **ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК ИС**

Типы клеток	Поверхностные маркеры	Свойства
Т-лимфоциты		
Т-хелперы		
В-лимфоциты		
Клетки памяти		
Цитотоксические		
Т-лимфоциты (ЦТЛ)		

7. Допишите фразы

Комплементарная система в организме выполняет

Примеры пассивного иммунитета –

Механизмы элиминации генетически чужеродной структуры

8. Разработайте схему получения сыворотки для серологической диагностики.

9. Заполните таблицу **ФАЗЫ ИММУННОГО ОТВЕТА**

Фазы	Клетки участвующие	Характеристика
1.		
2.		

3.

10. Допишите фразы

Воспалительная реакция организма относится к

Примеры естественного иммунитета –

Органы иммунной системы –

11. Разработайте схему получения комплемента для реакции РСК.

12. Заполните таблицу **ОСНОВНЫЕ ФОРМЫ ИММУННОГО ОТВЕТА**

Формы иммунного ответа	Основные эффекто- ры	Значение для организма
---------------------------	-------------------------	---------------------------

1

2

3

4

5

13. Допишите фразы

Клеточные факторы неспецифической защиты это –

Примеры искусственного иммунитета –

Молекулы иммунной системы –

14. Разработайте схему получения гипериммунной сыворотки.

15. Заполните таблицу **ОСНОВНЫЕ Ag БАКТЕРИЙ**

Название антигена	Химическая природа	Отношение к темпе- ратурным воздействиям
-------------------	--------------------	---

1

2

3

16. Допишите фразы

Гуморальные факторы неспецифической защиты –

Примеры активного искусственного иммунитета –

Клетки иммунной системы –

17. Разработайте схему проведения РСК.

18. Заполните таблицу **ДИНАМИКА ОБРАЗОВАНИЯ АНТИТЕЛ ПРИ ПЕРВИЧНОМ ИММУННОМ ОТВЕТЕ**

Название периода	Продолжительность	Краткая характеристика
------------------	-------------------	------------------------

1

2

3

4

19. Допишите фразы

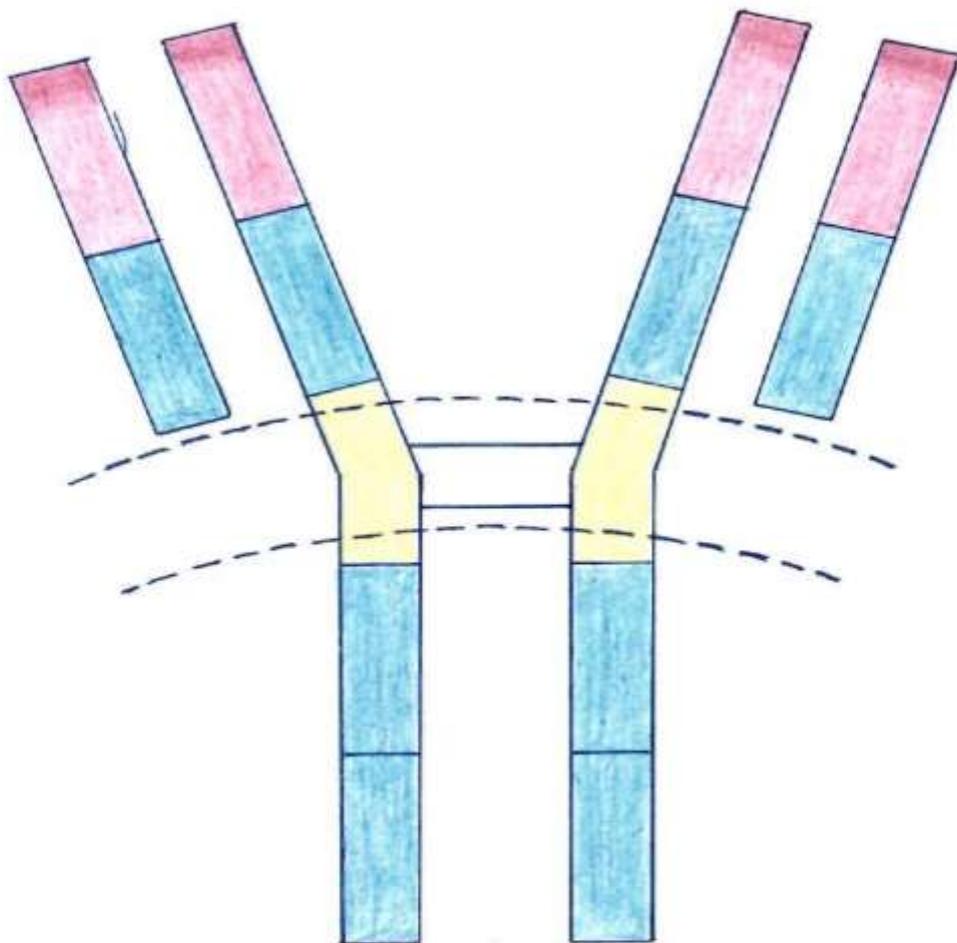
ЕКК –

Примеры активного естественного иммунитета –

Вспомогательные клетки ИС –

20. Схематично объясните, почему при отрицательной РСК эритроциты барана разрушаются

21. Подпишите рисунок



22. Допишите фразы

Лизоцим –

Примеры пассивного искусственного иммунитета

ИКК –

23. Схематично объясните, почему при положительной РСК эритроциты барана не разрушаются.

24. Заполните таблицу **ХАРАКТЕРИСТИКА ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН**

Преимущества	Недостатки
1	1
2	2
3	

25. Допишите фразы

Интерферон –

Примеры пассивного естественного иммунитета –

АПК иммунной системы –

26. Назначение «контролей» при иммунологических диагностических реакциях.

27. Заполните таблицу ХАРАКТЕРИСТИКА ЖИВЫХ ВАКЦИН

	Преимущества	Недостатки
1		1
2		2
3		3
4		
5		

Вопросы для самоподготовки

1. Основные типы клеточно-опосредованной цитотоксичности: цитотоксические Т-лимфоциты (Т-киллеры), К-клетки (антителозависимая клеточная цитотоксичность), НК-клетки (естественные киллеры), LAK-клетки (лимфокин-активированные киллеры).

2. Природа эффекторных клеток, рецепторы и маркеры, происхождение, стадии развития.

3. Основные этапы цитотоксического действия, механизмы цитолиза клеток-мишеней.

4. Цитотоксическая активность макрофагов.

5. Методы выявления цитотоксических клеток.

6. Регуляция активности киллеров.

7. Значение цитотоксических реакций в противоопухолевом, инфекционном, трансплантационном иммунитете.

8. Изменения цитотоксичности при различных формах иммунопатологии.

2.8. Иммунологическая толерантность.

Самостоятельная работа 7. Подготовка рефератов на тему: «Искусственная толерантность. Практическое значение толерантности».

Методические указания при подготовке реферата. В реферате необходимо раскрыть вопросы: феномен иммунологической толерантности, его практическое значение для решения многих важных проблем медицины, таких как пересадка органов и тканей, подавление аутоиммунных реакций, лечение аллергий и других патологических состояний, связанных с иммунной системой. Необходимо в реферате показать: способность анализировать закономерности функционирования иммунной системы организма с использованием знаний его морфо-физиологических основ; базовые методики клинико-иммунологического исследования и оценки функционального состояния организма животного для своевременной диагностики заболеваний; способность понимать основу и механизм иммунологической толерантности при пато-

логических состояниях, связанных с агрессивным поведением иммунной системы.

Вопросы для самоподготовки

1. Определение, история открытия, систематизация. Работы П. Медавара и Я. Гашека.
2. Индукция толерантности в неонатальном и взрослом состоянии.
3. Т- и В-толерантность.
4. Условия формирования и поддержания естественной толерантности, её связь с **делецией и анергией** клонов.
5. Искусственная толерантность: после облучения, лекарственно-индуцированная.
6. Условия отмены толерантности. "Срыв" ауто толерантности и аутоиммунные нарушения.
7. Роль генотипа в индукции толерантности.
8. Практическое значение толерантности.

2.9. Теории иммунитета.

Лабораторная работа № 7. Антисыворотки, способы получения, выделение иммуноглобулиновой фракции из сыворотки крови животных.

Цель занятия. Изучить методами выделения иммуноглобулинов и получения антисывороток. Овладеть оценки активности антисывороток.

Задание для выполнения лабораторной работы

1. Изучить методику и составить схему получения иммуноглобулинов как антигенов для иммунизации.
2. Составить схему получения моноспецифических сывороток к иммуноглобулинам отдельных классов.
2. Определить титр моноспецифических сывороток в реакции диффузионной преципитации.

Материалы и оборудование. Антисыворотка, иммуноглобулины G, M, A; штатив с 6 пробирками, изотонический раствора натрия хлорида, набор автоматических пипеток, чашки Петри с осветлённым 1...1,5%-ным агаром (агар Дифко), пробойники, расплавленный агар Дифко, пастеровские пипетки, осветитель ОИ-19.

Методические указания.

Для выделения отдельных классов иммуноглобулинов используют следующие методы:

физико-химические – осаждение глобулиновой фракции сыворотки крови натрия сульфатом; предварительное выделение отдельных классов иммуноглобулинов путем осаждения полиэтиленгликолем (ПЭГ) с молекулярной массой 6000; электрофорез препаративный и аналитический;

иммунологические – иммуноэлектрофорез для определения чистоты выделенных иммуноглобулинов и оценки специфичности полученных антисывороток (Грабар, Буртан, 1963); метод радиальной иммунодиффузии для количественного исследования иммуноглобулинов с использованием кроличьих моноспецифических антисывороток.

Для получения иммуноглобулинов как антигенов для иммунизации в качестве исходного материала используют смесь сывороток крови здорового клинически животного (крупного рогатого скота) возрастом 3...5 лет.

Сыворотку предварительно фракционируют с целью выделения гамма-глобулина (работать можно с любым объемом сыворотки). Для этого к 100 мл сыворотки добавляют 18 г Na_2SO_4 . Осаждение проводят при обычной температуре (комнатной), так как при охлаждении растворимость натрия сульфата уменьшается. Полученную смесь центрифугируют при 6000 об/мин в течение 15 мин. Осадок растворяют в 40 мл фосфатного буфера (М 0,1; рН 8). Раствор центрифугируют и нерастворившийся осадок удаляют, а к надосадочной жидкости вновь добавляют 4,8 г Na_2SO_4 . Полученный осадок отделяют центрифугированием и вновь растворяют в 20 мл того же буфера. После очередного центрифугирования к раствору еще раз добавляют Na_2SO_4 в количестве 2,4 г. Выпавший осадок отделяют, растворяют в буфере и подвергают диализу против физиологического раствора.

Чистоту гамма-глобулинов проверяют методом аналитического электрофореза на пластинке агара. Гамма-глобулиновая фракция не должна содержать анодных примесей. В случае наличия последних предварительное фракционирование повторяют.

Для выделения иммуноглобулинов разных классов к концентрату глобулиновой фракции добавляют ПЭГ-6000 до 5% (масса/объем). Эту смесь центрифугируют и из надосадочной жидкости первым выделяют IgM, путем добавления ПЭГ-6000 до 6%. При этом учитывают предварительное насыщение полиэти-

ленгликолем. Путем центрифугирования отделяют осадок, а потом растворяют в физрастворе до необходимой концентрации. IgG получают путём добавления ПЭГ-6000 до 12%. Также добавляют физраствор. IgA выделяют путём добавления ПЭГ-6000 до 14%. Осадок также растворяют физраствором.

Чистоту полученных фракций контролируют аналитическим электрофорезом на пластинке агара. При этом обычно отмечается загрязнение анодной фракцией.

Дальнейшую очистку проводят путем препаративного гелеэлектрофореза на 0,1 М трис-НС-буфере рН 8 при 100 мА на пластину (9x12 см²) в течение 2...2,5 ч. Катодные фракции вырезают вместе с агаром и помещают в центрифужные стаканы, замораживают, а затем центрифугируют до полного размораживания при 6000 об/мин. При этом белки элюируют с агара в надосадочную жидкость, которую и используют.

Чистоту выделенных таким образом иммуноглобулинов G, M, A классов контролируют в иммуноэлектрофорезе на стеклянных пластинках размером 9x12 см² в 1%-ном агаровом геле (тип USA) на 0,1 М медиалацетатном буфере рН 8,6 в течение 45 мин при силе тока 5 мА/см с антисывороткой против белков, сыворотки крови крупного рогатого скота.

Выделенные и очищенные таким способом IgG, IgM, IgA собирают и концентрируют в диализных мешочках против ПЭГ-40 000, расфасовывают и хранят в замороженном состоянии.

Моноспецифические сыворотки к иммуноглобулинам отдельных классов получают по следующей схеме: кроликам массой 2,5...3 кг три дня подряд под конъюнктиву глаза вводят по 0,1 мл раствора (2 мг в 1 мл) антигена и после 3-дневного перерыва инъекции повторяют. Затем опять после 3-дневного перерыва антиген вводят ещё три дня в дозе, увеличенной в 2 раза. Спустя 7...10 дней после инъекции берут кровь и определяют титр сыворотки в реакции диффузионной преципитации. По такой схеме иммунизации титр (количество антител) составляет к иммуноглобулинам класса G – 1:16...1:32, A – 1:8...1:16, M – 1:4...1:8.

У каждого гипериммунизированного кролика, после проверки активности антисыворотки, из ушной вены, предварительно смазав поверхность уха ксилолом, берут по 40...60 мл крови и

получают сыворотку, фасуют во флаконы по 5 мл и хранят при -20 °С.

Кроликов, сыворотка крови которых содержат антитела в высоком титре, используют в качестве доноров. Реиммунизируют их аналогичным антигеном через два месяца.

Ход работы. Определение титра антисыворотки в реакции диффузионной преципитации (РДП).

1. Разведение антисыворотки. Непосредственно перед постановкой реакции готовят разведения антисыворотки, для чего в пять пробирок вносят по 1,0 мл изотонического раствора натрия хлорида. В первую пробирку добавляют 1,0 мл антисыворотки, получая разведение 1:2, перемешивают, и переносят 1,0 мл смеси во вторую пробирку и т.д. Таким образом, получают пять пробирок с разведениями 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 и 1:32.

2. В приготовленные заранее чашки Петри с разлитым по 20...25 мл осветлённым 1...1,5%-ным агаром делают пробойником лунки в центре и на периферии по трафарету диаметром 5...6 мм на расстоянии 4...5 мм друг от друга. В каждую лунку вносят по одной капле агара для формирования дна лунки.

3. Розлив компонентов реакции в лунки проводится по схеме: в центральную лунку вносят по 0,05...0,07 мл иммуноглобулина. В шесть периферических лунок закапывают 0,05...0,07 мл антисыворотки с разведениями 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 и 1:32. При этом в одной чашке Петри исследуют все иммуноглобулины и антисыворотки к ним. Для каждой пробы сыворотки используют отдельную пастеровскую пипетку.

Необходимо обращать особое внимание на правильность заполнения лунок. Иммуноглобулин и антисыворотки вносят с таким расчётом, чтобы жидкость не растекалась по поверхности агара. После заполнения лунок чашки Петри закрывают крышками и помещают во влажную камеру при температуре 18...25 °С.

4. Учёт реакции. Реакцию учитывают через 48...72 ч. Чашки просматривают на тёмном фоне в косонаправленном пучке света. Для этой цели используют осветитель ОИ-19. Реакцию учитывают по линии преципитации. Линии преципитации должны быть чёткими, расположенными посередине между лунками.

5. Оценка результатов реакции. За титр моноспецифических сывороток принимают наибольшее разведение сыворотки, которое дало чёткую линию преципитации.

Оформление работы.

1. Представить схему получения иммуноглобулинов как антигенов, состоящую из восьми этапов.

2. Разработать схему получения моноспецифических сывороток к иммуноглобулинам отдельных классов в виде таблицы № 2.

Таблица 2

Получение моноспецифических сывороток к иммуноглобулинам отдельных классов

Этап	Название	Характеристика
1	Иммунизация	
	Вид гипериммунизированного животного	
	Антиген	
	Способ введения	
	Доза первичного введения антигена	
	Доза повторного введения антигена	
	Кратность (схема)	
2	Определение титра сыворотки	
	Получение сыворотки	
	Реакция	
3	Получение моноспецифической сыворотки	
	Метод	
	Количество крови от одного животного	
	Хранение сыворотки	

3. Записать результаты РДП, т.е. титр моноспецифических сывороток. По полученным результатам сделать выводы об использовании доноров (кроликов) для дальнейшей реиммунизации и получения антисыворотки.

Вопросы для самоподготовки

1. Исторические аспекты теорий об иммунитете. Роль отечественных учёных, вклад И.И. Мечникова.
2. Инструктивные и селективные теории иммунитета, обоснование.
3. Теория "боковых цепей" П. Эрлиха.
4. Селективная теория Н. Ерне.

5. Клонально-селекционная теория М. Бернета, её значение для современной иммунологии.

6. Теория иммунологической сети, идиотип-антиидиотипическое взаимодействие.

7. Критический анализ теорий иммунитета.

2.10. Филогенез и онтогенез системы иммунитета.

Самостоятельная работа 8. Составление презентаций «Защитные силы животных и их функции на разных филогенетических уровнях»

Методические указания при подготовке презентаций.

Коротко изложите особенности иммунитета у беспозвоночных, эволюцию системы иммунитета у позвоночных. Формирование факторов антигенспецифического адаптивного иммунитета в эволюции. Укажите роль молекул адгезии, лектинов, зачатков специфических иммунных процессов.

Вопросы для самоподготовки

1. Филогенез иммунитета.

2. Иммунитет у беспозвоночных — гуморальные и клеточные факторы, фагоцитоз, зачатки специфических иммунных процессов, роль молекул адгезии, лектинов.

3. Зарождение антигенспецифического распознавания и адаптивного иммунного ответа — происхождение суперсемейства иммуноглобулинов, V-генов, антител, антигенраспознающих рецепторов.

4. Формирование процесса презентации антигенов — происхождение молекул главного комплекса гистосовместимости, эволюция процессинга антигенов, системы костимуляции.

5. Эволюция системы иммунитета у позвоночных — органы и клетки иммунной системы, тимус, сумка Фабриция и другие центральные лимфоидные органы и структуры.

6. Эволюция клеточного и гуморального иммунитета, противоинфекционной и противоопухолевой защиты.

7. Уникальность иммунных процессов и их эволюционные истоки.

8. Формирование факторов антигенспецифического адаптивного иммунитета в эволюции.

9. Онтогенез системы иммунитета.

10. Формирование в онтогенезе миелоидных и лимфоидных рядов гемопоэза — роль желточного мешка, печени эмбрионов, тимуса, костного мозга.

11. Миграции клеток иммунной системы в онтогенезе: перемещения стволовых кроветворных клеток, волны заселения тимуса и эмиграции Т-клеток из тимуса.

12. Изменение реакции лимфоцитов на стимуляцию в процессе онтогенеза — соотношение пролиферации и апоптоза, анергии и иммунного ответа.

13. Иммунные процессы в перинатальном периоде — перестройки в иммунной системе, формирование основных типов иммунных процессов, формирование клеток памяти к основным антигенам среды обитания, автономизация периферического звена иммунной системы.

14. Старение иммунной системы — инволюция тимуса и факторы, её вызывающие, динамика гормонов тимуса, цитокинов, возрастной дисбаланс Th1/Th2-регуляции иммунных процессов, старческий иммунодефицит и его последствия.

2.11. Модельные системы в фундаментальной и прикладной иммунологии.

Лабораторная работа № 8. Модельные системы в иммунологии. Различные способы введения антигенов животным.

Цель занятия. Изучить экспериментальные модели на уровне организма, молекулярно-клеточных взаимодействиях, на геномном уровне. Отработать различные способы введения антигена.

Задание для выполнения лабораторной работы.

1. Провести иммунизацию кроликов белковым антигеном.

Материалы и оборудование. Кролик любой породы, желательно с большими ушами для удобства отбора крови из ушных вен; не следует использовать животных, ранее использовавшихся для иной иммунизации; антиген (0,14...14 мг антигена на кролика); полный адъювант Фрейнда (ПАФ); шприц для инъекций (2 мл) с иглой №16; пробирки; пипетки или автоматические дозаторы с наконечниками.

Методические указания.

Экспериментальная иммунология – область иммунологии, которая занимается воспроизведением иммунологических феноменов в экспериментальных условиях.

Эксперимент – моделирование физиологического или патологического процесса в искусственных условиях для изучения механизма его развития, влияющих факторов или для других целей.

Экспериментальное моделирование – это совокупность приёмов воспроизведения патологических процессов у экспериментальных животных или воздействия факторами различной природой с целью изучения их влияния на живой организм.

Экспериментальная модель – это термин, употребляемый в отношении:

лабораторных животных, у которых искусственно полностью или частично воспроизводятся признаки клинической картины иммунопатологического процесса человека;

культуры клеток, тканей и изолированных органов, что логически не правомерно, однако связано с всё большим развитием исследований на молекулярно-клеточном и молекулярно-генетическом уровнях.

Создание экспериментальной модели (табл. 3 и 4) позволяет решить следующие задачи:

изучение молекулярно-клеточных механизмов иммунопатологии *in vivo*;

определение роли иммунной системы в возникновении, течении и исходе конкретных заболеваний;

разработка новых методов специфической диагностики, профилактики и терапии заболевания;

контроль безопасности и эффективности иммунопрепаратов.

Таблица 3

Классификация экспериментальных моделей

По этиологии и патогенезу изучаемого процесса или заболевания	По уровню исследования
Экспериментальные модели опухолей	Экспериментальное моделирование на уровне: <i>организма</i> (предполагает использование лабораторных животных) <i>молекулярно-клеточных взаимодействий</i> (предполагает использование культур клеток или тканей) <i>на геномном уровне</i> (предполагает использование методов молекулярной биологии и генной инженерии как на культурах клеток, так и на яйцеклетках, эмбрионах и животных)
Экспериментальные модели инфекционных заболеваний	
Экспериментальные модели иммунодефицитов	
Экспериментальные модели аутоиммунных заболеваний	
Экспериментальные модели аллергических процессов	

Таблица 4

Экспериментальные модели опухолей

Тип модели	Характеристика и индуктор опухолевой модели	Примеры	Преимущества модели	Недостатки модели
Спонтанные опухоли животных		Опухоли молочных желез у мышей		Низкая частота возникновения
Перевиваемые опухоли животных			Перевиваемый штамм сохраняет свои свойства и может быть заморожен на длительное время	
Индуцированные опухоли животных	Химические реагенты, онкогенные вирусы, облучение, дисбаланс гормонов			
Клеточные культуры опухолей человека и животных			Служат для отбора противоопухолевых препаратов, установления индивидуальной чувствительности, для испытания генотоксических свойств	
Опухоли человека, привитые животным	Любую опухоль человека можно трансплантировать в привилегированные ткани животного без развития иммунных реакций	Гетеротрансплантация опухолей мышам с мутацией <i>Пи</i>		Можно работать только с опухолями маленьких размеров
Молекулярно-генетические модели опухолей	Необходимые для изучения гены могут быть внесены в клетки, растущие в культуре ткани		Определение роли мутаций генов в развитии онкологических заболеваний	

Экспериментальные животные.

Выбор биологической модели (вида животных) для введения антигена определяется поставленной задачей. В таких случаях экспериментальных животных нужно выбирать из филогенетически отдалённых классов позвоночных. Они особенно пригодны для работы с так называемыми «консервативными антигенами», мало изменявшимися в ходе эволюции. Медленно эволюционирующие антигены млекопитающих, как правило, не вызывают иммунного ответа у млекопитающих другого вида ввиду минимальных структурных различий. Наиболее далёкой в генетическом отношении среди возможных моделей являются рыбы. В частности, карликовый сом продуцирует антисыворотки с высоким титром антител против групповых антигенов крови человека в ответ на введение им слюны секреторов. Рыбы оказались удобными продуцентами антител, применяемых для изучения филогенетического родства белков иммунохимическими методами.

При выборе биологической модели для иммунизации не следует пренебрегать экономическими соображениями, поскольку высокая себестоимость препаратов снизит их востребованность и доступность для практических нужд.

В некоторых случаях существуют особенности видовой реактивности на некоторые антигены, что следует учитывать при выборе биологической модели.

Следует учитывать, что на уровень продукции антител может оказывать влияние физиологическое состояние животных. Так, беременных коров можно иммунизировать без вреда для плода; после отёла от них удаётся получить несколько литров молозива, в котором содержание антител в несколько раз превышает их концентрацию в сыворотке крови. Эту технологию использовали для получения больших количеств антител к Н-антигену сальмонелл, ферритину кролика и человека.

Получение иммуноглобулинов *in vitro* принципиально возможно, но на практике используется крайне редко. Несмотря на то, что В-лимфоциты не культивируются на искусственных средах, антителогенез может быть индуцирован в культуре клеток селезёнки иммунизированных мышей. Синтез IgM в таких условиях наблюдается на 5-й день, IgG – в более поздние сроки, что соответствует времени появления антител *in vivo*. Кортизон тор-

мозит синтез иммуноглобулинов *in vivo*, но ускоряет их синтез *in vitro*.

Общие принципы иммунизации (введения антигенов (АГ)) животных:

1. Повторное введение определенных доз АГ при постепенном их увеличении. Титры антител (АТ) чаще бывают высокими при иммунизации средними дозами АГ. При использовании низких доз не удаётся создать достаточный стимул для индукции иммунного ответа. Введение высоких приводит к угнетению синтеза IgM и более позднему их появлению, чем в предыдущем случае.

2. Повторные циклы иммунизации через определенные промежутки времени. Для достижения максимальной продукции антител необходимо соблюдение интервалов времени между инъекциями и циклами иммунизации. Продолжительность интервалов диктуется особенностями формирования иммунного ответа. В пределах одного цикла повторно вводить АГ возможно не позже, чем через 4...5 дней (оптимально 2...3 дня), так как к этому времени в сыворотке существенно увеличивается титр иммуноглобулинов, что увеличивает риск образования комплекса «антиген-антитело» и «выключает» антиген из процесса иммунизации; кроме того, в подобной ситуации существует угроза развития иммунокомплексной патологии.

3. Для формирования клеток памяти требуется достаточно длительный срок (60...100 дней), поэтому для получения вторичного иммунного ответа с образованием IgG повторный цикл следует начинать не ранее указанного срока (для мышей оптимально – 90 дней). Дозы для ревакцинации могут быть ниже, чем первичные, однако часто это приводит к менее выраженному ответу.

4. Использование адъювантов может помочь в значительной степени усилить иммунный ответ.

Способы введения антигена:

— подкожно или внутрикожно в нескольких местах (в иммунный процесс вовлекаются регионарные лимфатические узлы; медленное всасывание антигена приводит к длительному сохранению антител в организме животных);

- внутривенно (используется для получения иммунной асцитической жидкости);
- внутривенно (обеспечивает наиболее высокий титр антител; в иммунный процесс вовлекаются селезенка, печень и костный мозг);
- комбинированные способы.

Ход работы. Проведение иммунизации (введение антигена в лимфатический узел).

Суть метода. В основу этого метода положена индукция локальной иммунной реакции лимфатических узлов малой дозой антигена. Образующиеся клетки памяти распределяются по всему организму, последующее введение соответствующего антигена стимулирует популяцию сенсibilизированных лимфоцитов, начинающих интенсивно синтезировать антитела.

1. Каждому кролику вводят около 1 мл эмульсии, содержащей не менее 10 мкг/мл антигена. Большим и указательным пальцами находят подколенный лимфатический узел задней ноги. После того, как лимфатический узел найден, его фиксируют кончиками пальцев. В лимфатический узел тонкой иглой вводят 0,3 мл эмульсии, при попадании материала в лимфатический узел последний вздувается под пальцами экспериментатора. Опыт показывает, что даже при инъекции окружающих лимфатический узел тканей наблюдается выраженный иммунный ответ.

2. Точно также антиген вводят в симметричный лимфатический узел.

3. Оставшиеся 0,4 мл смеси вводят равными частями подкожно в подушечки стоп задних конечностей.

4. Не ранее чем через 6, а лучше через 8 недель, проводят повторную иммунизацию. Для этого антиген вводят с неполным адьювантом Фрейнда или в растворе. Каждому кролику вводят не менее 10 мг материала; по 0,1...0,2 мл смеси вводят подкожно в каждую конечность. Подкожные инъекции повторяют с недельным интервалом до достижения достаточного титра антител.

Оформление работы. При оформлении протокола работы студентом указывается перечень оборудования, материалов и реактивов, необходимых для каждого этапа процедуры; последовательность выполнения операций; результаты исследования. Описываются следующие этапы:

- вид и другие необходимые характеристики лабораторного животного;
- доза, характеристики и способ введения используемого для иммунизации антигена для каждого этапа;
- вид и количество адьюванта.

Самостоятельная работа 9. Подготовка к тестированию.

Фонд тестовых заданий

*(Значком * отмечены задания, где правильных ответов более одного)*

1. Гаптенom называется...

- конъюгированный антиген
- антиген, индуцирующий развитие толерантности
- +неполный антиген
- T-клеточный рецептор

2. Антиген может проникнуть в организм...

- путём фагоцитоза
- через ходы в эпителии
- через поврежденный эпителий
- +любым из перечисленных путей

3. Антигенные детерминанты это...

- +часть структуры антигена, ответственная за специфическое взаимодействие с молекулами антител
- вещества, вызывающие формирование иммунного ответа
- вещества, связывающиеся с H-цепью иммуноглобулинов
- все вышеперечисленное неверно

4. По химической структуре антигены могут быть...

- +белками
- углеводородами
- нуклеиновыми кислотами
- липидами
- всё вышеперечисленное

5*. Иммуногенность...

- +зависит от возможности нативных антигенов быть презентированными в комплексе с МНС
- обычно является свойством собственных антигенов, таких, как ткани внутренней среды глаза
- не является свойством антител
- +не является свойством гаптенов
- +появляется только у антигенов белковой природы

6*. Выберите правильное утверждение...

- +CD-антигены позволяют лейкоцитам распознавать антигены
- каждый тип CD экспрессируется только на одном виде клеток

экспрессия CD вызывается искусственно для того, чтобы дифференцировать разные клетки

+CD находятся только на лейкоцитах

CD функционируют в качестве рецепторов для цитокинов и молекул клеточной адгезии

7. Следующие свойства способствуют иммуногенности вещества...

большая молекулярная масса

сложность химического строения

достаточная стабильность и персистирование после инъекции

всё вышеперечисленное

+всё вышеперечисленное необходимо, но недостаточно

8. Гуморальное звено иммунитета открыто...

Э. Берингером

К. Ландштайнером

И.И. Мечниковым

+П. Эрлихом

9. Фагоцитарное звено иммунитета открыто...

+ И.И. Мечниковым

Л. Пастером

Л. Милстайном

К. Пирке

10*. К иммунокомпетентным клеткам относятся...

+Т-лимфоциты

+В-лимфоциты

эндотелиоциты

тромбоциты.

эритроциты

11. Антиген способны представлять...

Т-лимфоциты

кардиомиоциты

макрофаги

нейтрофилы

+всё перечисленное

12. Основным признаком, характеризующим антигены, является...

чужеродность

антигенность

иммуногенность

специфичность

+всё перечисленное

13. Первичный гуморальный ответ в крови после введения антигена развивается через...

1...2 часа

+3...4 дня

5...6 недель

7...10 лет

14. Какие клетки способны презентировать экзогенные антигены?

+макрофаг, дендритная клетка, В-лимфоцит
эозинофил, нейтрофил
тучная клетка, НК-клетка
Т-лимфоцит

15. Как долго могут жить клетки памяти?

+пожизненно
3 месяца
несколько лет
несколько дней

16. Наиболее точно термину «антигены» соответствует определение...

+вещества, индуцирующие иммунный ответ
вещества, вырабатываемые Т-клетками для уничтожения инфекционных агентов
собственные белки организма с измененной структурой
чужеродные белки, индуцирующие иммунную толерантность

17. Лимфоциты активируются антигеном...

в кровеносном русле
в костном мозге
в печени
+в лимфатических узлах
в коже

18. Селезёнка:

является органом центральной иммунной системы
+является органом периферической иммунной системы
не является органом иммунной системы
служит местом созревания Т-лимфоцитов

19. Что из нижеперечисленного имеет наименьшие размеры?

антиген
антитело
+эпитоп
В-клетка

20*. Органы, выстланные слизистой оболочкой...

кожа
+дыхательные пути
+ЖКТ
внутренняя поверхность кровеносных сосудов
всё вышеперечисленное

21. Способность антигена вызывать иммунный ответ не зависит от...

+способности антигена проникать в щитовидную железу
степени агрегации антигенов
дозы антигена
размера антигена

всё вышеперечисленное верно

22. Что из нижеперечисленного не происходит в костном мозге?

клеточная пролиферация

дифференцировка клеток

клеточные взаимодействия

+антиген-зависимый иммунный ответ

всё вышеперечисленное неверно

23. Что из нижеперечисленного подходит только для вторичных (периферических) органов иммунной системы?

наличие предшественников В- и Т-клеток

+циркуляция лимфоцитов

конечная дифференцировка

пролиферация клеток

всё вышеперечисленное

24. Удаление сумки Фабрициуса у цыпленка приведёт к...

+заметному снижению количества циркулирующих Т-лимфоцитов

анемии

замедлению отторжения трансплантата кожи

снижению уровня антител в сыворотке

всё перечисленное верно

всё перечисленное неверно

25. Зародышевые центры, находящиеся в паракортикальной зоне лимфатических узлов и периферические зоны периартериолярной лимфатической ткани селезенки...

поддерживают развитие незрелых В- и Т-клеток

служат для удаления повреждённых эритроцитов из кровеносного русла

действуют как основной источник стволовых клеток, поддерживая таким образом гемопоэз

+создают инфраструктуру, которая при стимуляции антигеном содержит множество В-лимфоцитов и плазматических клеток

являются местами дифференцировки НК-клеток

26. Иммуитет — это...

функция защиты организма исключительно от вирусных инфекций

+функция защиты организма от агентов, несущих чужеродную генетическую информацию

функция защиты организма исключительно от простудных заболеваний

27. Центральная задача иммунитета...

+обеспечение генетической целостности организма

обеспечение противинфекционной защиты

отторжение пересаженных клеток, тканей и органов

реализация организмом запрограммированной клеточной смерти

обеспечение состояния толерантности к «своему»

28*. Состояние иммунитета определяется функциями...

центральной нервной системы

гормональной системы
+кроветворной системы
+лимфоидной системы

29. Из числа органов иммунной системы к центральным относятся...

+тимус, костный мозг
пейеровы бляшки
селезёнка
кровь

30*. Из числа органов иммунной системы к периферическим относятся...

тимус, костный мозг
+пейеровы бляшки
+селезёнка
кровь

31. Назовите неинкапсулированную лимфоидную ткань, входящую в состав иммунной системы...

слизистых оболочек
желудочно-кишечного тракта
bronхов и бронхиол
носоглотки
моче-половых путей
кожи

+всё перечисленные

32*. Лимфопозз осуществляется...

+в костном мозгу
в селезёнке
в лимфатических узлах
+в тимусе

33. В норме лимфоидные фолликулы отсутствуют...

в селезёнке
в лимфатических узлах
+в костном мозгу
в пейеровых бляшках

34. Функции естественных клеток–киллеров (NK-лимфоциты) включают...

обеспечение Т-зависимой цитотоксичности
+обеспечение «спонтанной» цитотоксичности против клеток, несущих чужеродную генетическую информацию
обеспечение антителозависимого опосредованного клетками лимфолиза

35. Лимфопозз NK-лимфоцитов происходит...

+в костном мозгу
в пейеровых бляшках кишечника
в вилочковой железе
в лимфатических узлах

в селезёнке

36. Фагоцитарная активность не свойственна...

+лимфоцитам
макрофагам
нейтрофилам
эозинофилам

37. Профессиональными фагоцитирующими клетками являются...

Т-лимфоциты
В-лимфоциты
NK-лимфоциты
+моноциты/макрофаги

38. Поэз дендритных клеток происходит...

+в костном мозгу
в пейеровых бляшках кишечника
в вилочковой железе
в лимфатических узлах
в селезёнке

39. Ответственными за восстановление иммунной системы при пересадке костного мозга являются клетки...

В-лимфоциты
Т-лимфоциты
+кроветворные стволовые клетки

40. Функции, не свойственные для кроветворных стволовых клеток...

пролиферация
дифференцировка
миграция
рециркуляция
+фагоцитарная активность

41. Функции кроветворных стволовых клеток не контролируют...

тимус
Т-система иммунитета
В-система иммунитета
гипофиз-адреналовая система
+система комплемента
система мононуклеарных фагоцитов

42. Основные критерии, характеризующие субпопуляции клеток системы иммунитета...

+маркерные структуры клеточной поверхности
морфологические параметры
физические параметры (форма, размер, чувствительность к воздействиям холодом, теплом, радиацией и др.)
биохимические параметры (ферментативная активность и др.)

43. Молекулы МНС II класса необходимы для...

презентации эндоантигена
+презентации экзоантигена
фиксации иммуноглобулинов
фиксации комплемента

44. Антигены HLA отсутствуют на...

+ эритроцитах
лейкоцитах
эндотелии сосудов
ЦНС

45. В представлении антигена вовлечены...

MHC I и V классов
MHC II и VI классов
+MHC I и II классов
MHC III и IV классов

46. К неспецифическим факторам защиты организма относится...

система комплемента и фагоцитоза
интерферон и лимфокины
бактерицидные субстанций тканей, гидролитические ферменты
+всё перечисленное

47. К феноменам иммунной реактивности относятся...

антителогенез
гиперчувствительность немедленного типа
гиперчувствительность замедленного типа
иммунологическая толерантность
+всё перечисленное

48. Где происходят иммунные ответы?

в костном мозге
в центральной нервной системе
+во вторичных органах иммунной системы
в тимусе

49*. Физическими и анатомическими барьерами неспецифического иммунитета являются...

+кожа
+спинномозговая жидкость
слизистые оболочки
Т-клетки базального слоя кожи
всё вышеперечисленное.

50*. Растворимыми факторами неспецифического иммунитета являются...

Т- и В-клетки
+лизоцим
+комплемент
гормоны

51. Что из нижеперечисленного не подходит для врождённого иммунитета?

- отсутствие специфичности
- активация под воздействием стимулов
- вовлечение клеток многих типов
- +наличие иммунологической памяти

52*. Врождённый иммунитет характеризуется как...

иммунитет, обеспечивающий защиту организма только в ранний постнатальный период

- +составляющая часть полноценного иммунного ответа животного на протяжении жизни
- +основа специфического иммунного ответа

53*. Особенности врождённого иммунитета...

- +наследуется
- осуществляется только миелоидными клетками
- +осуществляется клетками миелоидного и лимфоидного ряда
- формирует клетки иммунологической памяти
- +функционирует вне зависимости от наличия антигена

54. В реализации реакций врожденного иммунитета участвуют...

- T-лимфоциты
- B-лимфоциты
- миелобласты
- +моноциты/макрофаги, нейтрофилы

55. Активация клеток врождённого иммунитета происходит при участии следующих рецепторов...

- +Толл-подобных
 - иммуноглобулиновых
 - TCR
- всё перечисленное верно

56. Толл-подобные рецепторы распознают...

- чужеродные антигены
- цитокины
- +группы молекул, свойственных патогенам
- иммунные комплексы

57. В активации клеток врождённого иммунитета не участвуют...

- рецепторы для маннозы
- рецепторы для уборки мусора
- NOD-рецепторы
- +антигенраспознающие рецепторы

58. Процессы экзоцитоза включают...

- пиноцитоз
- фагоцитоз
- +дегрануляцию тучных клеток
- МИТОЗ

59. Клетки системы мононуклеарных фагоцитов включают...

+моноциты, макрофаги
нейтрофилы, дендритные клетки
эозинофилы
базофилы

60. Основные функции макрофага...

поглощение и деструкция бактерий
деструкция клеток опухолей
секреция цитокинов, ферментов и др. молекул
реорганизация ткани и ранозаживление
+все ответы верны

61*. Гранулоциты, участвующие в процессах доиммунного воспаления, включают...

моноциты
+нейтрофилы
+эозинофилы
+базофилы
мегакариоциты

62. Бактерицидная активность фагоцитов не связана с...

активными формами кислорода
активными формами оксида азота
+компонентами комплемента
дефензинами

63. Особенности адаптивного иммунитета...

наследуется
осуществляется миелоидными клетками
+осуществляется лимфоидными клетками
функционирует вне зависимости от наличия антигена

64. В адаптивном иммунном ответе участвуют...

эритроциты
остеоциты
+лимфоциты
адипоциты

65. Центральными клетками адаптивного иммунитета являются...

+Т-лимфоциты
NK-лимфоциты
моноциты/макрофаги
нейтрофилы

66. Основными функциями специфического иммунного ответа являются...

+продукция антител
накопление IgE
пиноцитоз
фагоцитоз

67. Главные гены комплекса гистосовместимости обозначают...

Rh
DLA
+HLA
ABO

68. Где осуществляется процессинг экзогенных антигенов?

в цитозоле
в эндоплазматическом ретикулуме
+в эндосомах
на клеточной поверхности

69. Какой вариант антигенов загружается на HLA I?

+эндогенные антигены
гаптены
экзогенные антигены
аллергены

70. Что такое иммунологический синапс?

пространство между цитокином и его рецептором
пространство между адгезивными молекулами
место, где протекает процессинг
+контактная зона между TCR или BCR и комплексом антиген/HLA

71. Что такое 'двойное распознавание'?

распознавание адгезивных молекул
+одновременное распознавание антигена и HLA
распознавание HLA I и HLA II
распознавание специфических и неспецифических сигналов

72. Цитотоксические лимфоциты распознают антиген...

+ассоциированный с MHC I
ассоциированный с MHC II
ассоциированный с CD40
ассоциированный с BCR

73. Т-хелперы распознают антиген...

ассоциированный с MHC I
+ассоциированный с MHC II
ассоциированный с FcγR
ассоциированный с CD34

74. Как долго живут клетки памяти?

+ пожизненно
3 месяца
несколько лет
несколько дней

75. Сколько требуется специфических сигналов для начала иммунных ответов?

+ один
два

три
несколько

76. Какой цитокин является ключевым для пролиферации клеток в ходе иммунных ответов?

TNF β
IL10
+IL2
IL1

78. Какие клетки стимулируют Т-клеточный ответ?

тучные клетки
эозинофилы
+Th1
Th2

79. Какой вариант антигенов загружается на HLA I?

+ эндогенные антигены
гаптены
экзогенные антигены
аллергены

80. Какие эффекторныe лимфоциты направлены против внутриклеточно расположенных патогенов?

+ CD4 и Т-клетки
тимоциты
В-клетки
плазматические клетки

81. Как долго существуют долгоживущие плазматические клетки памяти?

пожизненно
несколько месяцев
10 лет
+ 1,5 лет

82. Что такое TCR?

+ Т-клеточный рецептор
Т-клеточная реакция
Т-клеточная реактивность
Т-клеточная резистентность

83. Где в преобладающем количестве находятся тельца Hassall?

+ в медуллярной зоне тимуса
в кортикальной зоне тимуса
в селезёнке
в лимфатических узлах

84. Двойные негативные тимоциты - это...

медуллярные клетки
кортикальные клетки
периферические клетки

+ субкапсулярные клетки

85. Какой из цитокинов секретируется Th2?

IL12

IFN γ

+IL4

IL2

86. Какой из цитокинов секретируется Th1?

+ IFN γ

IL13

TGF β

IL4

87. Из какого предшественника происходят макрофаги?

T-лимфоцит

эозинофил

нейтрофил

+ моноцит

88. Какая клетка является тканевым базофилом?

макрофаг

+ тучная клетка

дендритная клетка

эозинофил

89. Какой из органов является центральным?

лимфатический узел

аппендикс

+ костный мозг

селезёнка

90*. Что является результатом T-клеточного ответа?

образование плазматических клеток

+ образование цитотоксических CD8 T-клеток

+ образование эффекторных CD4 T-клеток

фагоцитоз

синтез иммуноглобулинов

91. Лимфопоэз T-лимфоцитов происходит...

+в костном мозгу

в пейеровых бляшках кишечника

в вилочковой железе

в лимфатических узлах

в селезёнке

92. Функции, не свойственные T-лимфоцитам...

эффекторы реакций против клеток, инфицированных внутриклеточными возбудителями

эффекторы реакций противоопухолевого иммунитета

+предшественники клеток-продуцентов антител

формируют клетки памяти

93. Th1 клетки обеспечивают защиту от...

внутриклеточных патогенов
патогенов, связанных с клетками слизистых оболочек
+внутриклеточных патогенов
гельминтов

94. Т-клеточный рецептор распознает...

свободный белок
свободный пептид
+пептид, связанный с молекулами главного комплекса гистосовместимости
углеводные молекулы

95. Клетки памяти отличаются от наивных клеток...

+специфичностью антигенраспознающих рецепторов
скоростью развития ответа
эффекторными функциями
увеличенным соотношением ядро/цитоплазма

96. Т-эффекторы не осуществляют реакции...

гиперчувствительности замедленного типа
+гиперчувствительности немедленного типа
контактной гиперчувствительности
трансплантационного иммунитета
противоопухолевого иммунитета
противовирусного иммунитета

97. Эффекторные функции Т-клеток не связаны с...

цитолитической активностью
+опсонизацией клеток
секрецией цитокинов
активацией макрофагов

98. Т-клетки-эффекторы проявляют активность...

спонтанно
+вследствие предварительного иммунного распознавания
при наличии специфических цитотоксических антител

99*. Основные функции Т-хелперов...

+обеспечивают развитие реакций клеточного иммунитета
+обеспечивают развитие реакций гуморального иммунитета
+обеспечивают процессы пролиферации и дифференцировки стволовых
клеток
ингибирует развитие реакций гуморального иммунитета

**100. Регуляторные и эффекторные функции осуществляют клетки
иммунной системы:**

покоящиеся
исключительно мигрирующие
+исключительно дифференцирующиеся

101. Какое из утверждений об эпитопах НЕВЕРНО?

эпитопы могут быть общими для двух разных антигенов

белковая молекула обычно имеет несколько эпитопов
+В-клетки связываются с эпитопами антигенов только после процессинга
эпитопы белков могут быть как линейными, так и в «свернутой» форме
некоторые эпитопы обладают большей иммуногенностью, некоторые –
меньшей

102. Какие клетки стимулируют Т-клеточный ответ?

тучные клетки
эозинофилы
+Тх1
Тх2

103. В-клеточный рецептор (BCR)...

служит для распознавания антигена В-лимфоцитом
служит для передачи костимуляторного сигнала
является трансмембранной формой IgG
активируется комплекментом

104. Пирогенная реакция при инфекционных заболеваниях является следствием действия...

ИЛ-18
ИЛ-2
ИЛ-4
+ИЛ-1

105. Какого рецептора нет на клеточной поверхности В-лимфоцита?

+TCR
рецептора для комплекмента
BCR
CD23

106. Разрушение клеток-мишеней при помощи перфорин-гранзимовых механизмов развивают...

+Т-лимфоциты
В-лимфоциты
моноциты/макрофаги
эозинофилы

107. К цитокинам не относятся...

интерфероны
интерлейкины
+ иммуноглобулины
колониестимулирующие факторы

108. Цитокины в организме...

содержатся в предсуществующей форме
накапливаются в гранулах различных клеток
+индуцируются для конкретного процесса
превращаются друг в друга

109. В реализации противобактериального иммунитета наибольшую роль играет...

гамма-интерферон
+фагоцитоз
естественные киллеры
ИЛ-4

110. Интерфероны как противовирусные факторы действуют...
только во внеклеточном пространстве
только в отношении РНК-содержащих вирусов
только в отношении ДНК-содержащих вирусов
+только на внутриклеточном уровне

111. К провоспалительным цитокинам относится...
+ИЛ-1
ИЛ-2
ИЛ-3
ИЛ-10

112. Ключевым цитокином Th1-клеток является...
ИЛ-4
ИЛ-10
+интерферон гамма
ИЛ-6

113. Ключевым цитокином Th2-клеток является...
ИЛ-1
ИЛ-2
+ИЛ-4
интерферон гамма

114. К супрессорным цитокинам относят...
ИЛ-1
ИЛ-3
ИЛ-7
+ИЛ-10

115. Мембраноатакующий комплекс образуют следующие компоненты комплемента...

С1-С3
С2-С4
С3-С7
+С6-С9

116. Альтернативный и лектиновый пути активации комплемента начинаются с...

+С3-компонента
С9-компонента
формирования мембраноатакующего комплекса
подавления ингибитора С1-компонента

117. Укажите неправильное обозначение путей активации комплемента...

классический

альтернативный
+цитокиновый
лектиновый

118. Система комплемента...

относится к интерлейкинам
+относится к белкам сыворотки крови, активирующимся каскадом реакций протеолиза
имеется только у человека
имеется у всех позвоночных

119. Функции компонентов системы комплемента...

компонент C1 запускает активацию по альтернативному пути
C3 участвует в патогенезе аллергических реакций замедленного типа
+компоненты C3a, и C5a относятся к анафилатоксинам
компоненты C3a, C4a и C5a относятся к опсонинам
компоненты C3b, iC3b и C4b относятся к анафилатоксинам

120. Мембраноатакующий комплекс включает компоненты комплемента...

C3bBb Б.
C3bBb3b В.
C4b2a Г.
C4b2a3b
+C5bC6C7C8C9

121. Мембраноатакующий комплекс формируется под влиянием компонента комплемента...

C3a
+C3b
C4b
C5a
C5b

122. Механизм активации системы комплемента по классическому пути связан...

+с комплексом антиген-антитело
с интерферонами
с ИЛ-2
с IgE

123. Механизм активации системы комплемента по лектиновому пути связан...

с участием комплекса антиген-антитело
+с активацией специфическими сахарами бактериальной мембраны
с активацией продуктами фагосом активированных фагоцитов
с активацией цитокинами естественных киллеров

124. Активация системы комплемента не вызывает...

гибель клетки
усиление хемотаксиса

дегрануляцию тучных клеток, базофилов
усиление развития воспаления
+ усиление персистенции инфекции

125. В активации системы комплемента по классическому пути принимает участие...

IgA
IgE
+IgG
IgD

126. Центральные органы иммунной системы...

+тимус, костный мозг
печень
лимфатические узлы
селезёнка
пейеровы бляшки подвздошной кишки 2

127*. Основная функция центральных органов лимфоидной системы...

+созревание и размножение иммунокомпетентных клеток-предшественников
+антигеннезависимое формирование Т- и В- систем иммунитета при взаимодействии с антигеном апоптопическая гибель незрелых лимфоцитов
всё перечисленное

128. К периферическим органам лимфоидной системы относятся...

миндалины
лимфатические узлы
селезёнка
пейеровы бляшки
+всё перечисленное верно

129. Т- лимфоциты происходят из...

+унипотентного предшественника Т-лимфоцитов костного мозга с последующим созреванием в тимусе колониеобразующей селезенки гранулоцитарно-макрофагального лимфоцитов лимфы
клеток селезенки
клеток тимуса

130. Основные субпопуляции Т-лимфоцитов...

+Т-помощники (хелперы), Т- цитотоксические (киллеры)
антиген-активированные Т-лимфоциты
естественные киллеры
тимоциты

131. В-лимфоциты человека происходят из...

унипотентных предшественников В-лимфоцитов лимфатических узлов
+унипотентных предшественников В-лимфоцитов костного мозга

унипотентных предшественников В-лимфоцитов костного мозга с последующим созреванием в тимусе

мультипотентных стволовых клеток с последующим созреванием в селезенке

132. Плазматические клетки происходят из...

+В-лимфоцитов

Т-лимфоцитов

макрофагов

фибробластов

всех перечисленных клеток

133. Плазматические клетки отличаются от В-лимфоцитов...

большой размер клетки с хорошо развитым цитоплазматическим ретикулумом, аппаратом Гольджи

большое количество Ig в цитоплазме клетки

способность при воздействии цитокинов переключать синтез IgM на Ig другого класса

+всё перечисленное верно

всё перечисленное неверно

134. Какая дифференцировка В-клеток происходит в костном мозге?

антиген-зависимая

+антиген-независимая

оба вида дифференцировки

дифференцировки В-клеток не происходит

в костном мозге происходит сначала антиген-независимая, а затем антиген-зависимая дифференцировка

135. В ходе иммунного ответа осуществляется кооперация между...

+макрофагами, Т- и В-лимфоцитами

макрофагами и В-лимфоцитами

макрофагами, тимоцитами и В-лимфоцитами

макрофагами и Т-лимфоцитами

Т-лимфоцитами, В-лимфоцитами и плазматическими клетками

136. Антиген-представляющая клетка есть...

нейрон

полиморфно-ядерный лейкоцит

эозинофильный лейкоцит

+клетка, имеющая на своей мембране белки второго класса главного комплекса тканевой совместимости (МНС-II)

137. Цитокины – это...

белки, выделяемые покоящимися лейкоцитами

+универсальные регуляторы жизненного цикла клеток, контролирующие процессы их дифференцировки, пролиферации, функциональной активности и апоптоза.

белки, относящиеся к разряду антител, выделяемые активированными лимфоцитами

низкомолекулярные белки, выделяемые активированными лимфоцитами и макрофагами, являющиеся медиаторами воспаления и иммунного ответа

все ответы правильные

138. Основные цитокины, участвующие в воспалительных процессах...

фактор некроза опухоли

интерлейкин-1

интерлейкин-6

интерфероны альфа и гамма

интерлейкин-8 и другие хемокины

+все перечисленные

139. К системным эффектам противоспалительных цитокинов относят...

повышение температуры тела

скопление нейтрофилов и макрофагов в очаге поражения

лейкоцитоз

увеличение синтеза белков острой фазы

активация процессов свертывания крови

+всё перечисленное

140. К клеткам-эффекторам неспецифической иммунной защиты относят всё, исключая...

нейтрофилы

+Т-лимфоциты

макрофаги

НК-клетки

141. К факторам гуморальной неспецифической иммунной защиты относят всё, исключая...

+антитела

интерфероны

белки острой фазы

лизоцимы

системы комплементов

142. К фагоцитам относят...

В-лимфоциты

+нейтрофилы, макрофаги

естественные киллеры

Т-лимфоциты

тромбоциты

143. К тканевым макрофагам относят всё, исключая...

купферовские клетки

+базофилы и тучные клетки

клетки Лангерганса

альвеолярные макрофаги
остеокласты
клетки микроглии

144. В уничтожении внеклеточно паразитирующих инфекционных агентов участвуют...

моноциты/макрофаги
нейтрофилы
естественные киллеры
эозинофилы
+все перечисленные клетки

145. Циркулирующие иммунные комплексы – это...

+комплекс антиген-антитело
аллерген-IgE
комплекс антиген-антитело-комплемент
агрегированные IgG
всё перечисленное

146. К неспецифическим иммунологическим реакциям относится всё, кроме...

активации системы комплемента
+продукции антител
продукции интерферона
активации NK-клеток

147. Гуморальные факторы антигеннеспецифической иммунной защиты организма...

белки системы комплемента
острофазовые белки
лизоцим
интерфероны
+всё перечисленное

148. Клеточные факторы антигеннеспецифической иммунной защиты всё, исключая...

натуральные киллеры
+плазматические клетки
нейтрофилы
моноциты
тканевые макрофаги

149. Естественные (натуральные) киллеры выполняют важную биологическую роль...

в иммунологическом надзоре, направленном против первично возникающих опухолевых клеток
в разрушении вирус-инфицированных клеток
в отторжении чужеродных трансплантатов
+всё перечисленное верно

150. Функции клеток фагоцитарной системы...

защита организма от чужеродных микроорганизмов путем киллинга (убийства) и переваривание их

роль клеток-«мусорщиков», убивающих и разрушающих собственные клетки организма – повреждённые, дефектные, старые

+секреция биологически активных веществ, регулирующих образование других иммунокомпетентных клеток; презентация чужеродного антигена Т-лимфоцитам

всё перечисленное верно

151. Основные фазы фагоцитоза...

направленное движение фагоцита к объекту фагоцитоза (положительный хемотаксис)

прикрепление к объекту (адгезия), захват объекта, образование фagosомы
слияние фagosомы с лизосомами и образование фаголизосомы, убийство (киллинг) живого объекта

переваривание и обработка антигена для представления другим иммунокомпетентным клеткам

+всё перечисленное

152. Показатели активности фагоцитоза...

процент фагоцитирующих нейтрофилов (процент фагоцитоза)

среднее число поглощенных микробов (фагоцитарное число)

абсолютный фагоцитарный показатель (АФП) – количество микробов, которое могут поглотить фагоциты 1 литра крови

определение индекса завершенности фагоцитоза (ИЗФ)

+всё перечисленное

153. Дефекты фагоцитоза наблюдаются при...

нейтропениях

нарушении поглощающей и переваривающей способности фагоцитов

нарушении хемотаксиса

дефиците миелопероксидазы

+всё перечисленное верно

154. Иммуноглобулины продуцируются...

лейкоцитами

лимфоцитами

макрофагами

+плазматическими клетками

гистиоцитами

155. Иммуноглобулины определяются везде, кроме...

в плазме крови

в секреторных жидкостях организма

на поверхности В-лимфоцитов

+на поверхности Т-лимфоцитов

156. Молекулы иммуноглобулинов состоят из...

двух полипептидных лёгких цепей -L

двух полипептидных тяжёлых цепей -H

+из двух цепей тяжёлых -H и двух лёгких -L
в разных соотношениях пяти H- и L- цепей
одной полипептидной лёгкой цепи -L и двух полипептидных тяжёлых цепей -H

157. В секретах различных желез и слизи желудочно-кишечного тракта в норме преобладают следующие иммуноглобулины...

IgG
IgD
IgM
+секреторные IgA
IgE

158. В крови у взрослых животных иммуноглобулины содержатся в следующей убывающей последовательности...

IgM > IgG > IgD > IgA
IgA > IgG > IgD > IgM > IgE
+IgG > IgA > IgM > IgD > IgE
IgG > IgA > IgE > IgM > IgD
IgA > IgG > IgM > IgE > IgD

159. IgM антитела...

проявляют антибактериальные свойства
связывают комплемент
участвуют в первичном иммунном ответе
+ всё перечисленное верно

160. IgG антитела...

связывают комплемент
проникают через плаценту
связываются с фагоцитирующими клетками
+ всё перечисленное верно

161. IgA антитела...

обеспечивают иммунный ответ в дыхательной и пищеварительной системах

обладают антибактериальными и противовирусными свойствами
образуют димерные молекулы
образуют комплексы с секреторным фрагментом
+ всё перечисленное верно

162. Часто встречающиеся инфекции при дефектах фагоцитоза...

+бактериальные
вирусные
паразитарные
+грибковые

163. Для системы комплемента характерно следующее...

комплемент состоит более чем из 20 иммунологически различных белков
компоненты комплемента синтезируются в печени
классическая активация обеспечивается комплексом антиген-антитело

активный комплемент способен лизировать вирусы и бактерии
+ всё перечисленное верно

164. Какая дифференцировка В-клеток происходит в периферических лимфоидных органах...

+ антигензависимая
антигеннезависимая
антигензависимая и антигеннезависимая
дифференцировка клеток не происходит

165. К антигенпрезентирующим клеткам не относятся...

моноциты
макрофаги
дендритные клетки
Т-лимфоциты
+ В-лимфоциты

166. Антибактериальная активность макрофагов зависит от...

слияния лизосом с фагосомами
продукции супероксидных радикалов
продукции NO (оксида азота)
+ всего перечисленного

167. Комплемент вовлечен в следующие процессы, кроме...

привлечения нейтрофилов в очаг воспаления
увеличения концентрации сывороточных белков в очаге воспаления
лизис бактерии в отсутствие специфических антител
опсонизация микроорганизмов
+ сенсibilизация Т-лимфоцитов к антигену

168. Система комплемента...

активируется связыванием со специфическими рецепторами комплемента
специфичен по отношению к антигену
способствует внедрению вируса внутрь клетки
набор внутриклеточных белков, способствующих элиминации эндогенных антигенов

+ состоит из белков, активируемых по каскадному механизму

169. Роль C5b при активации по классическому пути...

активация конвертазной активности C5
привлечение нейтрофилов для уничтожения микроорганизма
+ инициация формирования мембраноатакующего комплекса
полимеризация с формированием трансмембранного канала
всё вышеперечисленное верно

170. Адьюванты...

уменьшают токсичность иммуногена
увеличивают иммуногенность гаптенов
улучшают гемопоэз
+ улучшают иммунный ответ против иммуногена
увеличивают кросс-реактивность антигенов

171. Превращение токсина в анатоксин...

делает токсин более иммуногенным
+уменьшает фармакологическую активность токсина
улучшает связывание с антитоксином
индуцирует только врожденный иммунитет
улучшает фагоцитоз

172. Иммуногены, используемые в клинической практике...

+столбнячный анатоксин
+гриппозная вакцина
туберкулин
всё вышеперечисленное не верно

173. Следующие свойства способствуют иммуногенности вещества...

большая молекулярная масса
сложность химического строения
достаточная стабильность и персистирование после инъекции
всё вышеперечисленное
+ всё вышеперечисленное необходимо, но недостаточно

174. Что из нижеперечисленного не подходит для врождённого иммунитета?

отсутствие специфичности
активация под воздействием стимулов
вовлечение клеток многих типов
+наличие иммунологической памяти

175. НК-клетки также известны под именем...

макрофаги
дендритные клетки
+нулевые клетки
Т-клетки

176. На своей мембране экспрессируют антитела...

+В-клетки
дендритные клетки
нулевые клетки
Т-клетки

177. Какой из иммуноглобулинов связан с развитием аллергической реакции?

IgA
+IgE
IgM
IgG
IgF

178. Какие из иммуноглобулинов способны активировать систему комплемента?

IgA
IgE

+IgG
IgD

179. Какие из иммуноглобулинов являются рецепторами на поверхности В-клеток?

IgA
IgE
+IgM,
+IgD
IgG

180. В сравнении с вторичным иммунным ответом, первичный...
+имеет продолжительный лаг-период
нуждается в меньшей концентрации антигена
в основном, является IgG-опосредованным
характеризуется более высокой аффинностью антител к антигенам
характеризуется более высокой авидностью антител к антигенам

181. Белковая фракция сыворотки, содержащая антитела...
 α -глобулины
 β -глобулины
+ γ -глобулины
тромбоциты

182. Специфические антитела определяются в сыворотке после первичного контакта с антигеном спустя...

10 минут
1 час
+5...7 дней
3...5 недель
только после вторичного контакта с антигеном

183. Внутриутробная инфекция может быть диагностирована на основании повышенного уровня антиген-специфического...

+IgG
IgM
IgA
IgD
IgE

184. Выберите утверждение, характеризующее изотипы иммуноглобулинов...

это варианты тяжёлых цепей, кодируемые аллельными генами
константные участки лёгких цепей, кодируемые аллельными генами
+набор антигенных детерминант иммуноглобулинов одного класса, идентичный у всех особей данного вида
это совокупность эпитопов гипервариабельного участка, распознаваемая антиидиотипическими антителами.
ни один из перечисленных вариантов не подходит

185. Секретируемый IgA...

не содержит H-цепи.
не содержит секреторного компонента
+является димером
не способен соединяться с вирусными частицами
инициирует классический путь активации комплемента.

186. Что не является характеристикой IgG?

содержит две тяжёлых и две лёгких цепи
пересекает плацентарный барьер
количественно преобладает в крови, лимфе и перитонеальной жидкости
+является наибольшим из всех Ig
L-цепи состоят из κ- либо λ-цепей.

187. В базовую структуру иммуноглобулина входят...

две тяжёлые цепи
одна лёгкая цепь
шарнирный участок
+всё вышеперечисленное

188. Основными функциями антител являются...

опсонизация
нейтрализация
активация комплемента
+взаимодействуют с различными антигенами.

189*. Моноклональные антитела используются для...

+диагностических исследований
терапевтических процедур
+серологических исследований
всего вышеперечисленного

190. Какое из утверждений справедливо для антител IgG?

могут нейтрализовать антигены
могут активировать комплемент
являются опсонинами
+всё вышеперечисленное

191. Специфичность отдельной B-клетки...

+индуцируется взаимодействием с антигеном
определяется последовательностью L-цепи
определяется последовательностью вариабельных участков H- и L-цепей
меняется после переключения классов
определяется константным участком тяжёлой цепи

192. B-клетки памяти отличаются от наивных B-клеток...

профилем экспрессии мембранных иммуноглобулинов
плотностью мембранных рецепторов к компонентам комплемента
продолжительностью жизни
аффинностью рецепторов к антигенам
+всё вышеперечисленное верно

193. Иммунотоксины – это...

+цитотоксические агенты, получаемые связыванием антитела с токсином вещества, оказывающие избирательное токсическое действие на лимфоциты

белки острой фазы, синтезируемые в ходе иммунного воспаления
циркулирующие иммунные комплексы

194. Абзимы – это...

антитела, конъюгированные с ферментом

+антитела, обладающие собственной ферментативной активностью

ферменты, продуцируемые антителами

антитела, активирующиеся при протеолитическом расщеплении

195*. Клеточные элементы, участвующие в представлении антигена Т-лимфоцитам...

+дендритные клетки

плазматические клетки

+макрофаги

тромбоциты

тучные клетки

196*. Полипотентные гемопоэтические стволовые клетки присутствуют в...

+периферической крови

+костном мозге

тимусе

+пуповинной крови

лимфатических узлах

197*. Для развития специфического иммунного ответа В-лимфоциты получают помощь от...

+фолликулярных дендритных клеток

базофилов

+Т-лимфоцитов

гепатоцитов

эритроцитов

198. Антитела класса IgE вырабатывают...

базофилы

+ плазматические клетки

Т-лимфоциты

тимоциты

тучные клетки

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

Основная литература

1. Азаев, М.Ш. Теоретическая и практическая иммунология [Электронный ресурс] : учебное пособие / М.Ш. Азаев, О.П. Колесникова, В.Н. Кисленко [и др.]. — Электрон. дан. — СПб. : Лань, 2015. — 314 с. — Режим доступа: http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1_id=60033 — Загл. с экрана.
2. Колычев, Н.М., Госманов, Р.Г. Ветеринарная микробиология и иммунология: Учебник для вузов / Н.М. Колычев, Р.Г. Госманов. — 3-е изд. перераб. и доп. — М : КолосС, 2003, 2006. — 432 с. ил.
3. Кисленко, В.Н., Колычев, Н.М. : Ветеринарная микробиология и иммунология: учебник. Ч. 2 Иммунология / В.Н. Кисленко, Н.М. Колычев. М : КолосС, 2007. — 224 с. : ил.
4. Кисленко, В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология. Практикум. : учеб. пособие для вузов + CD / В.Н. Кисленко. — СПб. : Лань, 2012. — 368 с. : ил.
5. Манько, В.М. Ветеринарная иммунология. Фундаментальные основы : учебник для вузов / В.М. Манько, Д.А. Девришов. — М : Агровет, 2011. — 752 с.
6. Руководство по микробиологии и иммунологии [Текст] : учеб. пособие для вузов / Колычев Н.М. ; Кисленко В.Н., ред. — Новосибирск : АРТА, 2010. — 256 с. : ил.
7. Кисленко, В.Н. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии [Электронный ресурс] : учеб. пособие для вузов / В.Н. Кисленко. — М : КолосС, 2005. — 1 электрон. опт. диск: цв.— Приложение к книге. — М.
8. Госманов, Р.Г. Практикум по ветеринарной микробиологии и микологии [Текст] : Учебное пособие / Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев, А.А. Барсков — СПб.: Лань, 2014. — 384с.
9. Магер, С.Н. Физиология иммунной системы [Электронный ресурс] : учебное пособие / С.Н. Магер, Е.С. Дементьева. — Электрон. дан. — СПб. : Лань, 2014. — 192 с. — Режим доступа: http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1_id=51937 — Загл. с экрана.

Дополнительная литература

10. Основы инфекционной иммунологии [Текст] : Учеб. пособие для вузов / Макаров В. [и др.]. — Владимир-М. : Фолиант, 2000. — 176 с. : табл., рис.
11. Аллергология и иммунология + CD. Национальное руководство. / ред. Р.М. Хайтова, Н.И. Ильиной. — М.: ГЭОТАР – Медиа, 2009.— 659 с.

12. Иммунология : Учебник для вузов / Воронин Е.С., ред. – М : Колос-Пресс, 2002. – 408 с.
13. Лебедев К.А. Иммунология образраспознающих рецепторов (интегральная иммунология)/ К.А. Лебедев, И.Д. Понякина.– М.: КД Либроком, 2009. – 253 с.
14. Ковальчук, Л.В. Антигенные маркеры клеток иммунной системы человека. CD (Cluster Differentiation) система. /Л.В. Ковальчук. – М.: РГМУ, 2003. – 76 с.
15. Галактионов, В.Г. Механизмы иммунитета в графической форме./ В.Г. Галактионов – М.: топ-книга, 2000. – 288 с.
16. . Ройт, А. Иммунология / А. Ройт, Д. Бростофф, Д. Мейл. – М.: Мир, 2000. – 592 с., : ил.
17. Пальцев, М.А. Межклеточные взаимодействия. / М.А. Пальцев, А.А. Иванов, С.А. Северин. – М.: Медицина, 2003. – 287 с.
18. Сапин, М.Р. Иммунная система, стресс и иммунодефицит./ М.Р. Сапин, Д.Б. Никитюк – М.: АПП «Джангар», 2000. – 184 с.
19. Чайкин, В.Ф. Руководство по клинической вакцинологии / В.Ф. Чайкин., О.В. Шамшева – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2006. – 592 с.
20. Шахов, В.П. Стволовые клетки и кардиомиогенез в норме и патологии / В.П. Шахов, С.В. Попов – Томск: STT, 2004. – 170 с.
21. Галактионов, В.Г. Эволюционная иммунология / В.Г. Галактионов. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. – 408 с.
22. Койко, Р. Иммунология: учебное пособие / Р. Койко, Дж. Саншайн., Э. Бенджамини. – М.: Академия ИЦ, 2008. – 368 с.
23. Плейфайер, Дж.Х.Л. Наглядная иммунология: учебное пособие для ВУЗов / Дж.Х.Л. Плейфайер. – М.: Геотар Медиа, 2008.– 120 с.
24. Хаитов, Р.М. Физиология иммунной системы./ Р.М. Хаитов. – М.: ВИНТИ РАН, 2005. – 428 с.
25. Хаитов, Р.М. Иммунология : учебник / Р.М. Хаитов.- М.: Геотар-Медиа, 2009. – 521 с.
26. Ветеринария: научно-производственный журнал / учредитель Министерство сельского хозяйства РФ; Автономная некоммерческая организация «Редакция журнала «Ветеринария». – Ежемес.
27. http://www.oie.int/eng/norms/mmanual/a_summry/htm
28. <http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/00062eea/htm>
29. <http://www.rsl.ru/>
30. <http://molbiol/edu.ru/index.html>
31. <http://www.alius.ru/rdl>
32. Научная электронная библиотека <http://www.eLibrary.ru>