

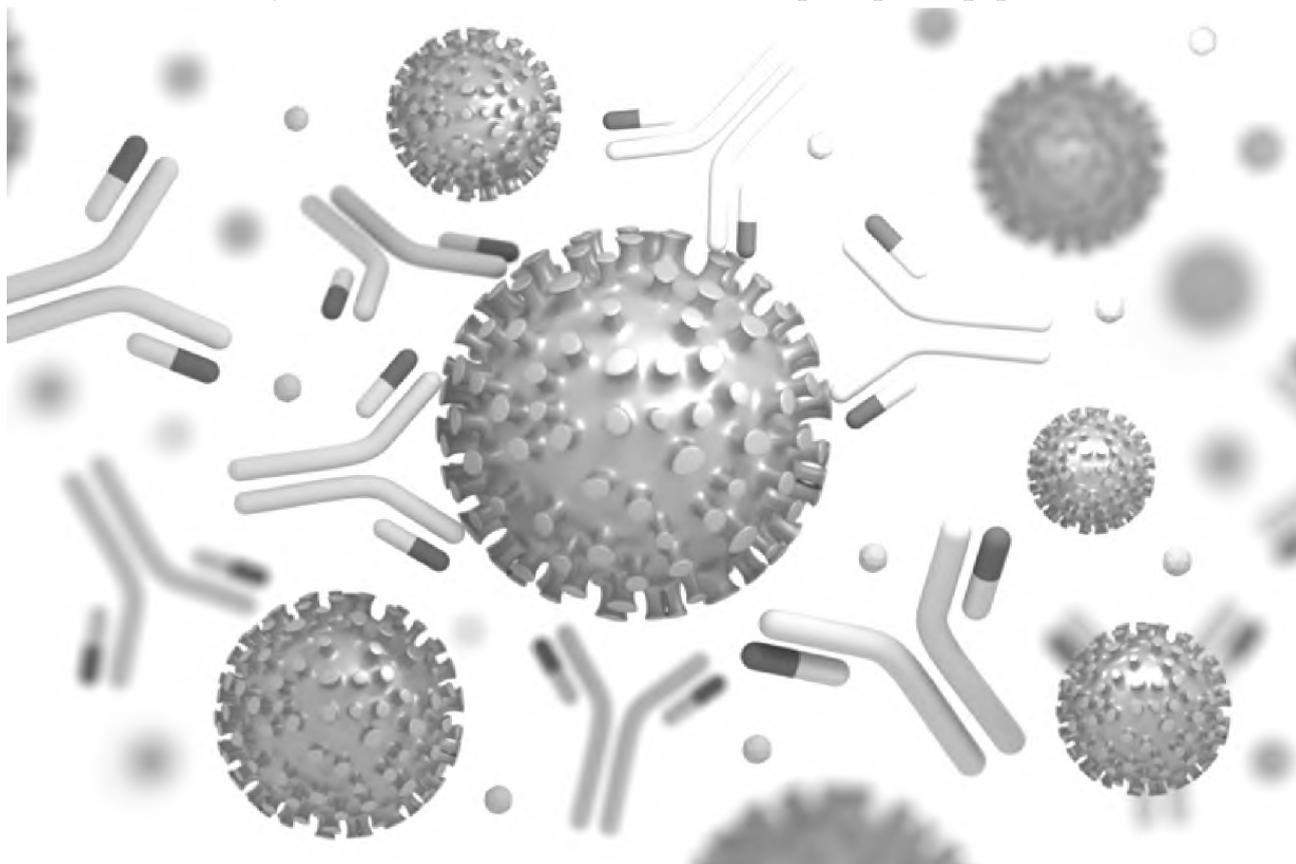
МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ВИТЕБСКАЯ ОРДЕНА «ЗНАК ПОЧЕТА» ГОСУДАРСТВЕННАЯ
АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Кафедра микробиологии и вирусологии

БИОТЕХНОЛОГИЯ. ВЕТЕРИНАРНАЯ ИММУНОБИОТЕХНОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие
для студентов по специальности «Ветеринарная фармация»



Витебск
ВГАВМ
2023

УДК 573.6.086.83:619
ББК 28.07
Б63

Рекомендовано к изданию методической комиссией биотехнологического факультета УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» от 24 января 2023 г. (протокол № 2)

Авторы:

магистр ветеринарных наук, старший преподаватель *А. Г. Кошнеров*; доктор ветеринарных наук, профессор *И. А. Красочко*; кандидат ветеринарных наук, доцент *Р. Б. Корочкин*; кандидат ветеринарных наук, доцент *Ю. А. Столярова*; кандидат ветеринарных наук, доцент *О. С. Мехова*; кандидат ветеринарных наук, доцент *Е. А. Курпанёва*

Рецензенты:

кандидат ветеринарных наук, доцент *М. А. Макарук*;
кандидат ветеринарных наук, доцент *В. В. Петров*

Биотехнология. Ветеринарная иммунобиотехнология :
Б63 учеб.-метод. пособие для студентов по специальности «Ветеринарная фармация» / А. Г. Кошнеров [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2023. – 92 с.

Пособие написано в соответствии с программой дисциплины «Биотехнология». В пособии рассматриваются вопросы о врожденном и приобретенном иммунитете и факторы, их определяющие; основные составляющие и пути функционирования иммунной системы; производство средств для активной и пассивной иммунизации; современные подходы к конструированию вакцин и др.

Пособие предназначено для студентов по специальности 1-74 03 05 (6-05-0841-02) «Ветеринарная фармация», а также может быть использовано в качестве дополнительной литературы для студентов по специальности 1-74 03 02 (7-07-0841-01) «Ветеринарная медицина», магистрантов, аспирантов.

УДК 573.6.086.83:619
ББК 28.07

© УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2023

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОСНОВНЫЕ СОСТАВЛЯЮЩИЕ И ПУТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ	7
1.1. Понятие об иммунитете	7
1.2. Иммунная система млекопитающих и птиц	9
1.3. Понятие об антигенах	16
1.4. Неспецифические (конститутивные) факторы защиты	19
1.5. Специфические (индуцибельные) факторы защиты	22
1.6. Механизм иммунного ответа	34
1.7. Особенности противоинфекционного иммунитета	37
2. ПРОИЗВОДСТВО БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ АКТИВНОЙ ИММУНИЗАЦИИ	40
2.1. Исторические аспекты вакцинопрофилактики	40
2.2. Понятие о вакцинах	43
2.3. Классификация вакцин	49
2.4. Особенности технологии производства живых вакцин	51
2.5. Особенности технологии производства рекомбинантных векторных вакцин	54
2.6. Особенности технологии производства инактивированных вакцин	55
2.7. Современные подходы к конструированию вакцин	64
2.8. Этапы разработки и тестирования вакцин	78
3. ПРОИЗВОДСТВО БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПАССИВНОЙ ИММУНИЗАЦИИ	80
3.1. Особенности производства гипериммунных сывороток	80
3.2. Особенности промышленного получения глобулиновых препаратов	89
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	91

ВВЕДЕНИЕ

Современная биотехнология занимает ведущее положение в системе биологических, медицинских и ветеринарных наук и представляет собой современную прогрессивную форму промышленной технологии, основу которой составляют биологические объекты – человек, животные, растения, микроорганизмы, клетки и вирусы.

Иммунобиотехнология – это раздел современной биотехнологии, представленной как научными достижениями, так и динамично развивающимся технологическим производством диагностических, профилактических и лекарственных средств с применением в качестве действующего начала разных агентов и процессов иммунной системы.

Научной основой иммунобиотехнологии является иммунология, которая изучает механизмы функционирования иммунной системы и использование полученных данных для диагностики, профилактики и лечения патологий, связанных с функционированием этой системы инфекций, аутоиммунных процессов, аллергий и т.д.

Обеспечение эффективной защиты животных от инфекционных болезней было и остается одной из главных задач ветеринарной науки и практики.

Эпизоотическое благополучие среди продуктивных и домашних животных во многом зависит от иммунопрофилактики инфекционных болезней.

Под **иммунизацией** понимают возникновение специфического иммунного ответа со стороны иммунной системы организма против возбудителя инфекции у конкретного индивидуума, а также возникновение устойчивости у отдельной группы животных к инфекционным заболеваниям путем формирования популяционного иммунитета.

Несмотря на значимые результаты борьбы с инфекциями, цивилизация и изменение условий жизни человека и животных способствуют появлению новых, ранее не регистрируемых заболеваний, вызываемых новыми или генетически модифицированными в естественных условиях патогенными микроорганизмами. Вместо снижения количества инфекций в XX веке выявлено 36 новых инфекционных болезней животных и человека: цирковирусная инфекция свиней, вирусы синдрома снижения яйценоскости кур, инфекционного бурсита кур (болезнь Гамборо) и другие новые инфекции, появившиеся в последнее время и широко циркулирующие практически во всех хозяйствах промышленного типа.

Наряду с появлением новых болезней значимую реальную угрозу человечеству несут возбудители традиционных особо опасных инфекций, которые в свое время развития цивилизации приносили опустошения. К этой группе относятся возбудители оспы, чумы, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, сапа и многих других микроорганизмов I и II групп патогенности, возбудители особо опасных инфекций, нередко не поддающихся лечению у людей и животных, с высокой летальностью и контагиозностью, распространяющихся и передаю-

щихся от животных к людям. Сохраняя естественные механизмы распространения, эти болезни представляют серьезную угрозу здоровью и жизни животных и людей.

В результате действия техногенных факторов на окружающую природную среду и повсеместного применения антибактериальных и дезинфицирующих средств, а также консервантов характер взаимодействия микроорганизмов с организмом хозяина качественно изменился.

Перспективные направления при лечении инфекционных болезней основываются на знании патогенеза. Любые изменения в условиях обитания микроорганизмов как внутри организма человека или животных, так и в природной среде приводят к их быстрой эволюционной адаптации. Срочное решение вопросов борьбы с инфекционными болезнями имеет большое значение для обеспечения биологической безопасности.

После открытий Луи Пастера стало возможным производство и применение иммунобиологических препаратов. Лишь немногие события в истории науки оказали такое же глубокое влияние на жизнь человека и общества, как открытие возможности контролировать инфекции, вызываемые микроорганизмами. В промышленно развитых странах прекратились многие опустошительные эпидемии, которые в прошлом уносили миллионы жизней. Все это стало возможным только при комплексном решении вопросов биологической безопасности, ключевым звеном которой является производство и применение иммунобиологических препаратов для диагностики инфекционных болезней.

Производство иммунопрепаратов отличается повышенными требованиями в отношении обеспечения качества выпускаемой продукции и безопасности работы с патогенными биологическими агентами.

В середине XX века, с увеличением потребности в иммунобиологических препаратах, для их производства стали возникать специализированные промышленные биотехнологические предприятия. Природно-ресурсный подход, просуществовавший в СССР вплоть до 80-х гг. XX века, не мог осуществляться на предприятиях, работавших с возбудителями инфекционных заболеваний. Поэтому часть экологических вопросов, касающихся биологической безопасности производства, даже при строительстве первых биологических предприятий решалась лишь на стадии проектирования. В то же время методы получения биопрепаратов первого поколения, применяемые штаммы-продуценты были низко эффективными, в связи с чем до середины XX века увеличение объемов выпуска продукции происходило за счет прямого масштабирования процессов производства. Соответственно возрастала энергоемкость, расход сырья, количество балластных веществ, а также возрастала возможность биологического загрязнения окружающей среды.

Научные достижения второй половины XX века коренным образом изменили технологические процессы изготовления биопрепаратов. В производство были включены высокопродуктивные штаммы, современные методы культивирования клеток и вирусов, фракционирования биомолекул, позволяющие получать принципиально новую продукцию, безопасные и эффективные вакцины, значительные количества очищенных антигенов и антител. Параллельно повы-

сились требования к биологической безопасности производства. В настоящее время как живые, так и инактивированные вакцины производятся только с использованием живых биологических объектов (эмбрионов), свободных от патогенной флоры. Стерилизация препаратов не предусматривает применения химических консервантов (фенолов, мертиолятов и др.), а основана на использовании мембранных фильтров с фиксированным размером пор, заменивших крупногабаритные глубинные асбестосодержащие фильтры. Современное производство биопрепаратов всегда тонировано, и работа с биоматериалом осуществляется в помещениях, оснащенных системой подачи и фильтрации воздуха фильтрами HEPA, обеспечивающими стерильность воздуха как в рабочей зоне, так и на выходе в атмосферу.

Повышение наукоемкости производства позволяет осуществлять перепрофилирование биопредприятий в научно-производственные структуры. За счет внедрения высокоэффективных штаммов бактерий и клонов клеток появляется возможность снижать производственные затраты, энергоемкость и расход материалов, в результате чего в сотни раз возрастает эффективность биотехнологических процессов, минимизируется нагрузка на окружающую среду. При отсутствии финансовых ресурсов на осуществление масштабных инвестиций в экологическую реструктуризацию промышленности подобный подход на сегодня является единственно возможным в решении вопросов охраны окружающей среды.

Промышленную революцию XXI века связывают с развитием нанотехнологий – применением молекулярных структур в наноскопических устройствах.

Последние достижения биологии в области изучения структуры белков (протеомики) и нуклеиновых кислот определили появление нового прикладного направления – нанобиотехнологии.

Большие надежды возлагаются на решение методами нанотехнологии проблемы эффективной доставки лекарственных средств к пораженным клеткам организма, высокие темпы развития предсказывают методам молекулярной ДНК-терапии.

Накопленный современной иммунобиотехнологией материал в области фундаментально ориентированных научных исследований микробиологии, вирусологии, иммунологии, генетической инженерии, направленного синтеза биологически активных веществ, широкого мониторинга распространения патогенов в окружающей среде имеет приоритетное научное значение.

1. ОСНОВНЫЕ СОСТАВЛЯЮЩИЕ И ПУТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

1.1. Понятие об иммунитете

Иммунитет (от лат. *immunitas* – освобождение, избавление) – сложный комплекс физиологических приспособлений, которые обеспечивают защиту организма от генетически чужеродных веществ экзогенного и эндогенного происхождения с целью сохранения и поддержания гомеостаза, структурной и функциональной целостности организма, а также биологической индивидуальности и видовых различий.

В зависимости от происхождения иммунитет подразделяется на врожденный (наследственный) и приобретенный (адаптивный).

Врожденный (наследственный) иммунитет вырабатывается в процессе длительной эволюции как универсальный механизм защиты против разнообразных микроорганизмов и чужеродных агентов внешней среды и передается по наследству (лошади не болеют ящуром, крупный рогатый скот – сапом). Этот вид иммунитета свойственен животным определенного вида к определенному возбудителю инфекции и передается из поколения в поколение.

В основе механизмов врожденного иммунитета к определенным возбудителям лежит отсутствие в клетках организма рецепторов и субстратов, необходимых для адгезии и размножения возбудителя, наличие веществ, блокирующих размножение патогенных микроорганизмов.

Врожденный иммунитет может быть:

- видовой (присущий определенному виду животных);
- породный (присущий определенной породе животных в пределах вида);
- индивидуальный (характерный для отдельных особей).

Иммунитет называют *относительным*, если возможно его нарушение при определенных условиях (при переохлаждении куры заболевают сибирской язвой), и *абсолютным*, если заболевание не удается вызвать любыми неблагоприятными условиями или введением больших количеств культуры патогенного микроорганизма.

Приобретенный (адаптивный) иммунитет возникает в течение жизни. Он бывает естественным и искусственным, каждый из которых может быть активным и пассивным.

Естественно приобретенный активный иммунитет появляется в результате контакта с возбудителем (после перенесенного заболевания или после скрытого контакта без проявления симптомов болезни); может сохраняться 1–2 года, в некоторых случаях – пожизненно (например, у переболевших чумой собак, у переболевших оспой овец).

Естественно приобретенный пассивный иммунитет возникает в результате передачи от матери к плоду через плаценту (трансплацентарный) либо после рождения через кишечник с молозивом (колостральный или молозивный), а у птиц материнские антитела передаются с лецитиновой фракцией желтка (трансовариальный); может сохраняться от нескольких недель до нескольких месяцев.

Искусственно приобретенный активный иммунитет индуцируется после введения в организм вакцин, содержащих микроорганизмы или их субстанции – антигены (поствакцинальный иммунитет); создает невосприимчивость через 10-14 дней и продолжается в зависимости от качества вакцины и индивидуальных особенностей организма от нескольких месяцев до нескольких лет и на всю жизнь.

Искусственно приобретенный пассивный иммунитет возникает в организме при введении гипериммунных сывороток или сывороток реконвалесцентов, иммуноглобулинов; в зависимости от путей введения возникает через несколько часов (самое позднее – спустя 1 сутки) и продолжается в течение 2-3 недель (пассивная иммунизация применяется главным образом с лечебной целью).

В зависимости от природы антигенов, вызывающих иммунный ответ, различают противоиnфекционный и неинфекционный иммунитет.

Противоиnфекционный иммунитет – совокупность реакций системы иммунитета, направленных на удаление инфекционного агента – возбудителя заболевания. В зависимости от вида инфекционного агента различают:

- антибактериальный иммунитет (при стерильном иммунитете микроорганизмы из организма удаляются, а иммунитет сохраняется; при нестерильном иммунитете для его поддержания необходимо присутствие в организме небольшого количества микроорганизмов (туберкулез, бруцеллез, сифилис));
- анитоксический иммунитет;
- противовирусный иммунитет;
- противогрибковый иммунитет;
- противопаразитарный иммунитет.

Неинфекционный иммунитет – совокупность реакций системы иммунитета, направленных на неинфекционные биологически активные агенты – антигены. В зависимости от природы этих антигенов различают:

- аутоиммунитет (на собственные антитела, белки, липопротеиды, гликопротеиды);
- трансплатационный (при пересадке органов и тканей, переливании крови);
- противоопухолевый (на антигены опухолевых клеток);
- репродуктивный (в системе «мать-плод» на антигены плода, т.к. он отличается по ним за счет генов, полученных от отца).

В зависимости от реагирующих систем различают местный и общий иммунитет.

В *местном иммунитете* участвуют неспецифические факторы защиты, а также секреторные иммуноглобулины, которые находятся на слизистых оболочках кишечника, бронхов, носовой полости и т.д.

В работе *общего иммунитета* принимают участие как неспецифические, так и специфические факторы защиты.

В зависимости от механизмов защиты организма различают гуморальный и клеточный иммунитет.

Гуморальный иммунитет обуславливается выработкой в зараженном организме специфических антител.

Клеточный иммунитет обуславливается непосредственно лимфоцитами или их растворимыми продуктами, осуществляющими лизис клеток, содержащих чужеродные антигены.

1.2. Иммунная система млекопитающих и птиц

Иммунная система – это совокупность клеток, органов и тканей, деятельность которых обеспечивает сохранение генетического (антигенного) постоянства внутренней среды организма (иммунного гомеостаза).

В иммунной системе млекопитающих и птиц различают центральные и периферические органы.

В *центральных органах* происходит формирование и созревание иммунокомпетентных клеток, в *периферических* – их функционирование.

К **центральным органам иммунитета** млекопитающих относят костный мозг и тимус, а у птиц – костный мозг, тимус и фабрициева сумка (бурса).

К **периферическим органам иммунитета** млекопитающих относят лимфатические узлы, селезенку, лимфоидную ткань пищеварительного тракта (миндалины, пейеровы бляшки, солитарные фолликулы), органов дыхания, кровь, лимфу, систему мононуклеарных фагоцитов (макрофаги) и микрофагов (нейтрофилы и эозинофилы), нейроглию центральной нервной системы и кожу (клетки эпидермиса кожи вырабатывают вещество, напоминающее гормон тимуса – тимопоэтин, который оказывает действие на функционирование Т-лимфоцитов, попадающих в кожу), а у птиц – селезенку, железу Гардера, слезную железу, лимфоидный дивертикул (дивертикул Меккеля), лимфоидные бляшки слепой кишки, лимфоидные образования в стенках лимфатических сосудов, лимфоидную ткань легких и кожи, кровь, лимфу, систему мононуклеарных фагоцитов (макрофаги) и микрофагов (псевдозозинофилы и эозинофилы).

Дифференцировка и взаимодействие клеток системы иммунитета между собой, а также с клетками других систем организма осуществляется с помощью регуляторных молекул – *цитокинов*, которые представляют собой продуцируемые клетками белково-пептидные факторы, осуществляющие короткодистантную регуляцию межклеточных и межсистемных взаимодействий.

Цитокины, выделяемые преимущественно клетками системы иммунитета (макрофагами, Т- и В-лимфоцитами, базофилами, эндотелием, стромальными клетками костного мозга), получили название *интерлейкинов (ИЛ)* – факторов межлейкоцитарного взаимодействия.

Клетки иммунной системы

В функциональном отношении клетки иммунной системы разделяют на 2 различные категории:

- 1) регуляторные клетки (Т-лимфоциты и макрофаги);
- 2) эффекторные клетки:
 - лимфоциты (Т- и В-лимфоциты, естественные киллеры);
 - микрофаги (у млекопитающих – нейтрофилы и эозинофилы, у птиц – псевдоэозинофилы и эозинофилы);
 - макрофаги (моноциты периферической крови, купферовские клетки печени, альвеолярные макрофаги легких, остеокласты костной ткани, клетки Лангерганса кожи и др. клетки).

Все клетки крови (рисунок 1), в т. ч. лимфоциты, возникают из единой гемопоэтической стволовой клетки (ГСК), которая находится у эмбрионов в костном мозге и печени, а у взрослых – только в костном мозге.

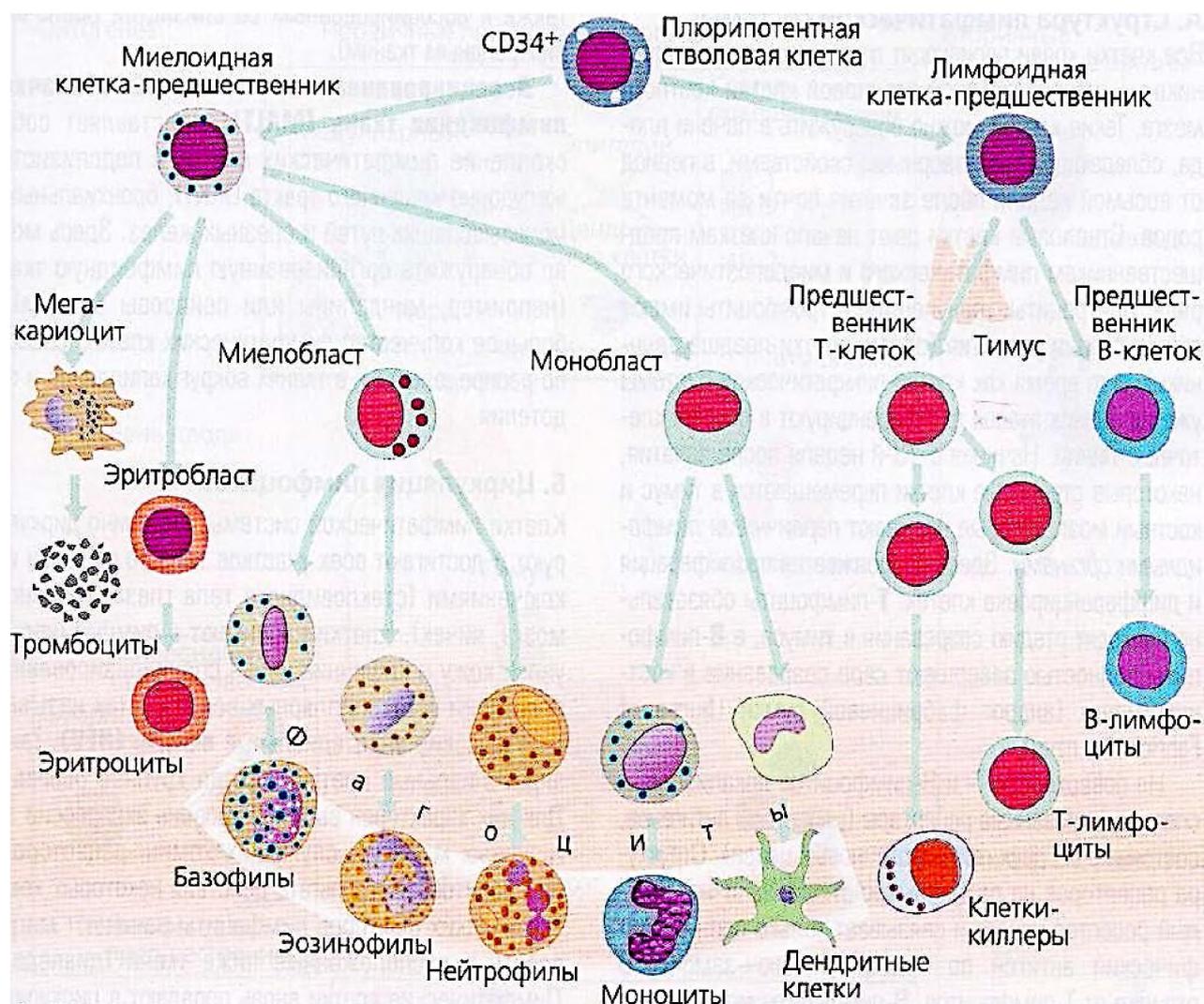


Рисунок 1 – Клетки иммунной системы
[<https://docplayer.com>]

Т-лимфоциты обуславливают клеточный иммунный ответ, а также помогают отвечать на антиген В-лимфоцитам при гуморальном иммунном ответе. Каждый Т-лимфоцит несет на своей поверхности рецептор строго одной специфичности, т.е. взаимодействующий с одним антигеном.

Образующиеся из кроветворной стволовой клетки предшественники Т-лимфоцитов мигрируют в тимус, где происходит антигеннезависимая дифференцировка Т-клеток, они дифференцируются в иммунокомпетентные клетки и приобретают способность к распознаванию антигена. Из тимуса Т-клетки мигрируют в лимфоузлы, где заселяют преимущественно Т-зависимую паракортикальную зону.

Антигензависимая дифференцировка происходит в периферических органах иммунной системы только при контакте Т-лимфоцита с антигеном.

Среди Т-клеток выделяют 3 основные популяции:

- **Т-киллеры**, или *цитотоксические Т-лимфоциты* уничтожают инфицированные и поврежденные клетки;
- **Т-хелперы** усиливают адаптивный и приобретенный иммунные ответы. Т-хелперы лишены цитотоксической активности, они не уничтожают ни клетки патогена, ни зараженные клетки. Активированный Т-хелпер высвобождает цитокины, воздействующие на клетки многих типов. Цитокиновые сигналы Т-хелперов усиливают бактерицидные свойства макрофагов и активность Т-киллеров;
- **регуляторные Т-клетки** (ранее назывались супрессорные Т-клетки) подавляют функционирование и пролиферацию эффекторных Т-клеток, предотвращая развитие аутоиммунных заболеваний.

В-лимфоциты имеют на поверхности связанные с мембраной иммуноглобулиновые рецепторы, которые распознают конкретные антигены и взаимодействуют с другими иммунокомпетентными клетками, а также рецепторы к различным медиаторам и гормонам. В-лимфоциты под действием антигенов способны трансформироваться в антителообразующие клетки, которые продуцируют иммуноглобулины всех классов.

Предшественники В-клеток в ходе антигеннезависимой дифференцировки стволовых клеток в костном мозге у млекопитающих и фабрициевой сумке у птиц превращаются в В-лимфоциты, которые затем мигрируют в периферические лимфоидные органы (селезенку, лимфатические узлы, лимфоидные пакеты кишечника), где и выполняют свои специфические функции.

Естественные киллеры (*НК-клетки, натуральные киллеры*) представляют собой особую субпопуляцию лимфоцитов, лишенных характерных для Т- и В-клеток поверхностных CD-маркеров, а также антигенраспознающих рецепторов. Они дифференцируются из общей лимфоидной клетки-предшественника и способны спонтанно (т.е. без предварительной иммунизации) убивать некоторые опухолевые, а также инфицированные вирусами клетки.

В циркулирующей крови нормальные киллеры составляют около 15% всех мононуклеарных клеток, а в тканях локализованы в печени (большинство), красной пульпе селезенки, слизистых оболочках (особенно репродуктивных органов). Большинство НК-клеток содержит в цитоплазме азурофильные

гранулы, где депонированы цитотоксические белки перфорин, гранзимы и гранулизин.

Главными функциями НК-клеток являются распознавание и элиминация клеток, инфицированных микроорганизмами, измененных в результате злокачественного роста либо опсонизированных антителами класса G, а также синтез цитокинов.

Нейтрофилы (*нейтрофильные сегментоядерные лейкоциты, или нейтрофильные гранулоциты*) – преобладающая популяция лейкоцитов, на поверхности которых присутствуют рецепторы для бактериальных липополисахаридов, рецепторы для хемокинов и интерлейкинов.

Основная функция нейтрофилов – фагоцитоз и участие в воспалительных реакциях. Нейтрофильные гранулоциты первыми приходят в очаг воспаления (обнаруживаются там уже через 30-60 минут).

Нейтрофилы обладают хемотаксисом, высокой подвижностью и фагоцитарной активностью. В их цитоплазме содержатся нейтральные гранулы, представляющие разновидность лизосом, которые содержат различные ферменты и бактерицидные вещества, с помощью которых разрушается антиген.

Эозинофилы по сравнению с нейтрофилами менее подвижны, обладают меньшей фагоцитарной активностью, в их цитоплазме содержатся различные типы гранул.

На поверхности зрелых эозинофилов находятся низкоаффинные рецепторы для иммуноглобулинов класса E, которые нужны для привлечения эозинофилов в очаг поражения, рецептор для компонентов комплемента и специфический маркер, по наличию которого эти клетки при необходимости можно отличать от нейтрофилов.

Эозинофилам свойственна слабая фагоцитарная активность. При активации в них образуются и затем секретируются разнообразные бактерицидные вещества – производные «кислородного взрыва»: активные формы кислорода, перекиси, производные оксида азота, цианидов и галогенов.

Функция эозинофилов в норме заключается в регуляции развития тучных клеток и морфогенетических процессов, связанных с беременностью и половым циклом у самок. Роль эозинофилов в иммунной защите в первую очередь состоит в осуществлении внеклеточного цитолиза, которому принадлежит основная роль в защите от многоклеточных паразитов. Основные белки эозинофилов способствуют развитию аллергических реакций (через активацию тучных клеток и базофилов) и оказывают регулирующее действие на иммунные процессы (действуя на Т-клетки).

Базофилы представляют собой самую малочисленную группу гранулоцитов (0,2-0,5% от общего числа лейкоцитов). Это сильно гранулированные клетки, имеющие окрашивающиеся основными красителями гранулы с различным содержанием.

Развитие базофилов происходит по общей для всех гранулоцитов схеме, но в период окончательного созревания они приобретают специфические поверхностные молекулы, позволяющие им, в отличие от других клеток, связывать иммуноглобулины класса E. Именно с их наличием связывают уникальную

способность базофилов и происходящих от них тучных клеток выбрасывать содержимое своих гранул при воздействии на эти клетки антигенов, комплементарным закрепленным на их поверхности иммуноглобулинам, и тем самым выступать в качестве основных эффекторов гиперчувствительности немедленного типа. В случаях же первичного проникновения чужеродных агентов во внутреннюю среду организма именно базофилы и тучные клетки определяют развитие воспаления как защитной реакции.

Преобразование базофилов в тучные клетки происходит вследствие проникновения первых через стенки капилляров как во вторичных лимфоидных органах (например, в селезенке), так и в контактирующем с окружающей средой эпителии и подстилающих его слоях (слизистые оболочки пищеварительного, дыхательного и мочеполового трактов) или же в дерме. Значительное количество тучных клеток постоянно находится в серозных оболочках внутренних органов и в окружающей капилляры соединительной ткани. Переход из кровотока в тканевую жидкость сказывается как на морфологических, так и на физиологических свойствах клеток.

Тучные клетки, по сравнению с базофилами, имеют большие размеры, в них увеличивается количество гранул, а их поверхность приобретает ворсинчатое строение. Кроме того, тучные клетки приобретают способность восстанавливать гранулы после дегрануляции и в отличие от базофилов способны к делению.

Главной чертой тучных клеток, наряду с базофилами и эозинофилами, является наличие на плазмолемме высокоафинного рецептора к иммуноглобулину класса E. На поверхности тучных клеток имеются молекулы для распознавания пептидогликана клеточной стенки бактерий, липополисахаридов, вирусных РНК и бактериальных ДНК, а также присутствуют молекулы главного комплекса гистосовместимости обоих классов.

Цитокины и хемокины, выделяемые тучными клетками, участвуют в воспалении и аллергических реакциях, вызывают повреждение тканей и влияют на их восстановление в завершающую фазу воспаления, участвуют в регуляции гемопоэза и лимфопоэза, реакциях врожденного и адаптивного иммунитета.

Несмотря на то, что базофилы и их производные обладают фагоцитарной активностью, роль их как фагоцитирующих клеток считается незначительной.

Макрофаги – это гетерогенная клеточная популяция (моноциты периферической крови, купферовские клетки печени, альвеолярные макрофаги легких, остеокласты костной ткани, клетки Лангерганса кожи и др. клетки).

Макрофаги имеют неправильную, звездчатую, многоотростчатую форму, складки и микроворсинки на поверхности клеток, обилие эндоцитозных микровезикул, первичных и вторичных лизосом. Структурные особенности клеток во многом зависят от их органной и тканевой принадлежности, а также от функционального статуса.

Макрофаги выполняют следующие функции:

- фагоцитируют чужеродный материал и клеточно-тканевый детрит (благодаря фагоцитозу они участвуют в удалении из организма иммунных комплексов и клеток, подвергшихся апоптозу);

- процессируют антиген, а затем презентуют его пептиды Т-хелперам, поддерживая осуществление иммунного ответа;
- выполняют секреторную функцию, состоящую в синтезе и выделении ферментов (кислые гидролазы и нейтральные протеиназы), компонентов комплемента, ингибиторов ферментов, компонентов межклеточного матрикса, биологически активных липидов (простагландинов и лейкотриенов), эндогенных пирогенов, цитокинов;
- принимают участие в регуляции иммунного ответа (моноциты крови и тканевые макрофаги синтезируют ряд факторов, влияющих на дифференцировку, пролиферацию и функциональную активность других участников иммунного ответа – определенных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов);
- оказывают цитотоксическое влияние на клетки-мишени при условии фиксации на них антител и соответствующей стимуляции со стороны Т-лимфоцитов (реакции антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности);
- изменяют метаболизм при воспалении;
- принимают участие в асептическом воспалении и разрушении инородных частиц;
- участвуют в процессах репарации и заживления ран (секретируют несколько ростовых факторов, стимулирующих ангиогенез, и индуцируют формирование грануляционной ткани и реэпитализацию).

Главный комплекс гистосовместимости (ГКГ, МНС) – большая группа генов, которые кодируют белки, отвечающие за распознавание чужеродных объектов в организме и представление (презентацию) антигенов Т-лимфоцитам при иммунном ответе.

Главный комплекс гистосовместимости есть у всех позвоночных и появился 450 миллионов лет назад вместе с челюстноротыми рыбами. Вместе с ГКГ у них возникли иммуноглобулины (антитела) и Т-клеточные рецепторы, которые распознают чужеродные вещества.

Название «комплекс гистосовместимости» группа генов получила во время исследования чужеродных тканей. При несовпадении органов и тканей наблюдается отторжение трансплантата, что говорит о несовместимости генов.

Впервые ГКГ описали в середине XX века. Георг Снелл исследовал мышей и обнаружил, что у них в 17-й хромосоме есть область генов, которые кодируют белки и определяют, насколько органы и ткани совместимы при пересадке. Если у донора и реципиента разные ГКГ, то пересаженная кожа не приживется.

Проведенные в 1996 г. исследования показали, что Т-клетки иммунной системы определяют структуру вируса и сравнивают с ГКГ молекулы организма. Но клетку, зараженную вирусом, лимфоцит не узнает. Т-лимфоциты находят чужеродный объект (антиген) по маленькой цепочке органических молекул – пептиду, который получается при расщеплении вирусного белка.

Конечные продукты генов ГКГ представлены гликопротеинами, которые встраиваются в мембрану клеток. Гликопротеины ГКГ класса I присутствуют в клеточных мембранах практически всех ядродержащих клеток, а гликопротеины класса II – только в антигенпрезентирующих клетках (дендритные клетки, макрофаги, В-лимфоциты, некоторые активированные клетки).

В процессе образования гликопротеинов ГКГ класса I в их состав встраиваются образующиеся в ходе протеолиза фрагменты внутриклеточных белков, а в случае класса II – белков межклеточного пространства, поглощаемых клеткой (среди них могут оказаться компоненты патогенных микроорганизмов). В составе гликопротеинов ГКГ они выносятся на поверхность клетки и распознаются Т-лимфоцитами. Этот процесс называется презентацией антигена: чужеродные антигенные пептиды в составе гликопротеинов ГКГ класса I представляются цитотоксическим Т-клеткам, а в составе гликопротеинов ГКГ класса II – Т-хелперам.

Продукты различных аллельных форм генов ГКГ отличаются по сродству к различным пептидам. От того, какие аллели генов ГКГ присутствуют в данном организме, зависит эффективность защиты от того или иного патогена. Она определяется связыванием чужеродных пептидов с гликопротеинами ГКГ класса II, т. к. их презентация Т-хелперам лежит в основе всех форм иммунного ответа. В связи с этим гены ГКГ класса II рассматриваются в качестве генов иммунного ответа.

Молекулы ГКГ класса I используют *эндогенный путь антигенной презентации*. Когда клеточный белок маркируется для разрушения, он отправляется в протеосому, которая присутствует во всех ядродержащих клетках. Протеосома разрушает белок на короткие пептидные цепи, которые затем транспортируются в эндоплазматическую сеть, через белки ТАП (транспортеры антигенных пептидов). Одновременно с этим молекула ГКГ класса I образуется также внутри эндоплазматической сети. ТАП-белки загружают короткие пептидные цепи в пептидную канавку молекулы ГКГ класса I, используя процессорную молекулу *тапазин*.

Затем ГКГ класса I и пептид выходят из эндоплазматической сети через аппарат Гольджи, попадает в везикулу и подвергается экзоцитозу. Циркулирующие цитотоксические Т-клетки, а также натуральные киллеры, способные непосредственно уничтожать клетки-мишени, могут взаимодействовать с молекулой ГКГ класса I и антигеном. Если никакого распознавания не происходит, то клетка живет, но если эти иммунные клетки распознают пептид, который представлен как чужеродный, то клетка подвергается атаке.

Молекулы ГКГ класса II предназначены для презентации антигенов снаружи клеток (*экзогенный путь антигенной презентации*). Клетки с этими молекулами на поверхности поглощают и разрушают патогены, а затем представляют антигены CD4+ клеткам и Т-хелперам.

Экзогенный путь начинается, когда патоген или белок захватывается антигенпредставляющей клеткой и переносится в вакуоль, которая называется эндосомой. Гранулы внутри фагоцита сливаются с эндосомой, образуя фагосому или фаголизому. Эти гранулы наполнены протеолитическими и разрушаю-

щими ферментами, которые разрушают патоген или белок на много мелких пептидов.

В это время молекула ГКГ класса II синтезируется в эндоплазматической сети с другими белками, включая ГКГ класса I.

Вместо того чтобы получать свой пептид из эндоплазматической сети, как молекула ГКГ класса I, связующая бороздка молекулы ГКГ класса II временно заполняется молекулой, которая называется инвариантной цепью. Затем молекула ГКГ класса II и инвариантная цепь транспортируются через клетку в пузырьке, где инвариантная цепь разрушается. После этого пузырек с молекулой ГКГ класса II сливается с фаголизосомой и пептидная щель заполняется одним из пептидов фаголизосомы. Этот пузырек содержит молекулу ГКГ класса II, которая связана с пептидным антигеном, и он транспортируется к поверхности клетки, где он может быть представлен циркулирующим Т-хелперам, которые могут продолжить стимулировать иммунный ответ.

1.3. Понятие об антигенах

Антигены – вещества экзогенной или эндогенной природы, несущие признаки генетически чужеродной информации, которые, оказавшись во внутренних средах организма, способны вызывать изменение иммунологической реактивности.

Антигенами для организма могут быть:

- собственные клетки с измененным геномом и образуемые ими молекулы;
- клетки другого животного, растительного организма и синтезируемые ими вещества;
- микроорганизмы, продукты их метаболизма или распада, а также синтетические органические молекулы.

Основными свойствами антигенов являются:

- *чужеродность* – свойство, определяющее дальность генетического родства (чем больше выражено генетическое родство между животными, тем хуже проявляются антигенные свойства их веществ: белки бычьей сыворотки крови не антигенны для крупного рогатого скота, слабо антигенны для мелкого рогатого скота и обладают выраженными антигенными свойствами для лошадей, кроликов, птиц и других животных);
- *антигенность* – мера антигенного качества, определяющая способность вызывать образование антител. Антигенность зависит от природы, молекулярной организации (чем более сложную пространственную структуру имеет биомолекула, тем выше ее антигенные свойства) и степени родства генетически чужеродных веществ. Лучшими антигенными свойствами обладают вещества с большей молекулярной массой и белковой природы (например, глобулины сыво-

ротки крови животных). Одно и то же вещество может быть высокоактивным для одних видов животных и вовсе не антигенным для других;

- *иммуногенность* – свойство, определяющее способность антигена создавать иммунитет (возбудитель дизентерии обладает высокой антигенностью, но выраженного иммунитета против дизентерии (шигеллы) получить не удастся);
- *специфичность* – особенность строения веществ, по которой антигены отличаются друг от друга. Она определяется антигенной детерминантой или эпитопом (небольшим участком молекулы антигена, который и соединяется только с комплементарными ему антителами или рецепторами Т-лимфоцитов). Число таких участков (группировок) у каждого антигена различно и определяет число молекул антител, с которыми может соединяться антитело (валентность). От числа детерминант зависит валентность антигена.

Полноценные антигены – вещества, которые вызывают иммунные реакции и взаимодействуют с их продуктами (белки и их комплексные соединения (гликопротеиды, липопротеиды, нуклеопротеиды), а также полисахариды); они обычно поливалентны – на 1 молекуле высокомолекулярного антигена может быть 10-20 и более эпитопов.

Неполноценные антигены (гаптены) – вещества, которые в обычных условиях не вызывают иммунную реакцию (углеводы, липиды, стероиды, лекарственные препараты и большинство химических веществ, нуклеиновые кислоты), но способны запускать иммунный ответ после связывания с белками организма, а также с белками на поверхности клеток (эритроцитов, лейкоцитов), в результате чего образуются антитела, способные взаимодействовать с гаптеном. При повторном попадании в организм гаптена возникает вторичный иммунный ответ, нередко в виде повышенной аллергической реакции. Гаптены являются моновалентными антигенами.

Конъюгированные антигены – антигены, полученные путем присоединения к молекуле белка группы, обеспечивающей новую иммунологическую специфичность.

По физическому состоянию антигены подразделяются на **корпускулярные** (бактерии, эритроциты) и **растворимые** (молекулярно-дисперсные).

Существуют 2 основных вида антигенов: экзогенные и эндогенные (аутологичные).

Экзогенные антигены попадают в организм из внешней среды:

- к *инфекционным антигенам* относятся антигены бактерий, вирусов, грибов, простейших.
- к *неинфекционным антигенам* относят антигены растений, лекарственные препараты, химические, природные и синтетические вещества, антигены животных и человека.

Эндогенные антигены:

- *аутогенные антигены (аутоантигены)* – это структурно неизменяемые антигены собственного организма, синтезируемые в организме в физиологических условиях. В норме аутоантигены неиммуногенны вследствие сформировавшейся иммунологической толерантности (невосприимчивости) либо их недоступности для контакта с факторами иммунитета – это так называемые забарьерные антигены. При срыве толерантности или нарушении целостности биологических барьеров (воспаление, травма) компоненты иммунной системы начинают специфически реагировать на аутоантигены выработкой специфических факторов иммунитета (аутоантитела, клон аутореактивных лимфоцитов);
- *неоантигены* возникают в организме в результате генетических мутаций или модификаций и всегда чужеродны.

К бактериальным антигенам относятся:

- *группоспецифические* (встречаются у разных видов одного рода или семейства);
- *видоспецифические* (у различных представителей одного вида);
- *типоспецифические* (определяют серологические варианты – серовары, антигеновары внутри одного вида).

В зависимости от локализации в бактериальной клетке различают соматические, жгутиковые и капсульные антигены:

- *соматические O-антигены* связаны с клеточной стенкой бактерии, имеют липополисахаридную природу, термостабильны (выдерживают кипячение в течение 1-2 ч), химически устойчивы (выдерживают обработку формалином и этанолом); являются эндотоксином (оказывают токсическое действие на клетки организма) и пирогеном (индуцируют лихорадку);
- *жгутиковые H-антигены* входят в состав бактериальных жгутиков, в основе их белок флаггелин, термолабильны, имеются у всех подвижных бактерий;
- *капсульные K-антигены* находятся в капсуле и связаны с поверхностным слоем липополисахарида клеточной стенки, содержат кислые полисахариды (в состав которых входят галактуронозная, глюкуронозная и идуронозная кислоты).

Антигенами бактерий являются также их токсины и ферменты.

У бактерий различают также *протективные антигены*, представляющие собой совокупность антигенных детерминант (эпитопов), которые вызывают наиболее сильный иммунный ответ, что предохраняет организм от повторной инфекции данным возбудителем.

1.4. Неспецифические (конститутивные) факторы защиты

Под *неспецифическими факторами защиты* понимают врожденные внутренние механизмы поддержания генетического постоянства организма, обладающие широким диапазоном противомикробного действия, которые выступают в качестве первого защитного барьера на пути внедрения инфекционного агента.

Отличительными чертами конститутивных (врожденных) защитных механизмов являются их постоянное присутствие в организме вне зависимости от действия дестабилизирующих факторов и отсутствие выраженной специфичности, т. е. сходность проявления при действии различных факторов. Такого рода защитные механизмы способны одновременно защищать организм от целого ряда факторов практически сразу после рождения.

К конститутивным защитным барьерам традиционно относят непроницаемость покровов, лизоцим, гидролитические ферменты и соляную кислоту желудочно-кишечного тракта, интерферон, воспаление, фагоцитоз, систему комплемента и другие присутствующие в крови гуморальные факторы конститутивной защиты.

Кожа является не только механическим барьером для различных антигенов. Выделения ее потовых и сальных желез содержат уксусную, муравьиную, молочную и жирные кислоты, которые обладают бактерицидными свойствами.

Механическую роль выполняет *слизь* и *реснитчатый эпителий* верхних дыхательных путей, освобождающие слизистые оболочки от попавших на них частичек. Отторжение эпителия, кашель, чихание способствуют удалению пылевидных частиц различной природы, в том числе и микроорганизмов.

В верхнем отделе пищеварительного тракта роль защитного секрета играет выделяемая слизистой оболочкой и специализированными железами *слюна*, которая помимо пищеварительных ферментов содержит также и лизоцим.

Выделяемые клетками слизистой оболочки желудка *пищеварительные ферменты* и *соляная кислота* также обладают выраженным бактерицидным действием, а в просвете тонкого кишечника к защитному эффекту выделяемых здесь ферментов присоединяется бактерицидный эффект компонентов желчи.

Нормальная микробиота кишечника является антагонистом по отношению ко многим патогенным и гнилостным микроорганизмам.

В случае проникновения микроорганизмов через кожу, слизистые оболочки в подлежащие ткани развивается *воспаление*. В местной воспалительной реакции выделяют следующие стадии:

- расширение кровеносных сосудов и выход через их стенки зернистых лейкоцитов – нейтрофилов (микрофаги) и незернистых лейкоцитов – моноцитов и др. (макрофаги);
- образование лейкоцитарного вала вокруг патогена;
- активное развитие микро- и макрофагальной реакции.

C-реактивный белок – белок острой фазы воспаления. При участии ионов Ca^{2+} он неспецифично связывается с микроорганизмами и активирует систему

комплемента по классическому пути (если у микроорганизмов есть фосфорил-холин).

Кроме воспалительной реакции происходит образование *отека*, т. е. выпот плазмы из кровеносных сосудов. В отечной жидкости находятся гуморальные факторы неспецифической защиты: нормальные антитела, лизоцим, комплемент, пропердин, лизины, лактоферрин, интерферон, ингибиторы сыворотки крови.

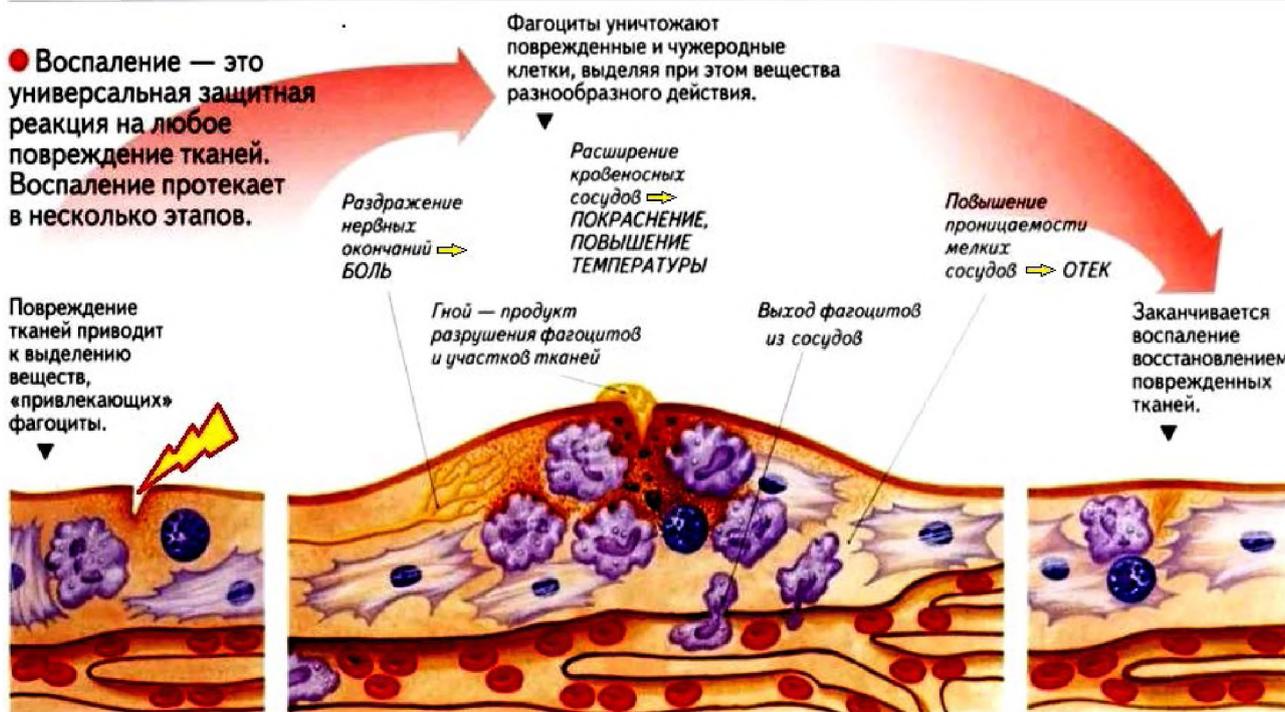


Рисунок 2 – Воспаление при неспецифическом иммунитете
[<https://avatars.mds.yandex.net>]

В крови здоровых людей и животных обнаруживают *нормальные (естественные) антитела*, которые вступают в реакцию со многими антигенами в низких титрах 1:10–1:40. Эти антитела возникают в результате естественной иммунизации организма многими антигенами.

Лизоцим – это гидролитический фермент мурамидаза, синтезируемый макрофагами, нейтрофилами и другими фагоцитирующими клетками и постоянно поступающий в жидкости и ткани организма. Фермент содержится в крови, лимфе, слезах, молоке, сперме, урогенитальном тракте, на слизистых оболочках дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, в мозге. Отсутствует лизоцим лишь только в спинномозговой жидкости и передней камере глаза. Механизм действия лизоцима сводится к разрушению гликопротеидов (мурамилдипептида) клеточной стенки бактерий, что ведет к их лизису и способствует фагоцитозу поврежденных клеток. Следовательно, лизоцим обладает бактерицидным и бактериостатическим действием. Кроме того, он активизирует фагоцитоз и образование антител.

Комплемент представляет собой сложную систему белков, включающую около 30 различных белков сыворотки крови. В крови система комплемента циркулирует в виде инертных предшественников. Действуя на микроорганизмы

как литический фактор, комплемент повышает бактерицидную активность сыворотки крови, усиливает фагоцитоз, способен лизировать клетки особо чувствительных бактерий (вибрионы, сальмонеллы, эшерихии), а также тканевые клетки (гемолиз эритроцитов), участвует в иммунологических реакциях.

Интерферон – это группа белковых веществ, принимающих участие в регуляции различных механизмов иммунного ответа. Индукторами образования интерферона являются вирусы, бактерии, токсины, митогены и др.

Интерфероны образуют автономную группу цитокинов. Общее свойство интерферонов – наличие у них противовирусной активности. В то же время, подобно другим цитокинам, они участвуют в регуляции иммунных процессов. Сочетание этих свойств делает интерфероны важными факторами врожденного иммунитета и служит основанием для широкого применения интерферонов в качестве лечебных препаратов.

Лизины – белки сыворотки крови, обладающие способностью лизировать некоторые бактерии, эритроциты.

Белок **лактоферрин** входит в состав секрета желез – слюнных, слезных, молочных; дыхательного, пищеварительного, мочеполового трактов. Защищает от микроорганизмов эпителиальные покровы. Лактоферрин считают фактором местного иммунитета.

Ингибиторы сыворотки крови – противовирусные вещества белковой природы, находятся в сыворотке крови, секретах дыхательного и пищеварительного тракта, в экстрактах органов и тканей, подавляют активность вирусов вне клетки.

При преодолении антигенами кожного и слизистого барьера защитную функцию начинают выполнять **лимфоузлы**. В них происходит механическая задержка микроорганизмов и фагоцитоз макрофагами.

Фагоцитоз – это процесс переваривания, инактивации инородных для организма веществ специализированными клетками – фагоцитами, функциональными элементами которых являются лизосомы, содержащие различные ферменты и вещества, обеспечивающие разрушение антигенов.

Механизм фагоцитоза в некоторых деталях может различаться у различных групп фагоцитов, но обычно включает следующие стадии (рисунок 3):

- активация и хемотаксис – целенаправленное движение клетки к объекту фагоцитоза в сторону повышающейся концентрации хемоаттрактантов, роль которых играют хемокины, компоненты комплемента и микробной клетки, продукты деградации тканей организма;
- адгезия (прикрепление) частиц к поверхности фагоцита, важную роль при которой играют рецепторы комплемента, и *Fc*-фрагменту иммуноглобулина;
- поглощение частиц, их погружение в цитоплазму и образование вакуоли (фагосомы);
- внутриклеточный киллинг и переваривание. После поглощения частицы фагосомы сливаются с лизосомами – образуется фаголизосома, в которой бактерии гибнут под действием бактерицидных продуктов гранул (кислороднезависимая система бактерицидности).

Одновременно в клетке усиливается потребление кислорода и глюкозы – развивается так называемый кислородный (окислительный) взрыв, что приводит к образованию токсичных метаболитов кислорода и азота, обладающих высокой бактерицидностью (кислородзависимая система бактерицидности).

Макрофаги и нейтрофилы, активированные продуктами микроорганизмов, начинают продуцировать цитокины и другие биологически активные медиаторы, инициирующие воспалительные реакции в очаге проникновения чужеродных агентов, подготавливая возможность развития адаптивного иммунного ответа.

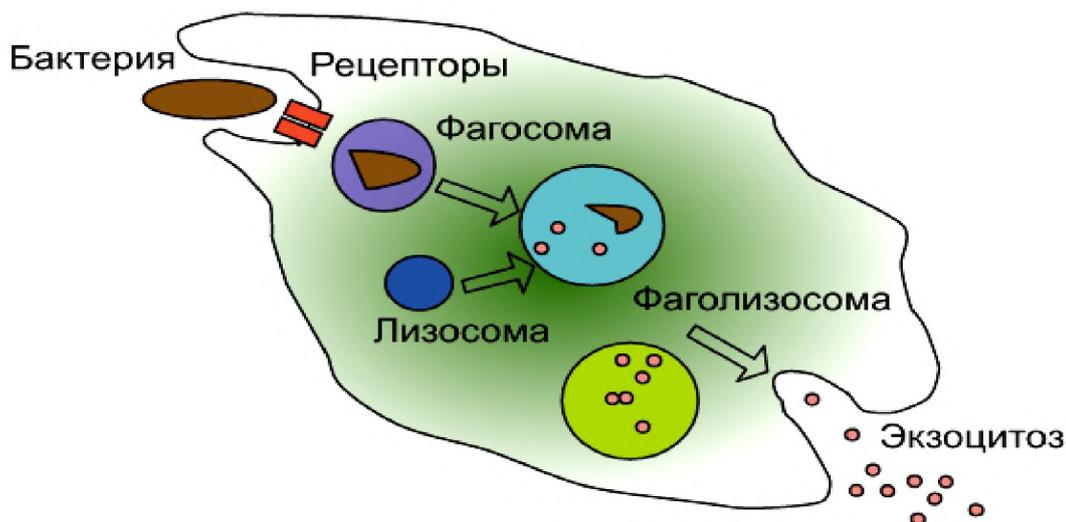


Рисунок 3 – Упрощенная схема фагоцитоза
[<https://upload.wikimedia.org>]

1.5. Специфические (индуцибельные) факторы защиты

Специфические факторы защиты организма возникают в течение жизни в результате контакта с конкретным дестабилизирующим фактором и обладают ярко выраженной специфичностью, т. е. защищают только от того фактора, который и вызвал проявление этого механизма.

Иммунная система осуществляет свою биологическую функцию с помощью сложного комплекса взаимосвязанных реакций. В них задействованы все ее структурные и функциональные элементы.

Конкретные проявления иммунного реагирования можно подразделить на отдельные формы:

- антителообразование;
- клеточно-опосредованный киллинг;
- иммунный фагоцитоз;
- реакции гиперчувствительности (немедленного и замедленного типа);
- формирование иммунологической памяти или толерантности;
- идиотип-антиидиотипическое взаимодействие.

Все эти реакции развиваются в организме на один и тот же антиген, носят специфический характер и имеют значение самостоятельной формы иммунного ответа. Основу различий каждой формы иммунного ответа организма составляют разные эффекторы, механизмы и результаты реакций.

Антитела – это белки глобулиновой фракции сыворотки крови, выделяющиеся плазматическими клетками иммунной системы в ответ на введение в организм различных антигенов (бактерий, вирусов, белковых токсинов и др.) и специфически взаимодействующие с антигенами, вызвавшими их образование.

Иммуноглобулины составляют 15–20% белков плазмы крови, а также находятся и в других жидкостях организма.

Основная функция антител – специфическое распознавание и связывание антигена, который был причиной их образования, с последующим представлением его макрофагам и лимфоцитам.

Наиболее важными функциями иммуноглобулинов в защитных реакциях организма являются:

- ограничение подвижности антигенов (диффузионной или активной) во внутренней среде и на поверхности слизистых оболочек;
- нейтрализация токсических или патогенных свойств антигенов;
- опсонизация чужеродных частиц и усиление за счет этого эффективности фагоцитоза;
- активация системы комплемента;
- обеспечение антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ).

Иммуноглобулины представляют собой белки с четвертичной структурой (рисунок 4).

Молекулы иммуноглобулинов (антител) имеют форму буквы «Y» и состоят из 2 одинаковых легких и 2 одинаковых тяжелых полипептидных цепей, соединенных вместе дисульфидными связями. Полипептидные цепи на «верхних» концах «буквы Y» завершаются аминокислотными группами и являются антигенсвязывающими участками, а «ножка» – карбоксильными группами.

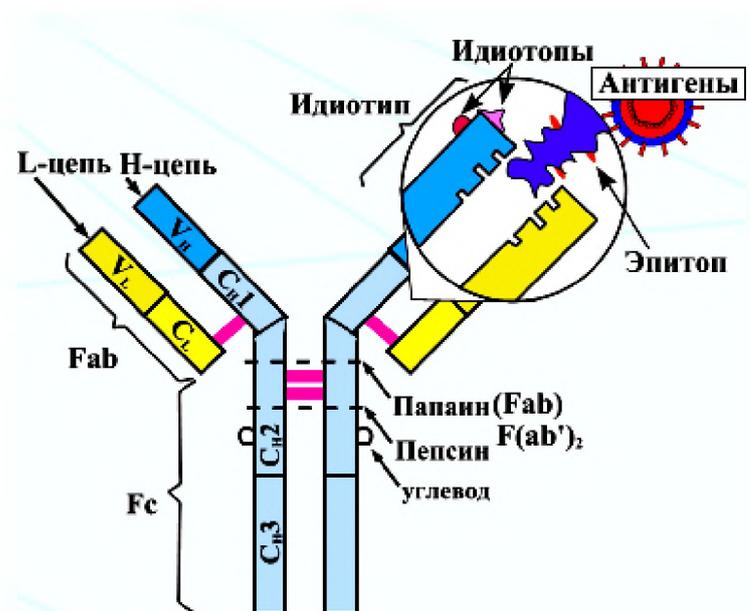


Рисунок 4 – Строение молекулы антигена
[<https://nsau.edu.ru>]

Известны растворимые и мембранные формы антител. Мембранные антитела встречаются у В-лимфоцитов и называются В-клеточными рецепторами.

Растворимые антитела по строению практически идентичны мембранным, различия касаются только С-концевой (константной) части.

Молекула мономерного иммуноглобулина имеет молекулярную массу 150–170 кДа и состоит из 4 полипептидных цепей, которые располагаются симметрично и соединены дисульфидными связями: 2 легких L-цепей (англ. *Light*), имеющих молекулярную массу 50–60 кДа, и 2 тяжелых H-цепей (англ. *Heavy*), имеющих молекулярную массу 100–120 кДа. H- и L-цепи соединены единственной дисульфидной связью, расположенной недалеко от С-конца легкой цепи, остальные дисульфидные связи скрепляют H-цепи.

В состав легких цепей входит 2 гомологичных сегмента (домена), а в состав тяжелых – 4–5 доменов. Домены состоят из приблизительно 110 аминокислотных остатков и имеют сходную пространственную структуру, которая стабилизирована одной дисульфидной связью, однако их функции различаются.

N-концы всех цепей участвуют в распознавании антигена, то есть образуют два одинаковых сайта связывания антигена. Ключевую роль в процессе распознавания антигена играет соответствие структур антигена (точнее, части молекулы антигена – эпитопа) и антигенраспознающего участка антитела (паратопа) по принципу «ключ-замок».

Специфичность иммуноглобулинов определяется аминокислотной последовательностью антигенраспознающих доменов, которые называют переменными (V-домены, F_V-участки). Антигенсвязывающий участок формируется V-доменами тяжелых и легких цепей (V_H- и V_L-домены соответственно).

Остальные домены молекулы иммуноглобулина имеют фиксированную структуру, поэтому их называют константными (C-доменами). L-цепь содержит 1 C-домен (обозначается C_L), а H-цепь – 3 или 4 домена (обозначаются C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, C_{H4}). C-домены не участвуют в распознавании антигенов и необходимы для взаимодействия с рецепторами иммунных клеток, активации системы комплемента и других эффекторных функций.

Антитела называют *моноспецифичными*, если они могут распознавать только 1 антиген или эпитоп; *биспецифичными*, если они связываются с 2 разными антигенами или 2 разными эпитопами в составе 1 антигена; некоторые антитела называют *поливалентными*, или *неспецифичными*, если они распознают несколько антигенов.

Под действием протеаз молекулы иммуноглобулинов расщепляются на фрагменты, которые имеют специальные названия. Так, папаин расщепляет молекулу иммуноглобулина на 3 фрагмента: 2 фрагмента *Fab* (от англ. *Fragment antigen binding*) и 1 фрагмент *Fc* (от англ. *Fragment crystallizable*). В состав фрагментов *Fab* входят V-домены, а также C_L- и C_{H1}-домены, а *Fc* содержит остальные C-домены и соединяющие их дисульфидные связи.

В области C-доменов находится большая часть участков, взаимодействующих с рецепторами клеток, такими как *Fc*-рецепторы. Продолжительность пребывания антитела в кровотоке зависит от особенностей строения домена C_{H2}. Между доменами C_{H1} и C_{H2} располагается участок, различный по протяженности в H-цепях разных изотипов и не входящий в состав доменов. В связи

высоким содержанием пролина этот участок обладает высокой гибкостью, поэтому его также называют *шарнирным участком*. Именно в нем располагаются сайты расщепления иммуноглобулинов протеазами.

Молекулы антител подвергаются гликозилированию, то есть являются гликопротеинами. L-цепи лишены стабильных участков гликозилирования, а в H-цепях они представлены во всех доменах, кроме вариабельного (больше всего их находится в C_H2-домене). Углеводная составляющая антител не влияет на их специфичность, однако гликозилирование необходимо для стабилизации функционально важных характеристик молекулы, обеспечивает взаимодействие с лектинами, определяет особенности катаболизма и биологические свойства антител. Углеводные фрагменты в составе антител чаще всего имеют основу из остатков маннозы и хитобиозы.

Тяжелые и легкие цепи существуют в нескольких вариантах, отличающихся структурой и функциями, в связи с чем антитела делят на классы, или изоотипы. Выделяют 2 типа L-цепей (κ и λ) и 5 изоотипов H-цепей (μ , γ , α , δ и ϵ). В состав 1 молекулы иммуноглобулина могут входить только H-цепи 1 вида.

У млекопитающих существует 5 основных типов антител (рисунок 5): IgM, IgG, IgA, IgD и IgE (латинские буквы в названиях классов антител соответствуют греческим в обозначении изоотипов H-цепей). Иммуноглобулины классов IgG и IgA разделяют на подклассы (субтипы), также в зависимости от особенностей H-цепей.

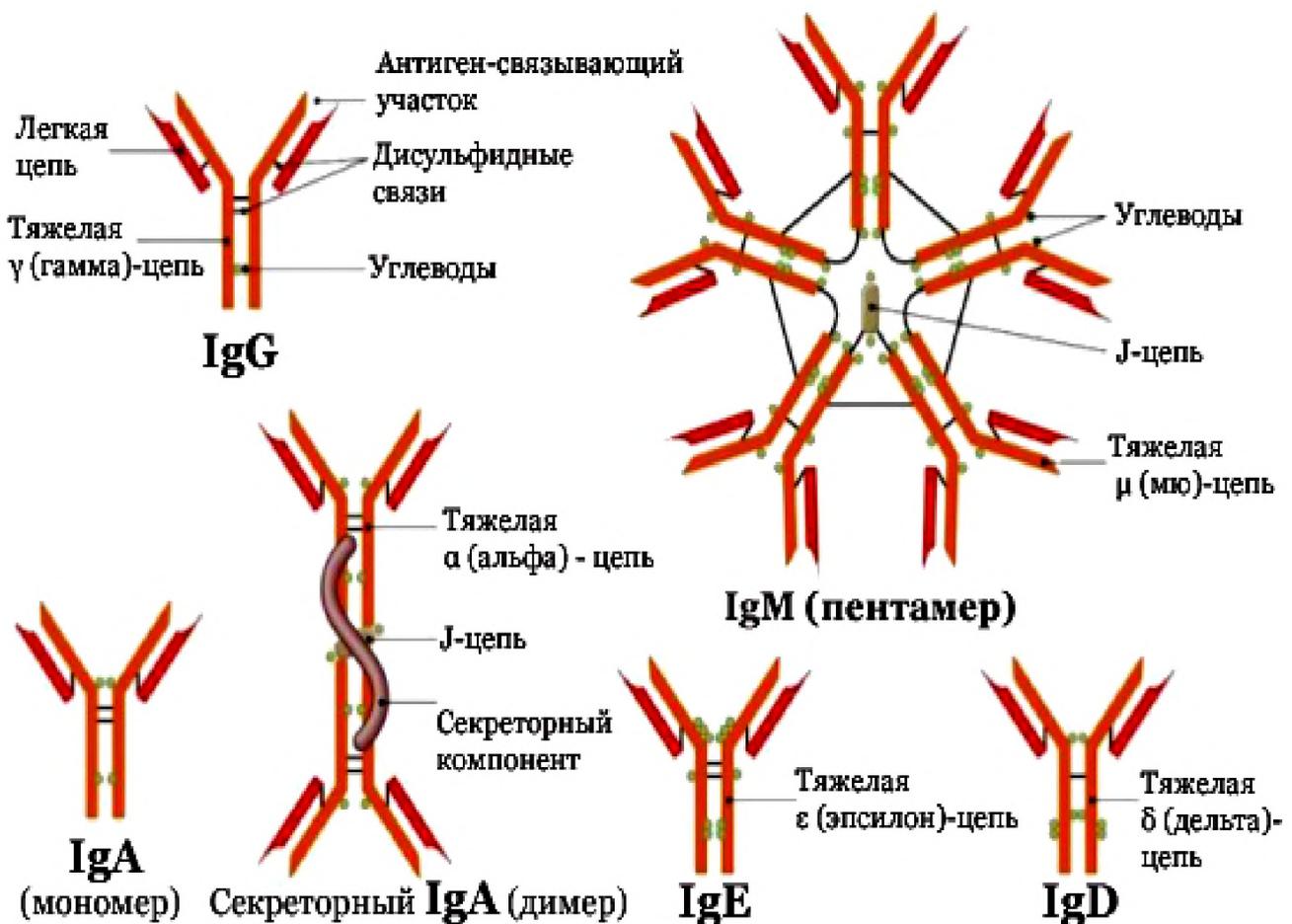


Рисунок 5 – Классы антител млекопитающих
[<https://bestvenerolog.ru>]

Основные свойства классов антител перечислены в таблице 1.

Таблица 1 – Основные свойства классов антител млекопитающих

Свойство	Класс антител				
	IgM	IgG	IgA	IgD	IgE
Молекулярная масса, кДа	950	150 (IgG3 – 165)	150 (димер – 300)	185	190
Количество мономеров	5	1	1 или 2	1	1
Валентность	5	2	2 или 4	2	2
Изотип H-цепи	μ	γ	α	δ	ϵ
Количество C-доменов в H-цепи	4	3	3	3	4
Количество дисульфидных связей между H-цепями	4	3-12	4 или 5	1	3
Содержание в сыворотке, мг/мл	1.5	13-14	3,5	0,03	0,00002 - 0,0005
Время полужизни, суток	5-10	23 (IgG3 – 7)	6	3	2
Клетки, связывающие антитело через Fc-рецепторы	–	Макрофаги, моноциты, нейтрофилы	Макрофаги, моноциты, нейтрофилы (слабо)	–	Тучные клетки, базофилы
Функции	Мембранный рецептор, первичный иммунный ответ	Вторичный иммунный ответ, защита от бактерий и вирусов	Преобладают в секретах слизистых оболочек	Мембранный рецептор	Реагины, защита от паразитов

Иммуноглобулины всех классов могут принадлежать к К- и L-типам в зависимости от присутствия в их составе L-цепей κ - или λ -типов соответственно. Разные изотипы H-цепей имеют отличающееся количество C-доменов: γ -, α - и δ -цепи имеют по 3 C-домена, а в состав μ - и ϵ -цепей входит по 4 C-домена.

Иммуноглобулин М первым появляется после заражения или вакцинации животного. Обладает выраженной способностью агглютинировать, преципитировать или лизировать антигены, а также связывать комплемент, является пятивалентным. Находится преимущественно в плазме крови, а при инфекционных заболеваниях количество его значительно повышается в сыворотке крови. Иммуноглобулин не участвует в аллергических реакциях, не проходит через плаценту.

Иммуноглобулины G составляют от 70 до 85% всех глобулинов. Содержатся также в тканевых жидкостях, 2-валентны, образуют с поливалентными антигенами сетевую структуру, вызывают преципитацию растворимых антигенов. Принимают участие в реакции агглютинации и опсонизации корпускуляр-

ных антигенов, связываются с комплементом. Игрют ведущую роль в защите от многих вирусных и бактериальных инфекций, обладают выраженными свойствами нейтрализации токсинов. Единственные иммуноглобулины, которые проходят через плаценту. Данные иммуноглобулины синтезируются на протяжении более длительного времени после антигенного стимула и связывают уже не только корпускулярные, но и растворимые антигены.

Имуноглобулины А существуют в 2 формах:

- *сывороточная* (обладает способностью преципитировать растворимые антигены, не связывает комплемент по классическому пути, принимает участие в реакции нейтрализации токсинов, термоустойчив, синтезируется в селезенке, лимфатических узлах, слизистых оболочках и поступает в секреты (слюну, слезную жидкость, бронхиальный секрет, молозиво));
- *секреторная* (участвует в местной защите слизистых оболочек, подавляя бактериальную адгезию и нейтрализуя вирусы; образуется в результате ассоциации димерной формы IgA с особым белком, названным секреторным компонентом, местно в лимфоидной ткани слизистых оболочек пищеварительного тракта, органов дыхания, зрения и других органов).

Имуноглобулины D служат рецепторами созревающих В-лимфоцитов. Количество IgD увеличивается при некоторых вирусных инфекциях и хронических воспалительных процессах. Не фиксируют комплемент. Биологическая функция не совсем ясна.

Имуноглобулины E играют защитную роль при гельминтозных и протозойных заболеваниях. Синтезируются в основном в коже, лимфоидной ткани органов дыхания и пищеварительной системе. Не связывают комплемент, быстро и прочно связываются с клетками тканей, с тканевыми базофилами, принимают участие в реакции гиперчувствительности немедленного типа.

Помимо перечисленных выше классов антител млекопитающих, у некоторых позвоночных животных имеются другие классы антител. У костных рыб имеется особый класс антител IgT/Z, а у хрящевых рыб и млекопитающих семейства верблюдовых помимо типичных антител имеются антитела из тяжелых цепей, лишенные легких цепей (считается, что антитела из тяжелых цепей хрящевых рыб и верблюдовых – результат конвергентной эволюции, и они появились в связи с функциональными особенностями).

У амфибий, рептилий и птиц имеются иммуноглобулины Y (IgY), в больших количествах накапливаются в яичном желтке. Различают естественные и иммунные антитела. Структурно IgY близки к IgG млекопитающих. Молекула IgY состоит из 2 тяжелых и 2 легких цепей, имеющих константные и переменные домены. Масса тяжелой цепи IgY составляет 70 кДа (у тяжелой цепи IgG млекопитающих – 50 кДа), но легкие цепи антител обоих классов имеют массу 21 кДа. В состав легкой цепи входит 1 переменный и 1 константный домен, а тяжелая цепь включает 1 переменный домен и 4 константных домена, обозначаемых C_H1, C_H2, C_H3 и C_H4 (у IgG млекопитающих имеется только 3 константных домена C_H1, C_H2, C_H3). Из-за отсутствия шарнирного участка

молекула IgY обладает меньшей гибкостью, чем молекула IgG. У уток образуется «обрезанная форма» IgY с укороченным Fc-участком. IgY стабильны при температурах до +40°C и короткое время сохраняют свою структуру при температуре +60°C, благодаря чему могут выдерживать пастеризацию. IgY активно транспортируется из крови в стерильный яичный желток, в котором откладывается в большом количестве. На момент откладывания яйца у птиц в желтке присутствует 200 мг IgY. В отличие от IgG, IgY не связываются с компонентами системы комплемента, ревматоидным фактором, Fc-рецепторами, белками А и G.

Естественные антитела находятся в организме без предварительного введения антигена (иммунизации).

Иммунные антитела накапливаются и выявляются в сыворотке крови после предварительной иммунизации антигенами. Различают несколько видов таких антител:

- *противоинфекционные* – образуются после попадания в организм антигенов микробов, вирусов, простейших, грибов, токсинов (антибактериальные, антитоксические, противовирусные и др.);
- *неинфекционные* – появляются при контакте с неинфекционными антигенами (ксеногенные (антивидовые – против антигенов другого вида), аллогенные (внутривидовые – против изоантигенов одного вида) и аутоантитела (к собственным антигенам организма)).

По феноменологическому проявлению взаимодействия с антигенами антитела подразделяются на преципитирующие, агглютинирующие, комплементсвязывающие, нейтрализующие и лизирующие.

Антитела вырабатываются плазматическими клетками, находящимися в селезенке, лимфатических узлах, костном мозге, пейеровых бляшках. Плазматические клетки происходят из предшественников В-клеток, подвергшихся контакту с антигеном. В-клетки и их потомки функционируют по клональному принципу: по мере развития иммунного ответа они дифференцируются, пролиферируют и созревают.

Клеточно-опосредованный киллинг представляет собой форму иммунного реагирования, независимую от системы комплемента, при которой уничтожение чужеродных клеток осуществляется непосредственно клетками-киллерами.

Механизм клеточно-опосредованного киллинга достаточно универсален. Киллеры вырабатывают ряд веществ, обладающих цитотоксическим или цитолитическим действием: вызывают некроз путем разрушения целостности клеточной мембраны (или стенки) или индуцируют апоптоз. Цитотоксические субстанции синтезируются только при активации клетки.

Киллеры осуществляют свою функцию дистантно или при непосредственном контакте. Мишенью для них являются раковотрансформированные, мутантные или зараженные вирусами клетки, грибы, простейшие, гельминты и некоторые бактерии.

Способ распознавания киллерами генетической чужеродности клеток-мишеней определяется типом его антигенсвязывающего рецептора. Различают антителозависимую и антителонезависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность.

Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (рисунок 6) реализуется благодаря экспрессии на мембране иммунокомпетентных клеток рецепторов к Fc-фрагменту молекулы иммуноглобулина. Эти рецепторы являются трансмембранными белковыми молекулами и различаются по специфичности и аффинности. Антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность могут осуществлять активированные макрофаги, эозинофилы и естественные киллеры.

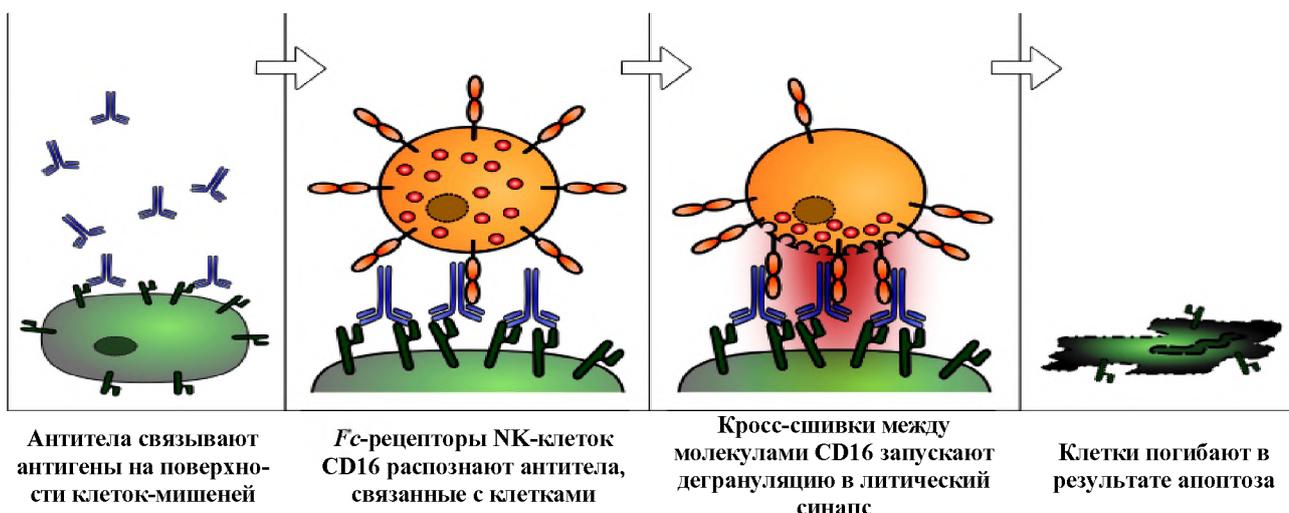
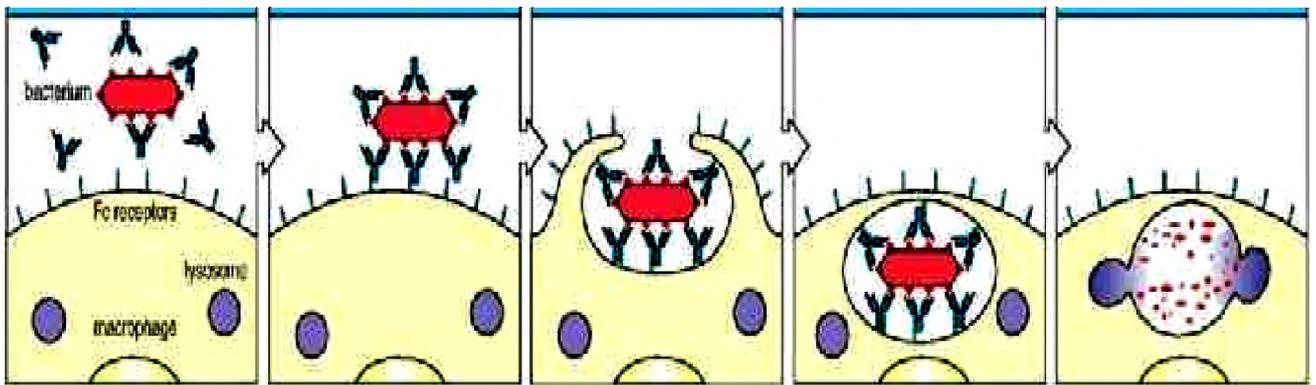


Рисунок 6 – Механизм антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности
[<https://upload.wikimedia.org>]

Антителонезависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность осуществляется без непосредственного участия молекулы иммуноглобулина. Ее индукторами являются клетки лимфоидного ряда, несущие иммунорецепторы «прямого» распознавания. К этой группе клеток относятся Т-хелперы, Т-киллеры и естественные киллеры.

Иммунный фагоцитоз (рисунок 7) основан на поглощении фагоцитами антигенов, входящих в состав иммунных комплексов. При этом антигенами могут быть как отдельные молекулы или их агрегаты, так и цельные клетки или их обломки.

Для осуществления иммунного фагоцитоза необходимо участие молекул иммуноглобулинов и (или) комплемента, а также рецепторов к Fc-участку молекулы иммуноглобулина и компонентам комплемента на клеточной мембране фагоцитирующей клетки. Рецепторы обеспечивают узнавание и захват фагоцитом иммунных комплексов или опсонизированных антигенов, которые потом эндоцитируются. Таким образом, фагоциты участвуют в элиминации (удалении) антигенов из организма и восстановлении его гомеостаза.



Связывание антител с бактериями

Бактерии, покрытые антителами, связываются с Fc-рецепторами на поверхности клеток

Мембрана макрофага окружает бактерии

Мембраны макрофагов смыкаются, образуя пузырьки (фагосомы)

Лизосомы сливаются с фагосомой, образуя фаголизосому

Рисунок 7 – Механизм иммунного фагоцитоза

[<https://present5.com>]

Иммунологическая память – способность организма давать ускоренную иммунологическую реакцию на повторное введение антигена.

В процессе развития в организме продуктивного иммунного ответа часть антигенореактивных Т- или В-лимфоцитов дифференцируется в малые покоящиеся клетки, или клетки иммунологической памяти (рисунок 8). Эти клетки отличаются высокой специфичностью к конкретной антигенной детерминанте и большой продолжительностью жизни (до 10 лет и более). Они активно рециркулируют в организме, распределяясь в тканях и органах, но постоянно возвращаются в места своего происхождения. Это обеспечивает постоянную готовность иммунной системы реагировать на повторный контакт антигеном по вторичному типу. При повторном введении антигена в организм клетки памяти обуславливают вторичный иммунный ответ, при котором антителообразование происходит быстрее и более интенсивно, синтезируются преимущественно иммуноглобулины класса G, аффинитет антител выше, чем при первичном иммунном ответе.

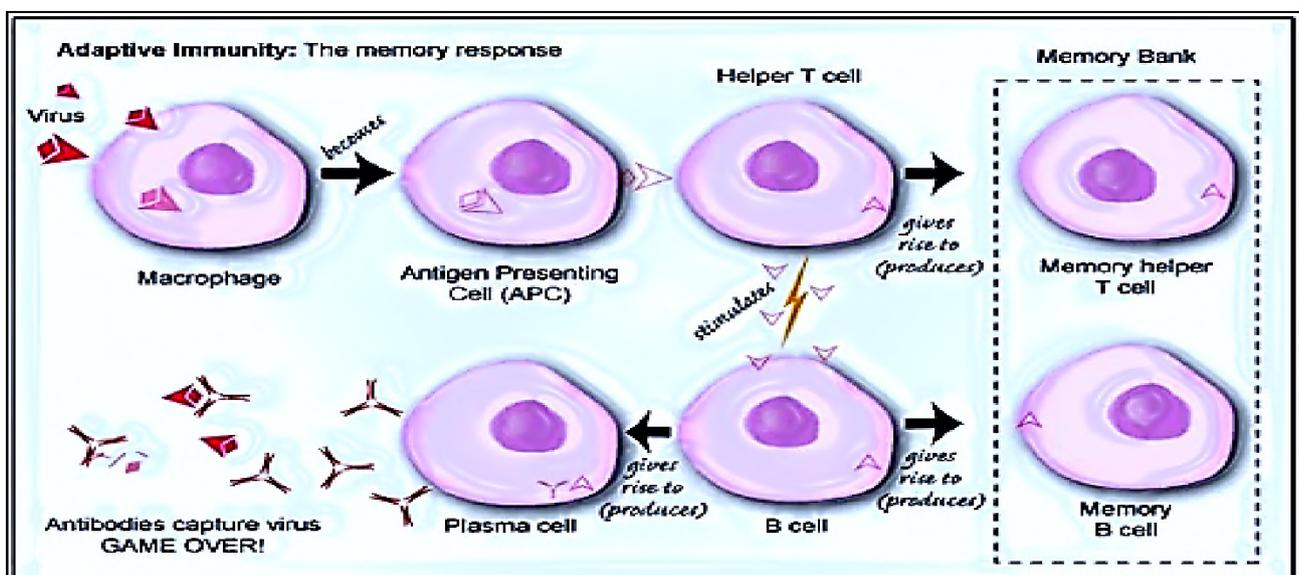


Рисунок 8 – Иммунологическая память

[<https://present5.com>]

Иммунологическая толерантность – состояние ареактивности в отношении определенного антигена, индуцированное предшествующим контактом с этим антигеном.

Организм продуцирует множество белковых и иных субстанций, которые являются антигенами. Клетки иммунной системы несут множество рецепторов ко всем антигенам, которые могут встречаться в жизни. Следовательно, не будь механизма ареактивности, иммунная система начала бы «работать» против собственных клеток и тканей.

В биологическом смысле иммунологическая толерантность необходима, прежде всего, чтобы организм не развивал иммунную активность против собственных клеточных и тканевых антигенов, продуцируемых в больших количествах, т.е. иммунологическая толерантность выключает иммунные реакции против «своих» органов и тканей.

В онтогенезе иммунологическая толерантность достигается путем элиминации тех клонов лимфоцитов, которые направлены против собственных клеток организма (процесс происходит в тимусе). Т-клоны, толерантные к собственным клеткам и тканям, вызревают и поступают в периферическую кровь.

Дальнейшая толерантность обеспечивается несколькими механизмами:

- если собственные антигены локализованы в тканях, не связанных циркуляцией, лимфоциты с ними не контактируют;
- иммунокомпетентные клетки становятся ареактивными вследствие постоянной стимуляции (так называемое «истощение» функции из-за постоянного присутствия антигена).
-

Гиперчувствительность немедленного типа (рисунок 9) – форма повышенной чувствительности к аллергенам, при которой аллергические реакции проявляются через несколько минут после повторной встречи с антигеном и связана с выработкой антител.

Гиперчувствительность немедленного типа проявляется чаще всего в следующих формах:

- *анафилаксия* – реакция немедленного типа, возникающая при парентеральном повторном введении аллергена в организм;
- *атопия* – аллергическая реакция, спонтанно возникающая у людей и животных (бронхиальная астма, аллергический насморк, дерматиты, конъюнктивиты, крапивница, пищевые и лекарственные аллергии) и носящая, как правило, местный характер. Атопические болезни у животных мало изучены. Описана сенная лихорадка у крупного рогатого скота при переходе на новое пастбище, при поедании корма в стойловый период со спорами грибов, которая проявляется одышкой вследствие развития бронхита;
- *сывороточная болезнь* – своеобразная форма аллергии, возникающая через 8–10 суток после введения сыворотки. Клинически сывороточная болезнь проявляется повышением температуры, нарушением сердечной деятельности, увеличением лимфоузлов, появлением сыпи, зудом,

болью в суставах. Болезнь протекает без смертельных исходов и через несколько дней заканчивается выздоровлением. В ветеринарной практике сывороточная болезнь предупреждается применением антигистаминных препаратов или же прогреванием сывороток перед их введением при температуре +56°C в течение часа.

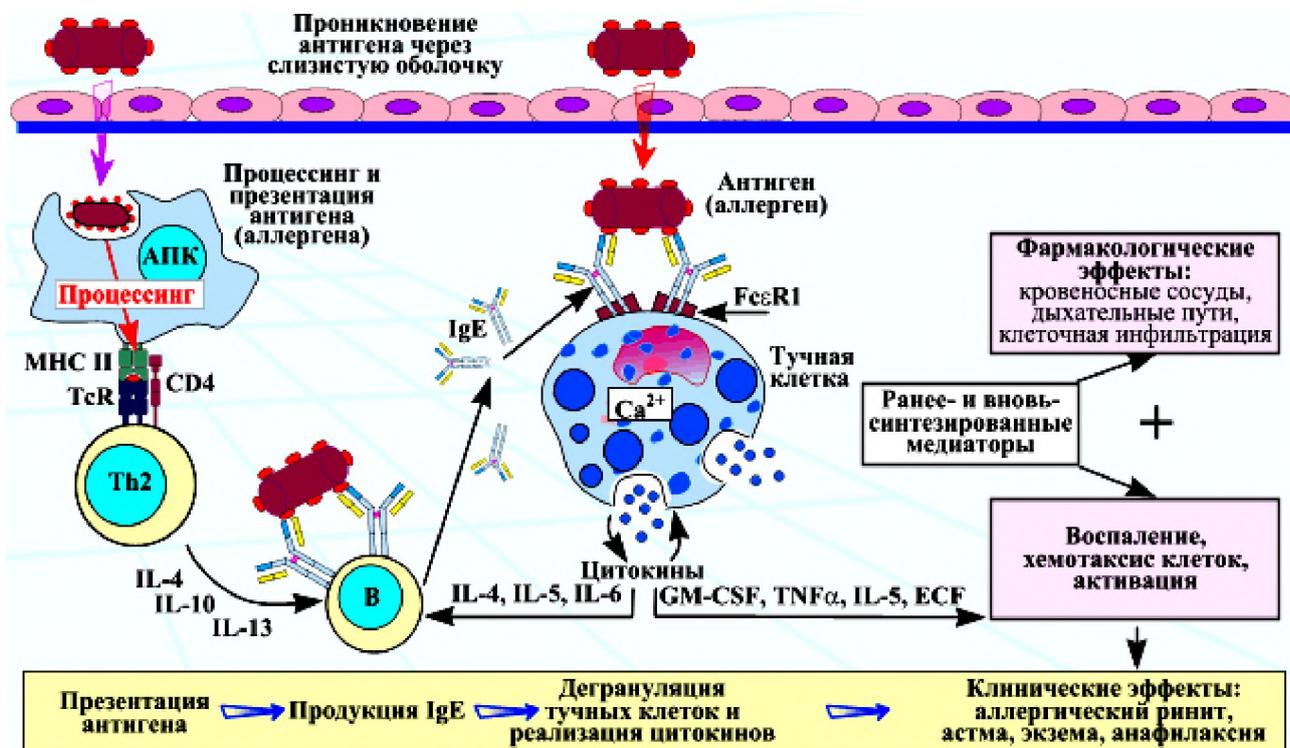


Рисунок 9 – Механизм гиперчувствительности немедленного типа
[<https://nsau.edu.ru>]

Гиперчувствительность замедленного типа (рисунок 10) – форма повышенной чувствительности к аллергенам, при которой ответ на аллерген наступает через несколько часов или дней после его введения.

В настоящее время различают инфекционную аллергию, контактную аллергию, аллергические реакции при трансплантации.

Для клинической ветеринарной практики наибольший интерес представляют аллергические реакции при диагностике ряда инфекционных болезней методом кожных проб со специфическими аллергенами.

Метод аллергической диагностики используют при сапе, туберкулезе, бруцеллезе, туляремии и других болезнях.

Аллергические реакции осуществляют путем внутрикожного или подкожного введения аллергенов. Протекают они в виде местного воспаления: образование припухлости, увеличение складки кожи, покраснение кожи, ее болезненность в месте введения аллергена.

Аллергические реакции отличаются высокой специфичностью.

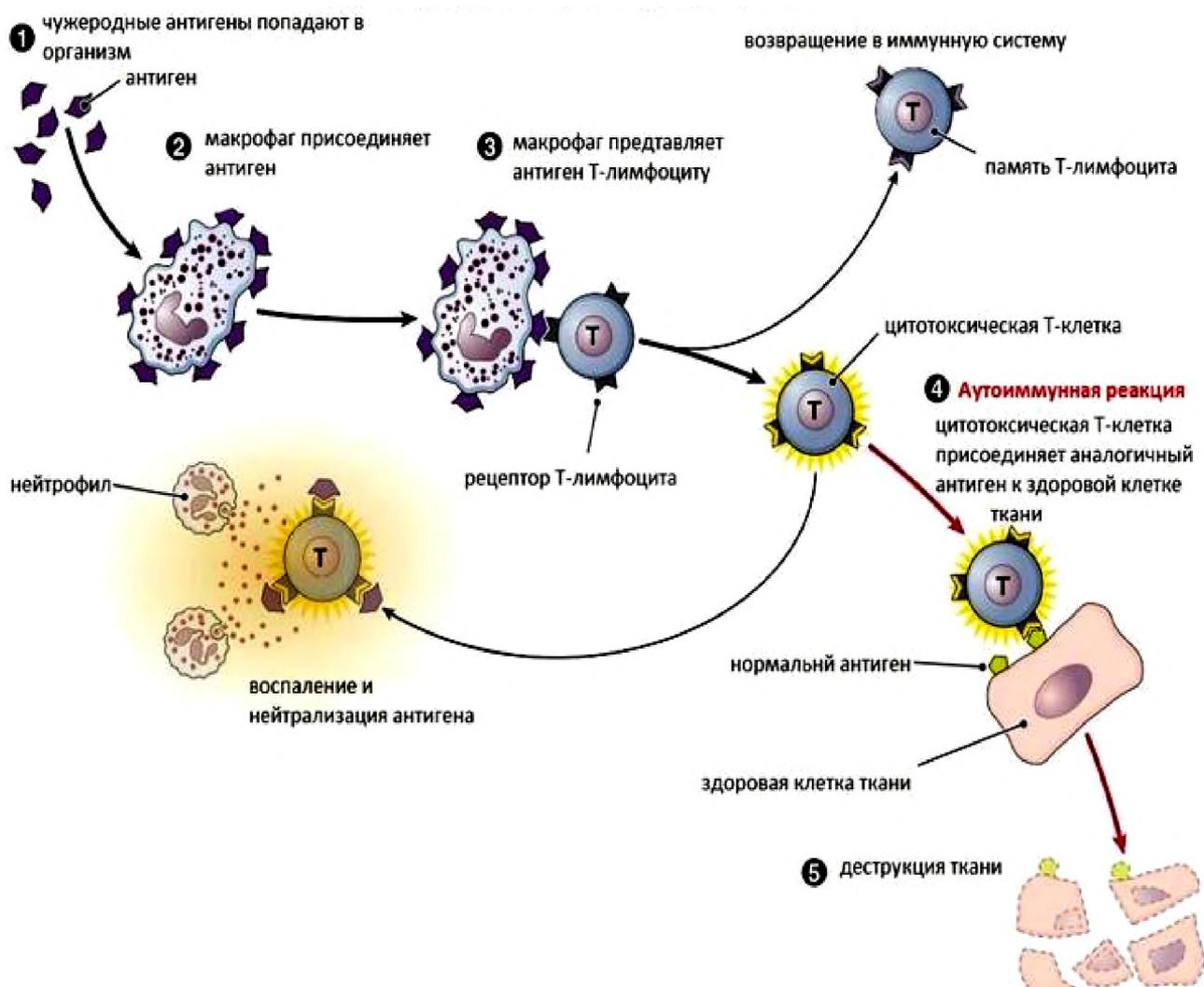


Рисунок 10 – Механизм гиперчувствительности замедленного типа
[\[https://cont.ws\]](https://cont.ws)

Идиотип-антиидиотипическое взаимодействие (рисунок 11) лежит в основе теории иммунной сети как механизма регуляции функционирования иммунной системы.

К одному и тому же антигену антитела синтезируются различными клонами лимфоцитов. Такие антитела будут несколько отличаться по строению друг от друга: в их активном центре находятся уникальные антигенные детерминанты, присущие только данному клону лимфоцитов и отличающие его от любых других, – *идиотипы*.

При разворачивании иммунного ответа первоначально синтезируются антитела первого поколения, направленные к данному антигену (идиотипические антитела). К их активным центрам, в свою очередь, впоследствии вырабатываются антитела второго поколения (антиидиотипические антитела), которые блокируют синтез идиотипических антител, что приводит к естественному затуханию иммунного ответа, снижающему вероятность развития аутоиммунных процессов.

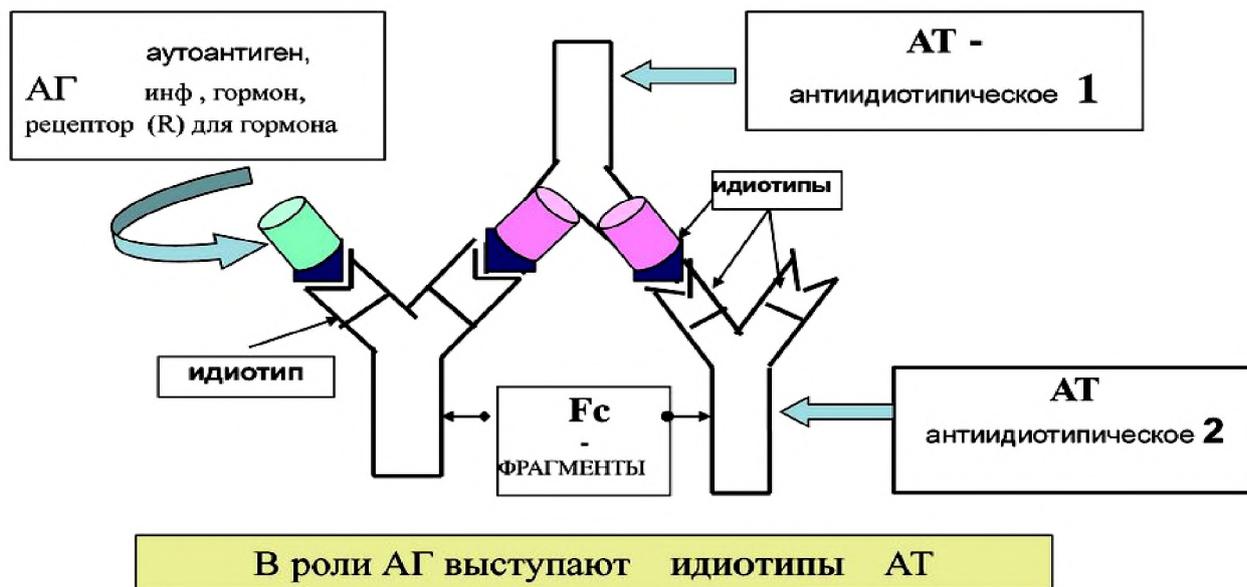


Рисунок 11 – Идиотип-антиидиотипическое взаимодействие
[\[https://cf2.ppt-online.org\]](https://cf2.ppt-online.org)

Все элементы иммунной системы имеют единый принцип управления и активируются практически одновременно, однако, в зависимости от характера антигенного воздействия, одна или несколько форм доминируют.

1.6. Механизм иммунного ответа

Иммунную реакцию от начала до завершения можно разделить на 3 этапа:

- 1) распознавание антигена;
- 2) формирование эффекторов;
- 3) эффекторная часть иммунного ответа (завершающий).

1-й этап. Антигенное распознавание включает в себя неспецифический этап; распознавание антигена Т-клетками; распознавание антигена В-клетками; клональная селекция.

Неспецифический этап. Макрофаг первым вступает во взаимодействие с антигеном, осуществляя филогенетически самую древнюю разновидность иммунной реакции. Антиген подвергается фагоцитозу и перевариванию, результатом которого является «разборка» крупных молекул на составные части. Этот процесс называется *процессингом антигена*.

Затем процессированный антиген экспрессируется в комплексе с белками главного комплекса гистосовместимости на поверхности макрофага.

Распознавание антигена Т-клетками. Т-хелпер распознает комплекс, состоящий из чужеродного антигена и собственного антигена главного комплекса гистосовместимости. Для иммунного ответа необходимо одновременное распознавание как чужеродного антигена, так и собственного антигена главного комплекса гистосовместимости.

Распознавание антигена В-клетками. В-лимфоциты распознают антигены посредством своих иммуноглобулиновых рецепторов. Антиген также может

подвергаться повторному процессингу при взаимодействии с В-лимфоцитом. Процессированный антиген помещается на поверхность В-клетки, где он распознается активированным Т-хелпером. В-лимфоцит не способен к самостоятельному ответу на антигенную стимуляцию, поэтому ему необходимо получить второй сигнал от Т-хелпера. Антигены, иммунная реакция на которые возможна только с таким повторным сигналом, называются тимусзависимыми.

Иногда активация В-лимфоцитов возможна и без участия Т-клеток. Бактериальный липополисахарид в высоких концентрациях вызывает активацию В-лимфоцитов. При этом специфичность иммуноглобулиновых рецепторов В-лимфоцита не имеет значения. В данном случае собственная митогенная активность липополисахарида исполняет роль второго сигнала для В-лимфоцитов. Такие антигены называют тимуснезависимыми антигенами типа I.

Некоторые линейные антигены (полисахариды пневмококков, поливинилпирролидон и др.) также стимулируют В-клетки без участия Т-лимфоцитов. Эти антигены длительное время остаются на мембране специализированных макрофагов и называются тимуснезависимыми антигенами типа II.

Клональная селекция. При попадании в организм антигена происходит селекция клонов с рецепторами, комплементарными данному антигену. Только представители этих клонов участвуют в дальнейшей антигензависимой дифференцировке клона В-лимфоцитов.

2-й этап. Формирование эффекторного звена иммунной реакции происходит путем дифференцировки клона В-лимфоцитов и образования цитотоксических Т-лимфоцитов.

Взаимодействие между клетками в процессе формирования иммунного ответа на антигенную стимуляцию осуществляется за счет особых растворимых медиаторов цитокинов. Под воздействием различных цитокинов, продуцируемых макрофагами либо Т-лимфоцитами, происходит созревание В-лимфоцитов в антителообразующие клетки.

Для В-лимфоцитов конечным этапом дифференцировки является преобразование в плазматическую клетку, которая продуцирует огромное количество антител. Специфичность этих антител соответствует специфичности иммуноглобулинового рецептора предшественника В-лимфоцита.

3-й этап. На завершающем этапе иммунного ответа задействованы антитела, система комплемента, а также цитотоксические Т-лимфоциты, осуществляющие цитотоксическую реакцию.

Комплекс микроорганизма с антителом запускает классический путь активации системы комплемента, в результате чего образуется мембраноатакующий комплекс (МАК), наносящий клеточной стенке бактерии повреждения.

Кроме того, антитела нейтрализуют бактериальные токсины и, связываясь с инкапсулированными бактериями, облегчают их фагоцитоз макрофагами. Этот феномен называется опсонизацией.

Внешне же иммунный ответ проявляется в развитии острой воспалительной реакции.

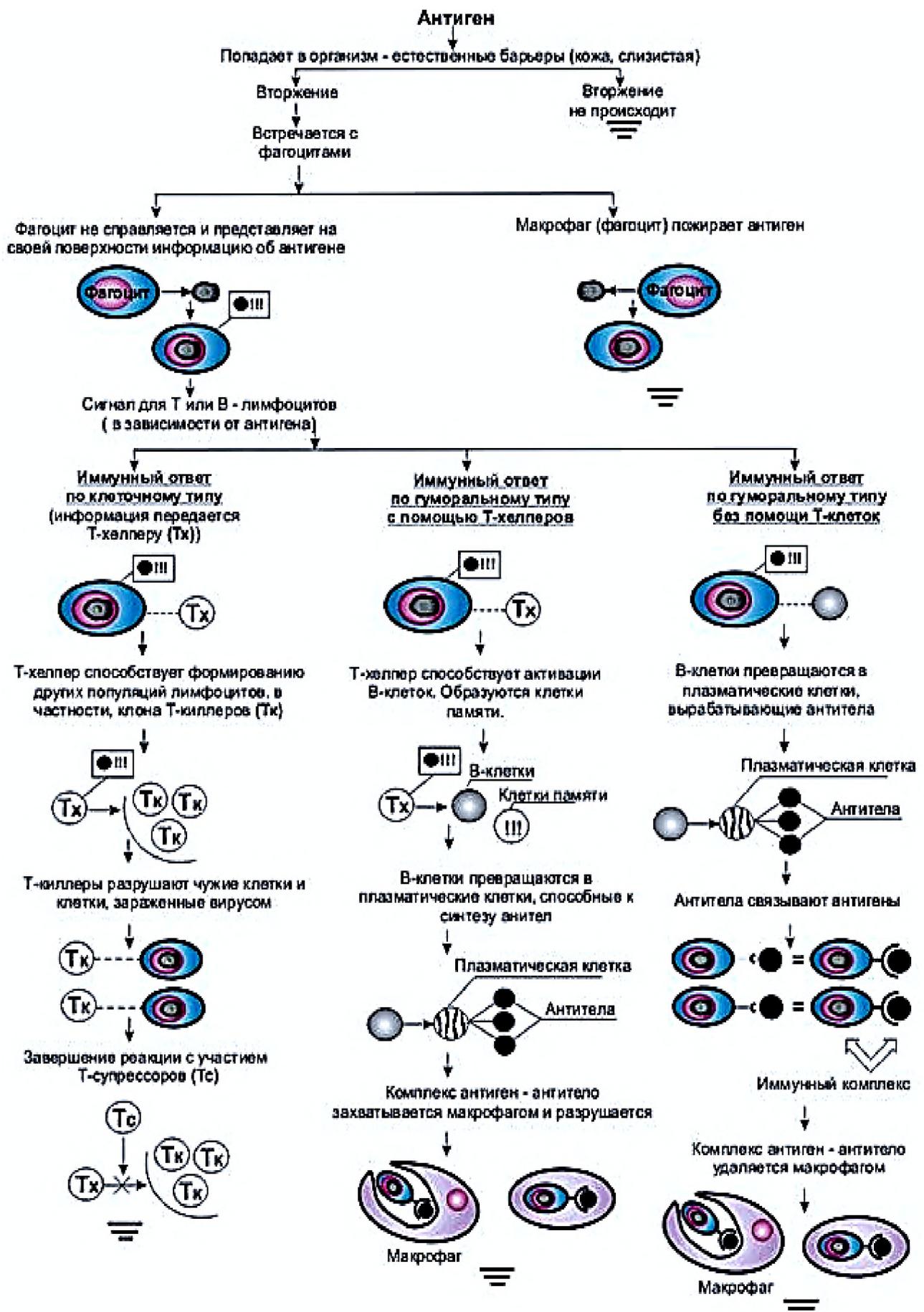


Рисунок 12 – Механизм иммунного ответа
[<https://google.ru>]

1.7. Особенности противоинфекционного иммунитета

Особенности иммунитета при бактериальных инфекциях

Патогенные микроорганизмы, размножающиеся в макроорганизме внеклеточно, как правило, обуславливают гуморальный иммунитет. При этом вначале появляются антитела, относящиеся к IgM, а спустя несколько дней – IgG и IgA. Антитела связываются с бактериальной клеткой и в присутствии комплемента обуславливают цитотоксическую реакцию, т.е. вызывают бактериолиз. Кроме того, антитела нейтрализуют токсины, вырабатываемые бактериями, а также опсонизируют бактерии и тем самым способствуют усилению фагоцитарной активности.

При остром течении инфекционного процесса выработка антител в организме запаздывает, в результате чего наступает гибель животного. Поэтому при таких инфекционных болезнях необходимо как можно раньше ввести животному специфическую иммунную сыворотку (рожа свиней, столбняк и др.).

В том случае, когда патогенные микроорганизмы при попадании в организм размножаются внутриклеточно, они, как правило, уничтожаются реакциями клеточного иммунитета (Т-киллерами, активизированными макрофагами). Клеточный иммунитет имеет особое значение, когда наблюдается незавершенный фагоцитоз бактерий. В этом случае возникает необходимость уничтожения фагоцитов, в которых находятся микроорганизмы. Уничтожают зараженные фагоциты сенсibilизированные Т-киллеры. Одновременно они выделяют лимфокины, которые активизируют в очаге воспаления макрофаги, последние приобретают способность уничтожать микробы.

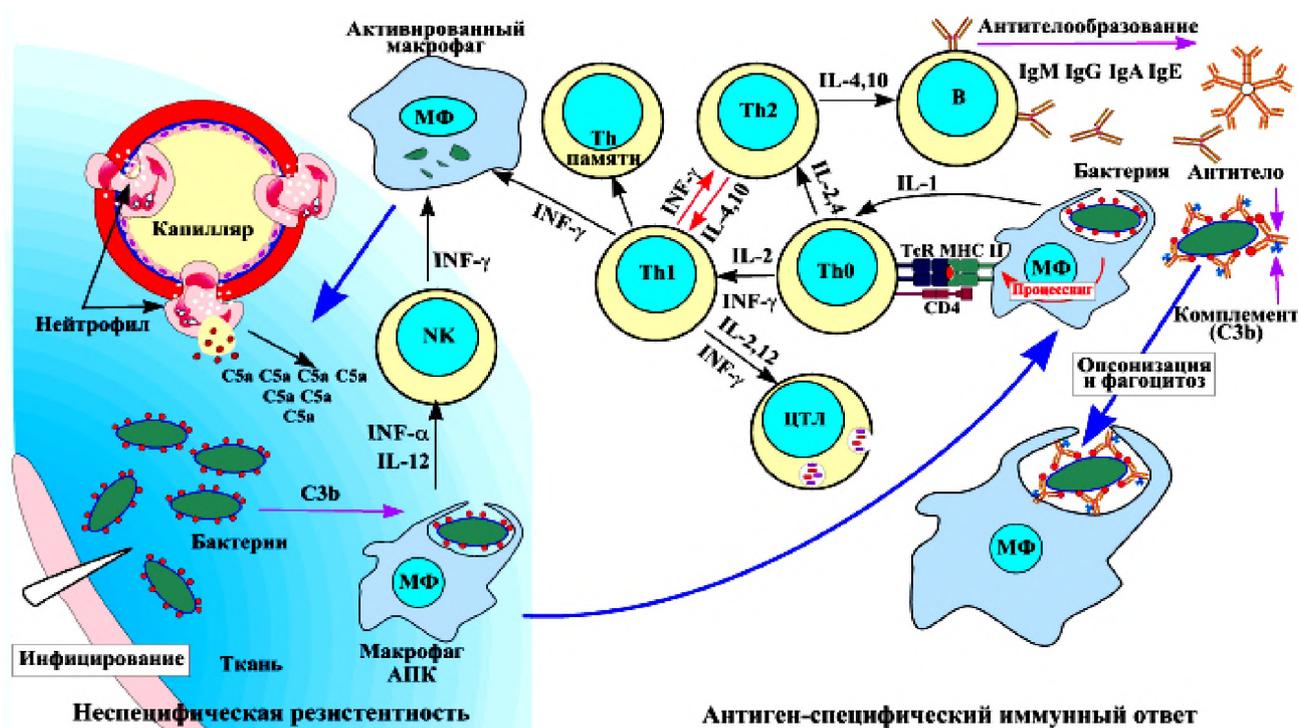


Рисунок 13 – Иммунитет при бактериальных инфекциях

[<https://nsau.edu.ru>]

При многих бактериальных инфекциях, особенно с хроническим течением, формируется гиперчувствительность замедленного типа, в которой главную роль выполняют сенсibilизированные Т-лимфоциты и лимфокины.

При многих заболеваниях, обусловленных микроскопическими грибами (аспергиллез, трихофития), формируется преимущественно клеточный иммунитет, что подтверждается развитием гиперчувствительности замедленного типа. Такие болезни характеризуются длительным хроническим течением с периодическими обострениями, без склонности к самопроизвольному излечению.

Особенности иммунитета при вирусных инфекциях

Иммунитет при вирусных инфекциях обеспечивается антителами и сенсibilизированными Т-лимфоцитами. Вирусы, распространяющиеся гематогенно, могут быть обезврежены и удалены механизмами гуморального иммунитета.

К группе защитных антител принадлежат только вируснейтрализующие антитела, подавляющие способность вирусов к репродукции благодаря блокированию первых этапов взаимодействия с чувствительными клетками (адсорбция и проникновение). Эти антитела нейтрализуют и токсические свойства вирусов.

Стабильность комплекса «вирус-антитело» зависит от различий чувствительности патогена к антителам, их avidности, температуры, времени контакта и других факторов. Часто соединение вируса с антителами носит обратимый характер, то есть вирус после контакта с антителом сохраняет свои биологические свойства.

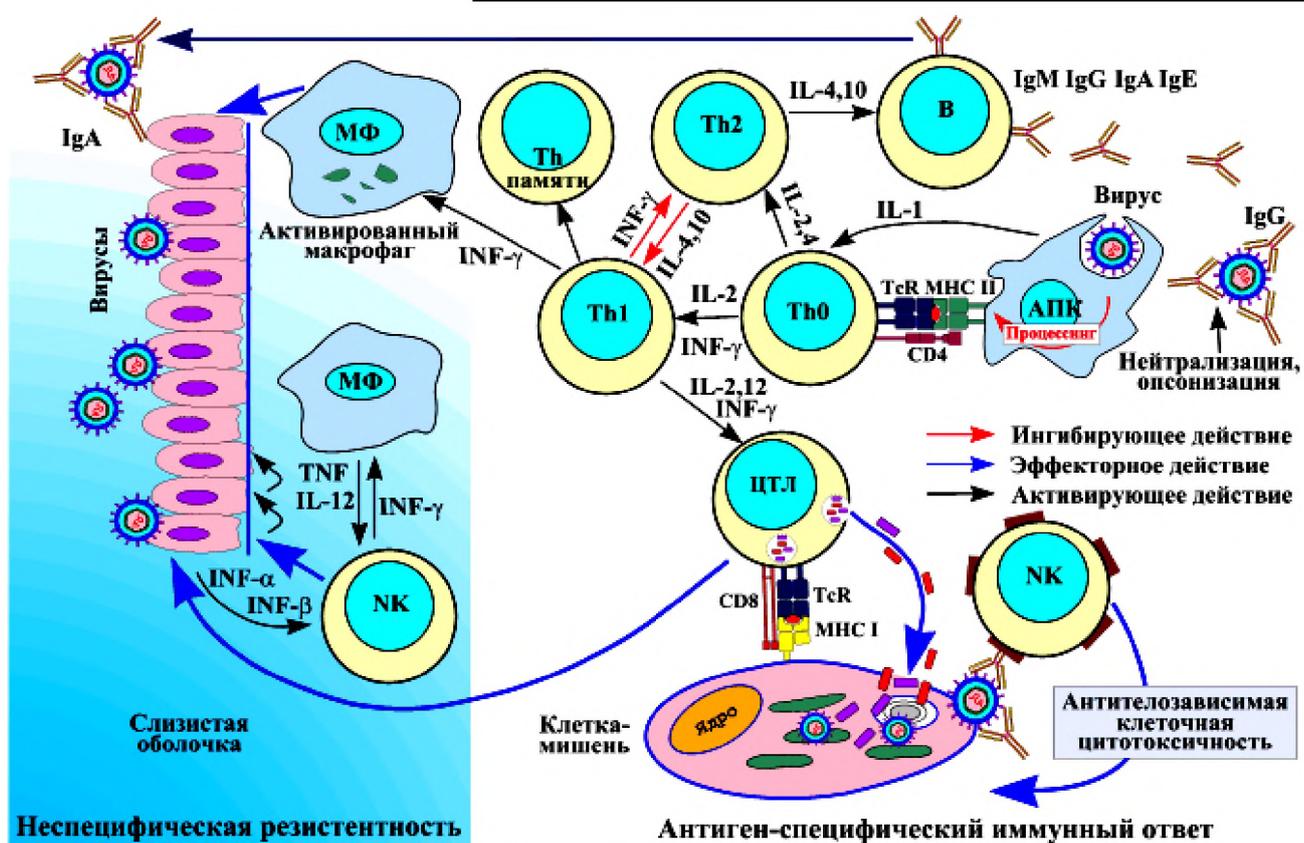


Рисунок 14 – Иммунитет при вирусных инфекциях

[<https://medicine-live.ru>]

Антитела не оказывают влияния на вирус, находящийся внутри зараженной клетки. В этом случае на вирусы, находящиеся в зараженной клетке, в организме образуются цитотоксические Т-лимфоциты. Их цитотоксическая активность ограничена только зараженными вирусом клетками. По совокупности особенностей и вследствие внутриклеточного размножения вирусов при вирусных инфекциях особая роль принадлежит клеточному иммунитету.

На роль механизмов клеточного иммунитета в защите от вирусов указывает и тот факт, что при большинстве вирусных инфекций возникает гиперчувствительность замедленного типа. Кроме сенсibilизированных Т-лимфоцитов при внедрении вируса в клетку включаются К-киллеры и природные киллеры, особенно при вирусных болезнях, отличающихся коротким инкубационным периодом (грипп, парагрипп).

Существуют также вирусы, которые, несмотря на иммунный ответ, пожизненно персистируют в организме хозяина (вирус ИНАН, простого герпеса и др.). Они могут интегрироваться в геном клетки хозяина без проявления клинических признаков.

Контрольные вопросы

1. Что понимают под термином «иммунитет»? Какие подходы к классификации иммунитета существуют?
2. Какие органы иммунной системы у млекопитающих и птиц относятся к центральным и периферическим? Какие функции они выполняют?
3. Что такое антигены? Каковы их основные свойства? Какие бывают антигены?
4. Что относится к неспецифическим и специфическим факторам защиты?
5. Чем индуцибельные факторы защиты отличаются от конститутивных?
6. В чем заключается механизм иммунного ответа?
7. Чем отличается проявление иммунитета при бактериальных и вирусных инфекциях?

2. ПРОИЗВОДСТВО БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ АКТИВНОЙ ИММУНИЗАЦИИ

2.1. Исторические аспекты вакцинопрофилактики

Предотвращение распространения инфекций с помощью иммунизации является одним из величайших достижений человечества в области медицины и ветеринарии. Большое значение для сельского хозяйства и медицины имеют вакцины, которые вызывают активный иммунитет против инфекционных болезней. Термин «вакцина» произошел от латинского слова «*vassa*» – корова. Его ввел Луи Пастер в честь английского врача Эдварда Дженнера (1749–1823), которого можно считать пионером в области вакцинопрофилактики.

В конце XVIII века Эдвард Дженнер предложил способ защититься от натуральной оспы с помощью инокуляции коровьей оспы. В 1796 г. во время своей врачебной практики в сельской местности Э. Дженнер сумел связать воедино несколько общеизвестных фактов.

Во-первых, он заметил, что переболевшие оспой люди повторно ей не болели. Во-вторых, для него очевидным стало то, что аналогичным образом не болели натуральной оспой те лица, которые перенесли коровью оспу (и для коров, и для человека коровья оспа неопасна; у человека после нее могут остаться разве что легкие следы на руках). Наконец, в-третьих, из исторических документов Дженнер знал, что самые разные народы практиковали самодеятельные прививки от оспы. В Китае вкладывали в нос кусочки ваты, смоченные гноем оспенного больного. У народов Африки через кожу с помощью иглы продергивалась нитка, смоченная оспенным гноем. В ряде стран оспенные корочки растирались в порошок, который втирали в кожу либо вдвухвали в нос. После таких «прививок» многие люди заболевали, распространяя тяжелейшее эпидемическое заболевание. Другие действительно переносили оспу в легкой форме и такой ценой приобретали невосприимчивость. Все зависело от степени потери возбудителем оспы своей болезнетворности в высушенной корочке.

В течение многих лет предпринимались попытки найти приемлемые способы предотвращения оспы. Издревна было известно, что у человека, выжившего после этого заболевания, вырабатывалась устойчивость, и он уже вторично не заболевает. На востоке это наблюдение привело к практике прививок здо-



Рисунок 15 – Эдвард Энтони
Дженнер

[<https://upload.wikimedia.org>]

ровым людям тканей, взятых у человека, перенесшего слабую форму оспы. Это делалось в надежде, что привитый таким образом человек сам заболит лишь легкой формой оспы и после выздоровления обретет иммунитет.

Эта практика была принесена в Англию в начале XVIII века леди Мэри Уортли Монтегю и стала там обычной процедурой за много лет до Э. Дженнера. Самому Э. Дженнеру привили оспу в 8-летнем возрасте. Однако эта профилактическая мера имела существенный недостаток: большое количество привитых таким образом людей заболели не легкой формой оспы, а опасной, которая оставляла их обезображенными. Фактически же 2% привитых вообще умирали, поэтому стало ясным, что требовался иной способ профилактики этой опасной болезни.

Сопоставляя все эти сведения, тщательно обдумывая их, наблюдая за случаями заболеваний оспой людей и животных, Дженнер постепенно пришел к мысли, что можно искусственно заражать человека именно коровьей оспой и тем самым предохранять его от заболевания оспой натуральной. Мысль Дженнера была в том, что от коровьей оспы заведомо никто не умрет, зато получит защиту от натуральной оспы. То есть реализовывалось классическое правило иммунологии: нужно использовать легкую форму болезни, чтобы защититься от тяжелой.

В 1796 г. Э. Дженнер втер содержимое, взятое из пустул крестьянки Сары Нелмс, заразившейся коровьей оспой, в царапину на теле 8-летнего Джеймса Фиппса (1788–1853). У мальчика появилось легкое недомогание, которое прошло через несколько дней. Через полтора месяца Джеймсу Фиппсу была привита натуральная (человеческая) оспа, однако болезнь не развилась. Через несколько месяцев была сделана вторая прививка натуральной оспы, спустя 5 лет – третья, с аналогичными результатами.

Этот метод, придуманный во времена, когда еще не были открыты ни бактерии, ни вирусы, получил широкое распространение в Европе, а в дальнейшем лег в основу ликвидации оспы во всем мире.

Джеймса Фиппса нередко называют первым человеком, который был вакцинирован от натуральной оспы прививкой коровьей оспы, но это не соответствует действительности, поскольку до него такой процедуре подверглись несколько человек. Так, в 1774 г. применил сходную процедуру к трем членам своей семьи английский фермер из графства Дорсетшир по имени Бенджамин Джести, а в 1791 г. учитель из Киля Петер Плетт произвел такие прививки трем детям. Однако именно Э. Дженнер в 1798 г. издал брошюру с подробным описанием своего исследования (рисунок 16), и этот

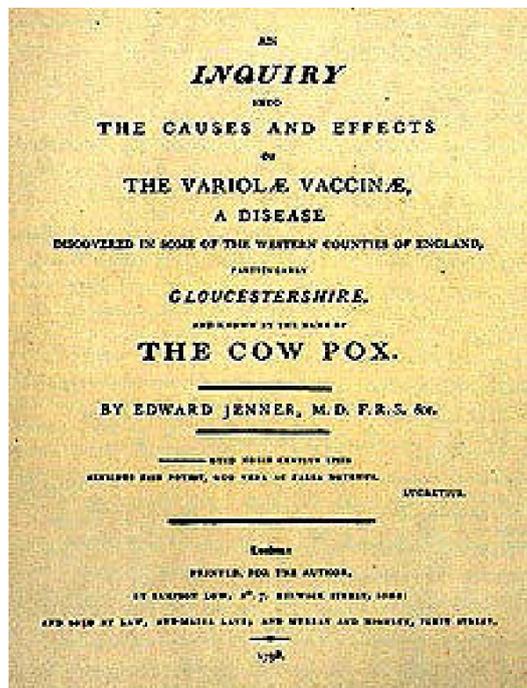


Рисунок 16 – Титульный лист книги Э. Дженнера о вакцине против оспы
[<https://upload.wikimedia.org/>]

труд стал первым опубликованным отчетом о вакцинации, сделавшим эту практику известной во всем мире.

Современники отнеслись к исследованиям Дженнера с осторожностью. Однако необходимость борьбы с болезнью заставляла людей все шире применять опыт Э. Дженнера. Фредерик, герцог Йоркский и Олбани, объявил оспопрививание по методу Дженнера обязательным для армии, а герцог Кларенс (будущий король Вильгельм IV) – для флота.

В XVIII веке оспопрививание пришло и в Россию. Смерть от оспы 15-летнего императора Петра II в 1730 г. заставила и русский двор обратить внимание на предохранительные прививки. В 1768 г. в Петербург был приглашен знаменитый английский оспопрививатель доктор Томас Димсдейл. Он успешно привил оспу Екатерине II и наследнику престола Павлу Петровичу, будущему императору Павлу I. С этого времени в России стали учреждаться оспопрививательные пункты. Первую в России противооспенную вакцинацию по методу Э. Дженнера в октябре 1801 г. провел доктор медицины Е. О. Мухин.

Однако лишь спустя столетие был предложен научный подход к вакцинации. Его автором стал знаменитый исследователь Л. Пастер, применивший свою концепцию инфекционных возбудителей для создания вакцины против холеры птиц, сибирской язвы и бешенства. Он показал, что опасность природных штаммов может быть целенаправленно снижена в лаборатории под воздействием неблагоприятных условий. Так патоген становится практически безопасным для человека или животных.

Летом 1879 г. Пастер отправился в долгую поездку, совершенно забыв об оставленной в открытой пробирке в лаборатории культуре птичьей холеры. Вернувшись из поездки, он ввел эту культуру нескольким курицам и обнаружил, что возбудитель во многом утратил свои смертоносные свойства: птицы, которым ввели ослабленные, или аттенуированные, бактерии, заболели, но не умерли. Однако вслед за этим Пастера ждало еще более важное открытие. Он подождал, когда курицы оправятся от болезни, ввел им смертельные бактерии птичьей холеры и обнаружил, что теперь они совершенно невосприимчивы к заболеванию. Пастер немедленно осознал, что открыл новый способ изготовления вакцин: введение ослабленных бактерий наделяло организм способностью сражаться и с активными смертельными формами.

Вдохновившись этим открытием, Пастер начал исследовать возможности применения нового подхода в изготовлении вакцин от других болезней. Его следующий успех был связан с сибирской язвой. Это заболевание наносило серьезный урон сельскому хозяйству, унося жизни 10-20% поголовья овец. Ранее Роберт Кох уже доказал, что сибирскую язву вызывают бактерии. Пастер хотел выяснить, можно ли ослабить их, сделать безвредными, но так, чтобы они

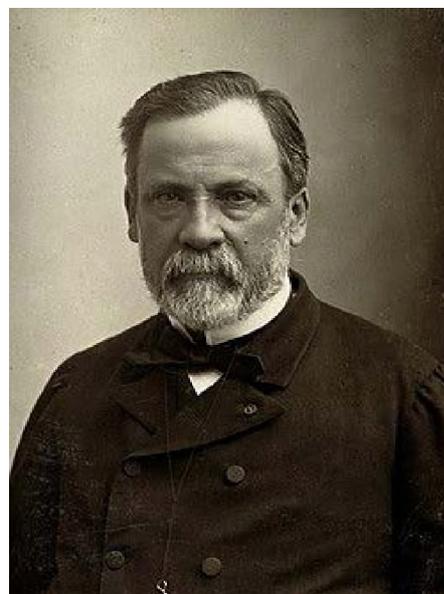


Рисунок 17 – Луи Пастер
[<https://upload.wikimedia.org>]

сохранили способность стимулировать защитные силы организма, в который будут введены в виде вакцины. Он добился нужного результата, выращивая бактерии при повышенной температуре. Популяризации исследований помог открытый эксперимент. Пастер с командой молодых ученых в присутствии толпы крестьян, журналистов и ветеринаров ввел вакцину 24 овцам, 6 коровам и 1 козе. Спустя 2 недели этим животным и такому же количеству непривитых животных ввели смертельную дозу бацилл сибирской язвы. Итог говорил сам за себя: из привитой группы умерла лишь 1 беременная овца, из непривитой же 23 умерли и 2 были близки к смерти.

Но, возможно, самым знаменитым достижением Пастера в этой области стало открытие антирабической вакцины (против бешенства) – первой его вакцины, предназначенной для человека. В то время бешенство было страшной болезнью и неизменно заканчивалось смертью. Никто не знал, что именно вызывает бешенство: болезнетворный вирус был слишком мал для тогдашних микроскопов, и его нельзя было вырастить в виде отдельной культуры. Но Пастер все же был убежден, что болезнь возбуждает какой-то микроорганизм, поражающий центральную нервную систему. Чтобы создать вакцину, Пастер культивировал неизвестного возбудителя в мозге кролика, ослабил его, высушив фрагменты ткани, и использовал их для изготовления вакцины. Первоначально Пастер не собирался испытывать экспериментальную вакцину на человеке, однако 6 июля 1885 г. ему пришлось изменить свое решение. В тот день к нему доставили девятилетнего Джозефа Мейстера со следами 14 укусов бешеной собаки на теле. Мать мальчика умоляла Пастера о помощи, и, сдавшись под ее напором, тот согласился ввести ребенку новую вакцину. Курс лечения (13 инъекций за 10 дней) оказался успешным, мальчик выжил.

2.2. Понятие о вакцинах

Вакцины – это биологические препараты, содержащие ослабленный или убитый инфекционный агент (либо его отдельные компоненты, несущие антигенные свойства), которые используются для усиления образования специфических антител, обеспечивающих образование активного иммунитета к данной инфекции.

Основным свойством вакцин является создание активного поствакцинального иммунитета, который по своему характеру и конечному эффекту соответствует постинфекционному иммунитету, иногда отличаясь от него лишь количественно.

В этом суть любой вакцины – сымитировать болезнь. Организм должен запомнить болезнь, не боля. Запомнив ее, он пресечет ее в зародыше, когда заражение произойдет по-настоящему.

Представим, что в организм проник опасный вирус. Когда инфекция только появляется в организме, иммунная система запускает неспецифическую программу защиты – систему врожденного иммунитета. Он борется не с конкретной бактерией или вирусом, а вообще против нераспознанного патогена. Врож-

денный иммунитет срабатывает очень быстро, однако такая неспецифическая защита не очень эффективна и зачастую не всегда безопасна для собственных тканей и органов.

В течение жизни организм приобретает адаптивный (приобретенный) иммунитет, который дополняет врожденный. Собственно, врожденный помогает активизироваться адаптивному.

Как иммунитету отличить «плохие» частицы от «хороших» и не уничтожить собственный организм? Для этого необходимо распознавание, а для того чтобы иммунная реакция активировалась, нужны 2 «триггера» (пусковых механизма):

- во-первых, в организме должно найтись чужеродное вещество (чаще белок) – антиген, которое должно отличаться от белков самого организма и быть достаточно сложноустроенным;
- во-вторых, организм должен получить сигнал опасности, чтобы оценить сам факт угрозы его гомеостазу, иначе иммунитет может случайно активироваться на пищу, пыльцу растений, пыль или на безопасную микрофлору кожи, как это происходит при аутоиммунных расстройствах. Таких сигналов опасности может быть много, и их разделяют на 2 группы: патоген-ассоциированные молекулярные фрагменты (PAMP) и повреждение-ассоциированные молекулярные фрагменты (DAMP), или *паттерны*. Чтобы подробнее их рассмотреть, необходимо понять значение последнего слова, происходящего из английского языка (*pattern*) и буквально означающего «шаблон, или кальку», с помощью которой проводится проверка правильности какой-либо выкройки или детали.

Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (фрагменты) – PAMP – это молекулы, которые часто встречаются у опасных микроорганизмов, и никогда не встречаются в здоровой внутренней среде. Например, мощным сигналом опасности являются молекулы липополисахаридов, являющиеся важным компонентом стенки примерно половины всех бактерий, начиная с кишечной палочки. Если эти молекулы обнаруживаются во внутренних тканях, то иммунитет немедленно активируется.

Дистресс-ассоциированные молекулярные паттерны (фрагменты) – DAMP – это молекулы самого организма, которые встречаются там, где их быть не должно (своеобразные «следы преступления»). Например, молекула ДНК находится внутри клеток и не должна свободно присутствовать за ее пределами. Когда клетки погибают из-за патогенного действия вируса, клеточная ДНК может оказаться в тканях, что организм воспринимает как угрозу, так как клетка подверглась лизису из-за действия внешней силы.

Однако иммунитет обычно активируется не сразу, а лишь через 1-2 недели с момента проникновения возбудителя в организм. Все это время патоген бесконтрольно развивается и может разрушить так много клеток, что ситуация станет необратимой, а иммунитет не только не спасет, но может еще и навредить организму. Например, может начаться пресловутый «цитокиновый шторм» – воспалительная реакция в организме, при которой уровень цитокинов в крови возрастает настолько сильно, что это приводит к атаке иммунитета на

собственные клетки и ткани самого организма, что еще больше приводит к лизису выживших клеток.

Чтобы этого не происходило, используются вакцины, которые помогают выработать иммунитет посредством моделирования инфекции. Задачей вакцинопрофилактики является познакомить организм с патогеном и дать ему выработать антитела, которые исключают заражение в будущем, но при этом она не может вызвать саму болезнь. По сути, вакцины помогают выиграть те самые одну-две недели, что в борьбе с быстро размножающимися патогенами может иметь решающее значение.

Вакцины при введении в организм вызывают ответную иммунную реакцию (рисунок 18), которая в зависимости от природы иммунитета и свойств антигена может носить выраженный гуморальный, клеточный или клеточно-гуморальный характер.

Формирование иммунного ответа на вакцину можно охарактеризовать 3 периодами:

- 1) *латентный период* – от введения вакцины до появления определяемых антител в сыворотке крови. Длительность латентного периода составляет несколько суток, что зависит от физико-химических параметров вакцинного препарата, способа введения вакцины и особенностей иммунной системы организма;
- 2) *фаза роста* – экспоненциальное увеличение содержания антител в сыворотке крови; ее продолжительность для разных вакцинных препаратов может колебаться от нескольких дней до 4 недель;
- 3) *фаза снижения* – наступает после достижения максимального уровня антител. Снижение уровня антител первоначально происходит относительно быстро, затем медленно угасает в течение нескольких лет или десятилетий, что зависит от скорости синтеза антител и периода их полураспада. Уровень IgM и IgA снижается быстрее, чем уровень долгоживущих IgG. В этом периоде возможно заболевание, поскольку протективный и поствакцинальный иммунитет падает до критического уровня, что определяет необходимость проведения ревакцинаций, дающих порою выраженный бустерный эффект.

Бустер-эффект (от англ. *booster* – усилитель) – повышенная продукция антител и других факторов иммунного ответа на вторичное усиливающее введение антигена после первичной иммунизации.

Эффективность вакцинации связана с индукцией протективного гуморального или клеточного иммунного ответа, который определяется особенностями структуры антигенов возбудителя, а также с характером взаимодействия микроорганизма с системой врожденного иммунитета.



Рисунок 18 – Механизм иммунного ответа при вакцинации
[<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/>]

Она определяется иммунологической реактивностью, зависящей от генетических и фенотипических особенностей организма, от качества антигена, дозы, кратности и интервала между прививками.

Поэтому для каждой вакцины разрабатывают схему вакцинации. Живые вакцины обычно используют однократно, неживые – чаще 2- или 3-кратно. Поствакцинальный иммунитет сохраняется после первичной вакцинации от 6 до 12 месяцев (для слабых вакцин) и до 5 и более лет (для сильных вакцин); поддерживается периодическими ревакцинациями.

В настоящее время успешно используются вакцины против патогенов, вызывающих остропротекающие инфекции. С развитием знаний о функционировании иммунной системы сфера применения вакцин постоянно расширяется. Разрабатываются препараты для иммунотерапии онкологических заболеваний. В перспективе – конструирование вакцин для лечения и предупреждения аллергии, аутоиммунных заболеваний.

С точки зрения молекулярной и клеточной иммунологии вакцины должны отвечать следующим требованиям:

- вакцины должны активировать вспомогательные клетки (макрофаги, дендритные клетки, клетки Лангерганса), участвующие в процессинге и презентации антигена;
- вакцины должны содержать эпитопы для Т- и В-клеток, обеспечивающие необходимое соотношение гуморального и клеточного иммунитета;
- вакцины должны легко подвергаться процессированию, а их эпитопы должны обладать способностью взаимодействовать с антигенами гистосовместимости I и II класса;
- вакцины должны индуцировать образование регуляторных клеток (киллеров Т-эффекторов гиперчувствительности замедленного типа, антителообразующих клеток) и клеток иммунной памяти.

Вакцины состоят из следующих компонентов:

- действующее начало (специфический антиген);
- вспомогательные вещества (стабилизаторы, консерванты, поверхностно-активные вещества, адъюванты, разбавители);
- побочные вещества, присутствие которых обусловлено технологией производства (гетерологичные белки субстрата культивирования, антибиотики, вносимые в культуру клеток при производстве вирусных вакцин, компоненты питательной среды, вещества, используемые для инактивации).

Специфические антигены, содержащиеся в вакцинах, в ответ на введение в организм вызывают развитие иммунологических реакций, обеспечивающих устойчивость организма к патогенным микроорганизмам.

В качестве антигенов при конструировании вакцин используют:

- живые ослабленные (аттенуированные) микроорганизмы;
- неживые (инактивированные, убитые) цельные бактериальные клетки или вирусные частицы;

- протективные антигены – извлеченные из микроорганизмов или вирусов структурные компоненты (по химической природе могут быть белками, гликопротеидами, липополисахаридобелковыми комплексами; они могут быть структурными компонентами микробной клетки (стрептококки и др.), секретироваться ими (бактериальные токсины), а у вирусов располагаются преимущественно в составе суперкапсида или капсида вириона);
- вторичные метаболиты – продукты жизнедеятельности микроорганизмов (токсины);
- антигены, полученные путем химического синтеза;
- антигены, полученные путем биосинтеза с применением методов генетической инженерии.

Консерванты предотвращают контаминацию вакцины после открытия флакона, если она используется для 2 и более инъекций. Некоторые вакцины не имеют консервантов, поскольку они хранятся в однодозовых флаконах, которые выкидываются после введения 1 дозы. Наиболее широко используемым консервантом является 2-феноксиэтанол, который используется в течение многих лет в ряде вакцин, т.к. малотоксичен и потому безопасен для использования в вакцинах.

Стабилизаторы предотвращают химические реакции внутри вакцины и удерживают компоненты вакцины от прилипания к флакону. В качестве стабилизаторов используются сахара (лактоза, сахароза), аминокислоты (глицин), желатин, белки (рекомбинантный альбумин, полученный из дрожжей).

Поверхностно-активные вещества сохраняют все ингредиенты вакцины в смешанном состоянии. Они предотвращают образование осадка и склеивание элементов, находящихся в жидкой форме вакцины.

Разбавитель – это жидкость, которая используется для разбавления вакцины до правильной концентрации непосредственно перед ее использованием. Чаще всего в качестве разбавителя используется вода для инъекций.

Адьюванты улучшают иммунную реакцию на вакцину иногда путем более длительного удержания вакцины в месте инъекции или стимулирования местных иммунных клеток.

Считается, что «идеальная» вакцина должна удовлетворять следующим требованиям:

- компоненты вакцины должны иметь точно установленную структуру;
- вводится 1 раз;
- должна создавать иммунитет ко многим инфекциям;
- должна обеспечивать пожизненный иммунитет у 100% привитых;
- должна быть безопасной;
- должна вводиться неинвазивным методом, удобным для медицинского персонала;
- должна быть стабильной и иметь длительный срок хранения;
- не должна нуждаться в соблюдении «холодовой цепи»;

- технология изготовления должна отвечать современным требованиям;
- должна быть доступной (не должна быть дорогой).

2.3. Классификация вакцин

В соответствии с природой специфического антигена вакцины подразделяются на живые и неживые.

Живые вакцины – это вакцины, содержащие жизнеспособные штаммы патогенных микроорганизмов, ослабленные до степени, исключающей возникновение заболевания, но полностью сохранившие антигенные свойства, обуславливающие формирование специфического иммунитета.

Различают такие типы живых вакцин, как дивергентные, аттенуированные и векторные.

Дивергентные вакцины – вакцины, действующим началом которых являются микроорганизмы, находящиеся в близком родстве с возбудителями инфекционных болезней. Антигены таких микроорганизмов индуцируют иммунный ответ, перекрестно направленный на антигены возбудителя. Наиболее известны и длительно применяются вакцина против натуральной оспы (из вируса коровьей оспы) и БЦЖ для профилактики туберкулеза (из микобактерий бычьего туберкулеза).

Аттенуированные вакцины – вакцины, действующим началом которых являются ослабленные тем или иным способом, потерявшие вирулентность, но сохранившие специфическую антигенность штаммы патогенных микроорганизмов. Введение вакцинного штамма в организм имитирует инфекционный процесс: микроорганизм размножается, вызывая развитие иммунных реакций. Наиболее известны вакцины для профилактики сибирской язвы, бруцеллеза, Ку-лихорадки, однако большая часть живых вакцин является противовирусными (против гриппа, кори, краснухи, аденовирусных инфекций).

Рекомбинантные векторные вакцины – вакцины, полученные генно-инженерным способом из непатогенных для организма рекомбинантных штаммов, несущих гены протективных антигенов патогенных микроорганизмов, способных при введении в организм размножаться, синтезировать специфический антиген и создавать иммунитет к патогенному возбудителю.

Неживые вакцины (инактивированные, убитые) – это вакцины, изготовленные из микроорганизмов, инактивированных (убитых) воздействием физических или химических факторов. Такие вакцины подразделяют на анатоксиновые, цельноклеточные, целновирионные и фракционные.

Анатоксиновые вакцины представляют собой молекулы токсинов (дифтерийный, столбнячный, ботулинический и др.), вырабатываемых токсикогенными микроорганизмами (болезнетворные свойства токсинов устраняются путем изменения структуры токсинов, в то время как индуцирующие иммунитет свойства сохраняются).

Цельноклеточные вакцины – вакцины, действующим началом которых являются убитые химическим или физическим методом культуры патогенных бактерий.

Цельновирсионные вакцины – вакцины, действующим началом которых являются убитые химическим или физическим методом культуры патогенных вирусов.

Цельноклеточные и цельновирсионные вакцины получают путем уничтожения микроорганизмов, культивируемых в питательной среде, путем применения тепла или химических веществ.

Фракционные вакцины – вакцины, которые содержат только определенные части инаktivированных микроорганизмов.

Фракционные вакцины подразделяются на 3 группы:

а) *вакцины на основе белка* включают очищенные микробные белковые структуры или микробные белковые структуры, полученные рекомбинантной технологией:

- расщепленные вакцины (сплит-вакцины) содержат разрушенные инаktivированные вирионы вируса гриппа (осколки разрушенных вирусных частиц со всеми наружными и внутренними антигенами вируса, включая балластные примеси);
- субъединичные вакцины содержат в качестве действующего начала извлеченные из патогенных бактерий (субклеточные вакцины) или патогенных вирусов (субвирсионные вакцины) комплексы, содержащие в своем составе протективные антигены (представляют собой компоненты микробной клетки или вируса, которые состоят из одного или нескольких очищенных поверхностных иммуногенных белков возбудителя);

б) *вакцины без генетической информации (VLP-вакцины)* содержат весь капсид вируса, но не содержат ни одного из его ферментов или нуклеиновых кислот (формируются в результате самосборки белков вирусных капсидов при их помещении в клеточную культуру);

в) *вакцины на основе полисахаридов* содержат в качестве действующего начала цепочки полисахаридов, образующих бактериальную капсулу:

- чистые полисахаридные вакцины содержат цепочки молекул полисахаридов, обнаруживаемых в капсуле ряда бактерий, и стимулируют выработку иммунного ответа против этой капсулы;
- конъюгированные полисахаридные вакцины связывают полисахаридную цепь с белком-носителем, который распознается Т-клетками, чтобы вызвать и усилить иммунный ответ.

В зависимости от числа содержащихся в вакцине антигенов вакцины подразделяются на моновакцины и ассоциированные.

Моновакцины – это вакцины, содержащие антиген возбудителя одной какой-либо инфекционной болезни.

Ассоциированные вакцины – это вакцинные препараты, состоящие из нескольких антигенов, предназначенные для одновременной иммунизации про-

тив нескольких инфекционных болезней. Они подразделяются на поливалентные (поливакцины) и комбинированные вакцины.

Поливалентные вакцины (поливакцины) – это ассоциированные вакцины, в состав которых входят однородные антигены (состоят из различных штаммов одного вида микроорганизмов).

Комбинированные вакцины – это ассоциированные вакцины, в состав которых входят разнородные антигены (предназначены для профилактики 2 и более различных видов инфекций).

2.4. Особенности технологии производства живых вакцин

Наиболее просты в изготовлении живые вакцины, так как технология в основном сводится к выращиванию аттенуированного вакцинного штамма с соблюдением условий, обеспечивающих получение чистых культур штамма, исключение возможностей загрязнения другими микроорганизмами (микоплазмы, онковирусы) с последующей стабилизацией и стандартизацией конечного препарата.

Вакцинальный процесс при введении живых вакцин сводится к размножению и генерализации аттенуированного штамма в организме привитого животного и вовлечению в процесс иммунной системы. Хотя по характеру поствакцинальных реакций при введении живых вакцин вакцинальный процесс и напоминает инфекционный, однако он отличается от него своим доброкачественным течением.

Иммунизация живыми вакцинами приводит к развитию вакцинального процесса, протекающего у большинства привитых без видимых клинических проявлений. Основное достоинство живых вакцин – полностью сохраненный набор антигенов возбудителя, что обеспечивает развитие длительной невосприимчивости даже после однократной иммунизации. Преимуществом живых вакцин считается активизация всех звеньев иммунной системы, вызывающая сбалансированный иммунный ответ (системный и локальный, гуморальный и клеточный). Для вакцинации используют небольшие дозы препарата, и поэтому вакцинацию легко организовать. Хотя живые вакцины требуют специальных условий хранения, они продуцируют достаточно эффективный клеточный и гуморальный иммунитет и обычно требуют только одного введения.

Однако живые вакцины имеют и ряд недостатков. Живые вакцины состоят из цельных живых микроорганизмов, поэтому помимо антигенов в ней содержится до 99% балластных компонентов, из-за чего достаточно реактогенны, вызывают мутации клеток организма (хромосомные aberrации), что особенно небезопасно для половых клеток. К сожалению, живые вакцины тяжело дозируются и трудно подлежат биологическому контролю, очень чувствительны к действию высоких температур и требуют тщательного поддержания холодной цепочки. В живых вакцинах нет консервантов, при работе с такими вакцинами следует строго соблюдать правила асептики. Нарушение целостности ампул и потеря вакуума приводит к инаktivации препарата в связи с проникновением

воздуха и влаги. Большинство живых вакцин вводится парентерально. Важным недостатком живых вакцин является возможность реверсии вирулентных форм, что может стать причиной заболевания вакцинированного, поэтому живые вакцины должны тщательно тестироваться и контролироваться.

Живые вакцины получают при использовании двух основных принципов, предложенных основателями учения о вакцинации Дженнером и Пастером:

- *принцип Дженнера* заключается в использовании генетически близких (родственных) штаммов возбудителей инфекционных заболеваний животных (осповакцина, вакцина БЦЖ, бруцеллезная вакцина);
- *принцип Пастера* основан на получении вакцин из искусственно ослабленных (аттенуированных) штаммов возбудителей (принцип заключается в получении штаммов с наследственно измененными признаками, т.е. низкой вирулентностью и сохранением иммуногенных свойств).

Вакцинные штаммы, предлагаемые для производства живых вакцин, должны удовлетворять следующим требованиям:

- относиться к авирулентным или слабовирулентным штаммам, независимо от способа их получения;
- обладать высокой антигенностью и иммуногенностью (для живых вакцин критерием иммуногенности является ее способность вызывать образование напряженного иммунитета не менее чем у 70% однократно вакцинированных животных);
- способность размножаться в определенных органах;
- кратковременная персистенция в организме привитого животного;
- генетическая стабильность фенотипических свойств (в особенности низкой вирулентности и высокой антигенности, даже при быстро следующих друг за другом пассажах на естественно восприимчивых видах животных);
- наличие генетических маркеров, позволяющих идентифицировать их от эпизоотических (полевых) штаммов возбудителей (более двух и независимых друг от друга);
- отсутствие инфекционности (контагиозности) в случае выделения вакцинного штамма из организма привитого животного (безвредность для других видов животных);
- стабильность при хранении;
- большая широта в дозировании – между минимальной и максимальной иммуногенными дозами (прививочную (оптимальную) дозу вакцины выражает количество живых микроорганизмов, содержащихся в единице объема; объем прививочной дозы должен быть не очень большим и не очень малым, чтобы обеспечить удобство введения препарата животному и точность дозирования);
- вакцинные штаммы вирусов должны иметь определенные титры активности (инфекционности) в конкретной биологической системе (макроорганизмах, эмбрионах птиц, культурах клеток и др.).

Живые ослабленные вакцины получают путем аттенуации вирулентности, с сохранением антигенной структуры и иммуногенности потенциально патогенных микроорганизмов (бруцеллы, возбудитель туляремии и др.).

Аттенуация (от лат. *attenuatio* – уменьшение) заключается в искусственном стойком ослаблении, уменьшении вирулентности возбудителей инфекционных болезней.

Аттенуация вирусов и бактерий широко используется при селекции штаммов, предназначенных для изготовления живых вакцин. Аттенуацию микроорганизмов осуществляют различными методами, основанными на адаптации возбудителя к организму невосприимчивых или мало восприимчивых в естественных условиях животных или же на приспособлении микроорганизма к неблагоприятным условиям культивирования, при которых последний подвергается воздействию химических, физических, биологических и других факторов.

Аттенуируются штаммы следующими способами:

- *физическим* (изменение температурного режима, осмотического градиента, воздействие ультрафиолетового излучения и др.);
- *химическим* (низкие концентрации антибиотиков, желчи, красителей и др.);
- *биологическим* (пассажем на невосприимчивых животных; пассажем на куриных эмбрионах и культуре тканевых клеток (в случае вирусов)).

При любом методе аттенуации снижается вирулентность вакцинного штамма для естественно восприимчивых к нему животных, и это вновь приобретенное свойство возбудителя должно быть наследственно закреплено.

При производстве живых вакцин предварительно подготавливается посевной материал и среда культивирования. Биомасса вакцинных штаммов нарабатывается в биореакторах глубинной ферментацией (бактерии, дрожжи) или поверхностной ферментацией на твердых питательных средах (мицелиальные грибы). Процессы выполняются в строго асептических условиях, исключающих контаминацию посторонней микрофлорой и фагами.

Вакцинные штаммы бактерий выращивают на жидких питательных средах (гидролизаты казеина или другие белково-углеводные среды) в ферментерах емкостью от 0,1 м³ до 1–2 м³. Полученная чистая культура вакцинного штамма подвергается лиофильному высушиванию с добавлением протекторов.

Вирусные и риккетсиозные живые вакцины получают выращиванием вакцинного штамма в эмбрионах кур или перепелов, свободных от вирусов лейкоза, либо в культурах клеток, лишенных микоплазм. Используют первично-трипсинизированные или перевиваемые диплоидные клетки.

Живые аттенуированные штаммы бактерий и вирусов, применяемые для приготовления живых вакцин, получены, как правило, из природных штаммов путем их селекции или пассажей через биологические системы (организм животных, эмбрионы кур, культуры клеток, питательные среды).

Биомассу аттенуированного штамма концентрируют, стандартизируют по количеству микроорганизмов в единице объема, лиофилизируют со стабилизирующей средой, фасуют в ампулы или флаконы.

Живые вакцины выпускаются в лиофилизированном виде. Срок хранения лиофилизированных живых вакцин 1–2 года при температуре +4...+8°C.

2.5. Особенности технологии производства рекомбинантных векторных вакцин

Рекомбинантная технология совершила прорыв в создании принципиально новых вакцин. Принцип создания рекомбинантных векторных вакцин заключается в том, что в геном живых аттенуированных вирусов, бактерий, дрожжей или клеток эукариотов встраивается ген, кодирующий образование протективного антигена того возбудителя, против которого будет направлена вакцина.

В качестве вакцин используются сами модифицированные микроорганизмы или протективный антиген, образующийся при их культивировании в условиях *in vitro*. В первом случае иммунный ответ направлен не только против продуктов встроеного гена, но и на носитель вектора.

Примером рекомбинантной вакцины, состоящей из готового антигена, является вакцина против гепатита В, а примером векторных вакцин, антигены которых образуются *in vivo*, является антирабическая вакцина. Она получена на основе осповакцины и нашла широкое применение в профилактике бешенства среди диких животных с помощью приманки, содержащей эту вакцину.

Для создания **вирусных векторных вакцин** (рисунок 19) используют аттенуированный ДНК-содержащий вирус, в геном которого встраивается необходимый предварительно клонированный ген.

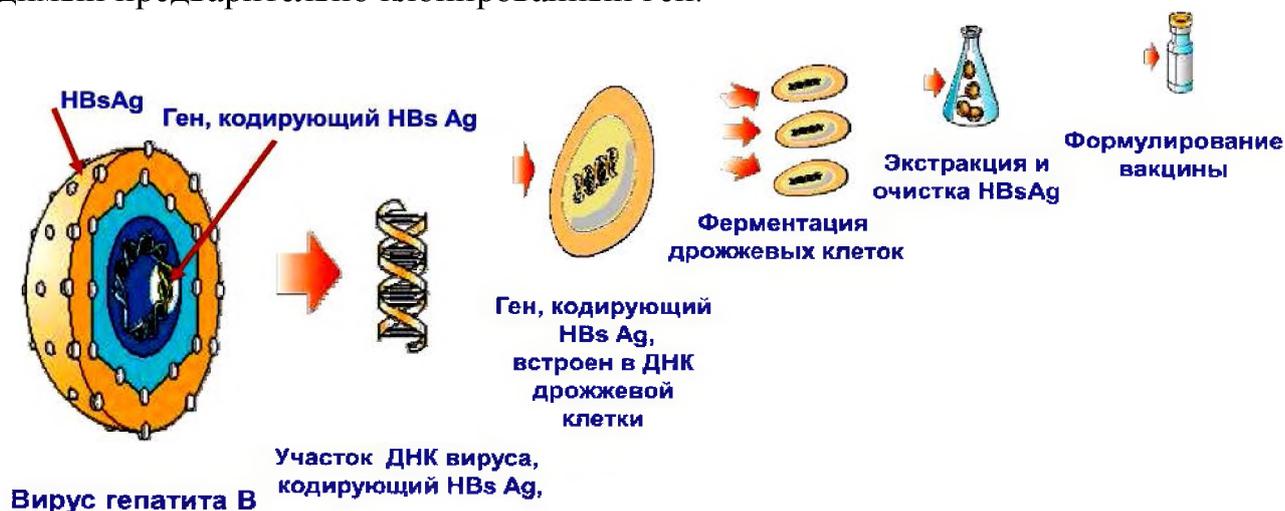


Рисунок 19 – Конструирование векторной вирусной вакцины
[<https://ppt-online.org>]

В качестве носителей вирусных векторов используют вирусы осповакцины, бакуловирусы, аттенуированные аденовирусы. Вирус, носитель вектора, активно размножается, а продукт встроеного гена обеспечивает формирование иммунитета. Вектор может содержать несколько встроеного генов, отвечающих за экспрессию соответствующих чужеродных антигенов.

Преимуществом использования вирусов в качестве вектора является более длительная персистенция вирусов в организме по сравнению с бактериями.

Принципы создания **бактериальных векторных вакцин** аналогичны. Важным этапом является клонирование генов и получение мутантных генов, кодирующих иммуногенные, но не токсические формы антигена. В качестве носителя бактериального вектора используется БЦЖ, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*.

Бактериальные векторные вакцины, в отличие от вирусных, можно контролировать с помощью антибиотиков.

Получать эффективную векторную вакцину на основе бактерий достаточно трудно из-за нестабильности трансфекции генного материала, токсичности чужеродного антигена для бактерий, малого количества экспрессированного антигена.

В настоящее время векторные вакцины широко используются в птицеводстве (*Вакситек* – против болезней Марека и Гамборо; *Вектомун* – против болезней Ньюкасла и Марека). Главным достоинством данных вакцин является то, что при подкожном применении у суточных цыплят происходит быстрая выработка иммунитета.

Сейчас стало очевидным, что многие рекомбинантные вакцины вызывают слабый иммунный ответ. Вероятно, причина в том, что в таких препаратах содержится «голый» белок и отсутствуют другие молекулярные структуры, часто необходимые для запуска иммунного ответа. Чтобы рекомбинантные вакцины вошли в практику, необходимо использование адъювантов, стимулирующих антигенную активность.

2.6. Особенности технологии производства инактивированных вакцин

При изготовлении неживых вакцин применяется инактивация патогенных микроорганизмов. При таком подходе все антигены возбудителя доступны для иммунной системы, в то время как сам он абсолютно безвреден. Этот метод приемлем в тех случаях, когда возбудитель не содержит высокотоксичных компонентов, а инактивация не нарушает структуры его антигенов.

Таким образом производится несколько антибактериальных и антивирусных вакцин, в том числе вакцины против гриппа, гепатита А, бешенства и др.

Из-за неспособности к размножению вакцины из убитых микроорганизмов в целом менее иммуногенны, чем препараты из ослабленных возбудителей. Для компенсации этого такие препараты обычно вводят в комплексе с адъювантом (например, солями алюминия), повышающим их эффективность.

Кроме того, убитые микроорганизмы не способны инициировать полноценный клеточный иммунитет (в особенности формирование цитотоксических Т-лимфоцитов) из-за недостаточной степени включения содержащихся в вакцинах экзогенных антигенов в механизм презентации эндогенных антигенов главного комплекса гистосовместимости I класса. Несмотря на это, вакцины из убитых возбудителей особенно эффективны для презентации конформационных эпитопов антител поверхности микроорганизмов.

Инактивированные вакцины легче дозировать, удобнее очищать, они длительно сохраняются и менее чувствительны к температурным колебаниям.

Для получения инактивированных (убитых) вакцин необходимо сохранить антигенные свойства исходной культуры, что требует сложных питательных сред и щадящих способов инактивации микроорганизмов.

Инактивированные корпускулярные вакцины менее эффективны по сравнению с живыми, поэтому для достижения напряженного иммунитета их нужно вводить в организм многократно (это на длительное время продлевает иммунизацию, что особенно нежелательно в условиях неблагоприятной эпизоотической обстановки). Наличие у инактивированных вакцин большого количества балластных веществ является причиной аллергических и других побочных реакций и отклонений при их введении.

Производство вакцин, содержащих убитые микроорганизмы, отличается от производства живых ослабленных вакцин лишь тем, что выделенные из культуральной среды возбудители инактивируют с помощью химических соединений.

Когда для изготовления вакцины используются инактивированные вирусы или материалы, выделенные из них, то в отношении образования антител обычно отмечается слабая реакция. Иммуногенность некоторых неживых вакцин повышается за счет введения адъювантов (от лат. *adjuvant* – помощник) – неспецифических иммуностимуляторов неорганической и органической природы, повышающих специфический иммунный ответ на антигены.

В качестве **адъювантов** используют:

- минеральные адъюванты (гидроксид алюминия, гель фосфата алюминия или кальция);
- растительные адъюванты (сапонины);
- микробные адъюванты (корпускулярные и субъединичные структуры, белки, нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы, липополисахаридобелковые комплексы);
- цитокины и пептиды со свойствами цитокинов (естественные цитокины, пептиды);
- синтетические вещества (полинуклеотиды, пептиды, гликопептиды, липопептиды, полиэлектролиты);
- препараты тимусного происхождения (Т-активин, тималин, тимолтин, тимактид, тимостимулин, вилозен);
- препараты костномозгового происхождения (миелопид и его пептиды);
- масляные эмульсии и составы на основе сурфактантов (адъювант Фрейнда и др.);
- химически чистые иммуномодуляторы (полиоксидоний);
- сложные искусственные адъювантные системы (липосомы, микрокапсулы).

Адъюванты, как правило, включают в состав субъединичных и молекулярных инактивированных вакцин.

Среди **механизмов действия** адъювантов выделяют следующие:

- образование депо в месте инъекции, что способствует увеличению времени контакта с антигеном;
- действие адъюванта в качестве системы доставки антигена, что стимулирует процессы поглощения антигена антигенпрезентирующими клетками;
- активация системы врожденного иммунитета за счет передачи сигналов через мембранные и внутриклеточные паттерн-распознающие рецепторы (PRRs), что приводит к активации транскрипционных факторов и адаптерных белков, опосредуя выработку провоспалительных цитокинов, хемокинов и интерферонов типа I;
- индукция секреции цитокинов и хемокинов, участвующих в активации и миграции иммунокомпетентных клеток;
- активация инфламмосомы NLRP3 (способствует формированию воспалительной реакции и индукции выработки провоспалительных цитокинов);
- стимуляция активации и созревания антигенпрезентирующих клеток (повышение экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости и костимулирующих молекул, что способствует эффективной активации наивных Т-клеток), стимуляция процесса презентации антигена;
- индукция развития клеточного и гуморального иммунного ответа;
- участие в реакции герминативных центров, стимуляция продукции высокоаффинных специфических IgG, стимуляция формирования В-клеток памяти при развитии гуморального иммунного ответа;
- стимуляция формирования центральных Т-клеток памяти и Т-эффекторных клеток памяти.

2.6.1. Особенности производства анатоксиновых вакцин

Анатоксиновые вакцины относятся к группе молекулярных вакцин, которые конструируют на основе специфических протективных антигенов, находящихся в молекулярном виде. В подобных препаратах антигенами служат молекулы метаболитов патогенных микроорганизмов. Наиболее часто в этом качестве выступают молекулы бактериальных экзотоксинов.

Анатоксины используют для активной иммунопрофилактики токсинемических инфекций (дифтерии, столбняка, ботулизма, газовой гангрены, стафилококковых инфекций и др.).

Целью применения анатоксинов является индукция иммунных реакций, направленных на нейтрализацию токсинов; в результате иммунизации синтезируются нейтрализующие антитела (антитоксины).

Обычным источником токсинов являются промышленно культивируемые естественные штаммы-продуценты (например, возбудители дифтерии, ботулизма, столбняка). Полученные токсины инактивируют термической обработкой либо формалином, в результате чего образуются анатоксины (токсоиды),

лишенные токсических свойств, но сохранившие иммуногенность. Анатоксины очищают, концентрируют и для усиления иммуногенных свойств адсорбируют на адьюванте (обычно, гидроксид алюминия). Адсорбция анатоксинов значительно повышает их иммуногенную активность. С одной стороны, образуется депо препарата в месте его введения с постепенным поступлением в кровоток, с другой – действие адьюванта стимулирует развитие иммунного ответа, в том числе и в регионарных лимфатических узлах.

Анатоксины выпускают в форме моно- (дифтерийный, столбнячный, стафилококковый) и ассоциированных (дифтерийно-столбнячный, ботулинический трианатоксин) препаратов.

Технология получения анатоксина включает ключевые этапы:

- выращивание токсигенных культур бактерий, вызывающих у пораженных животных токсинемические инфекции (столбняк, ботулизм, стафилококкоз и др.), в жидких питательных средах в определенном режиме для максимального накопления экзотоксина;
- отделение экзотоксина от бактерий и его обезвреживание (с этой целью на токсин комбинированно воздействуют формалином (0,3–0,5%) и температурой (+39...+40°C) в течение 28–30 суток);
- очистка анатоксина от бактериальных протеинов, белков питательной среды (что увеличивает его реактогенность и сенсibiliзирующие свойства);
- концентрирование анатоксина в небольшом объеме жидкости и адсорбция его на различных минеральных адсорбентах (например, на гидроксиде алюминия), что значительно повышает иммуногенную активность (это связано как с созданием «депо» препарата в месте введения, так и с адьювантным действием сорбента, вызывающего местное воспаление, усиление плазмоцитарной реакции в регионарных лимфатических узлах).

В настоящее время в качестве детоксицирующего средства, наряду с формальдегидом, широко используют β -пропиолактон, а также предложена обработка токсина протеолитическими ферментами (пепсином, трипсином, пролазой и папаином) с последующей фильтрацией на колонках с сефадексом Y-100 и Y-200.

Эффективность анатоксинов зависит не только от качества антигена, но также от формы препарата и метода применения. Анатоксины могут быть приготовлены в виде жидких, сухих, эмульгированных и сорбированных препаратов.

Анатоксины характеризуются достаточной иммуногенностью и специфичностью, создают прочный, активный, приобретенный иммунитет.

2.6.2. Особенности производства корпускулярных вакцин

Инактивированные корпускулярные *цельноклеточные* или *цельновирионные* вакцины получают соответственно из культур бактерий и вирусов, выращенных на тех же средах накопления, что и в случаях получения живых вак-

цин, и затем подвергнутых **инактивации** физическими (тепло, ультрафиолетовое и другие излучения) или химическими (фенол, спирт) методами.

Инактивированные корпускулярные вакцины, в отличие от живых, получают из производственных, предварительно отселекционированных, или свежевыделенных вирулентных и иммуногенных штаммов возбудителей.

Штаммы, предназначенные для изготовления инактивированных вакцин, должны отвечать следующим требованиям:

- должны представлять собой культуру типичного представителя определенного рода и вида микроорганизмов (обладать четко обозначенным набором свойств, позволяющих отнести этот штамм к данному роду и виду);
- должны сохранять высокую вирулентность (меру патогенности) в живом состоянии;
- производственные штаммы по антигенности и другим свойствам должны быть идентичными большинству культур, циркулирующих в естественных условиях и вызывающих инфекционные заболевания (эпизоотические штаммы);
- должны обладать высокими иммуногенными свойствами (т.е. вызывать состояние невосприимчивости к заражению живыми вирулентными культурами соответствующего вида или серологического варианта у соответствующих сельскохозяйственных и лабораторных животных).

Биохимический состав убитых бактерий, как правило, известен недостаточно хорошо, и они могут вызывать определенные побочные эффекты при попадании в организм. В отличие от них вирусы, выделяемые из надосадочной жидкости после разрушения выращенных в культуре клеток, практически не содержат клеточных компонентов. Кроме того, больший по сравнению с другими компонентами культуральных сред размер вирусных частиц обеспечивает возможность высокой степени очистки.

Эти характеристики инактивированных вакцин обеспечивают их выбор при необходимости индукции гуморального (антителозависимого) иммунитета против вирусных заболеваний.

Получение корпускулярных вакцин включает следующие этапы:

- подбор вакцинных штаммов;
- получение маточной культуры (посевного материала);
- приготовление и стерилизация питательной среды;
- выращивание биомассы (ферментацию осуществляют в асептических условиях в ферментерах периодическим методом глубинного культивирования);
- инактивация микробной взвеси;
- отделение клеток от культуральной жидкости;
- титрование вакцины (стандартизация);
- контроль стерильности (отсутствие живых клеток патогенного микроорганизма), безвредности (определение переносимости и токсич-

ности), эффективности (способность препарата формировать антибактериальный иммунитет);

- розлив в ампулы;
- лиофилизация;
- запайка ампул под вакуумом.

2.6.3. Особенности производства фракционных вакцин на основе белка

К этой группе вакцин относятся расщепленные (сплит) вакцины и белковые субъединичные вакцины.

Расщепленные (сплит) вакцины (рисунок 20) содержат разрушенные инактивированные вирионы вируса гриппа (как наружные, так и внутренние антигены вируса гриппа), при этом они избавлены от самого главного недостатка цельновирионных вакцин – наличия токсинов.

Вакцины из расщепленного вириона получают путем обработки эфиром цельной вирусной частицы. Такая вакцина содержит в себе осколки разрушенных вирусных частиц со всеми антигенами вируса, включая балластные примеси.

За счет высокой очистки в ней отсутствуют вирусные липиды и белки куриного эмбриона. Липиды при обработке вирионов этиловым эфиром в основном удаляются, что ведет к снижению пирогенных реакций и лучшей переносимости таких прививок.

Наличие открытых для иммунной системы внутренних антигенов вируса гриппа (нуклеокапсида и матриксного белка) делает сплит-вакцины уникальными. Они защищают не только от ежегодных мутаций вируса гриппа, но частично и от всех возможных разновидностей вируса, поскольку внутренние антигены подвержены лишь незначительным мутациям.

По сути дела, сплит-вакцины представляют собой «золотую середину» в профилактике гриппа, поскольку по уровню побочных реакций аналогичны субъединичным вакцинам, а по иммунологической эффективности – цельновирионным.

Белковые субъединичные вакцины (рисунок 20) состоят из одного или нескольких очищенных поверхностных иммуногенных белков возбудителя (эти части необходимы для выработки защитного иммунного ответа). Иммуногены могут быть взяты из разрушенного патогенного организма либо синтезированы в лабораторных условиях методами генной инженерии.

Недостаток данной технологии заключается в том, что изолированные белки при денатурации могут образовать связи с другими антителами, а не с белком патогена.

Субъединичные вакцины обладают высокой иммуногенностью только при условии правильного их приготовления. Высоко очищенная субъединичная вакцина почти полностью свободна от посторонних белков клеточной или вирусной природы.

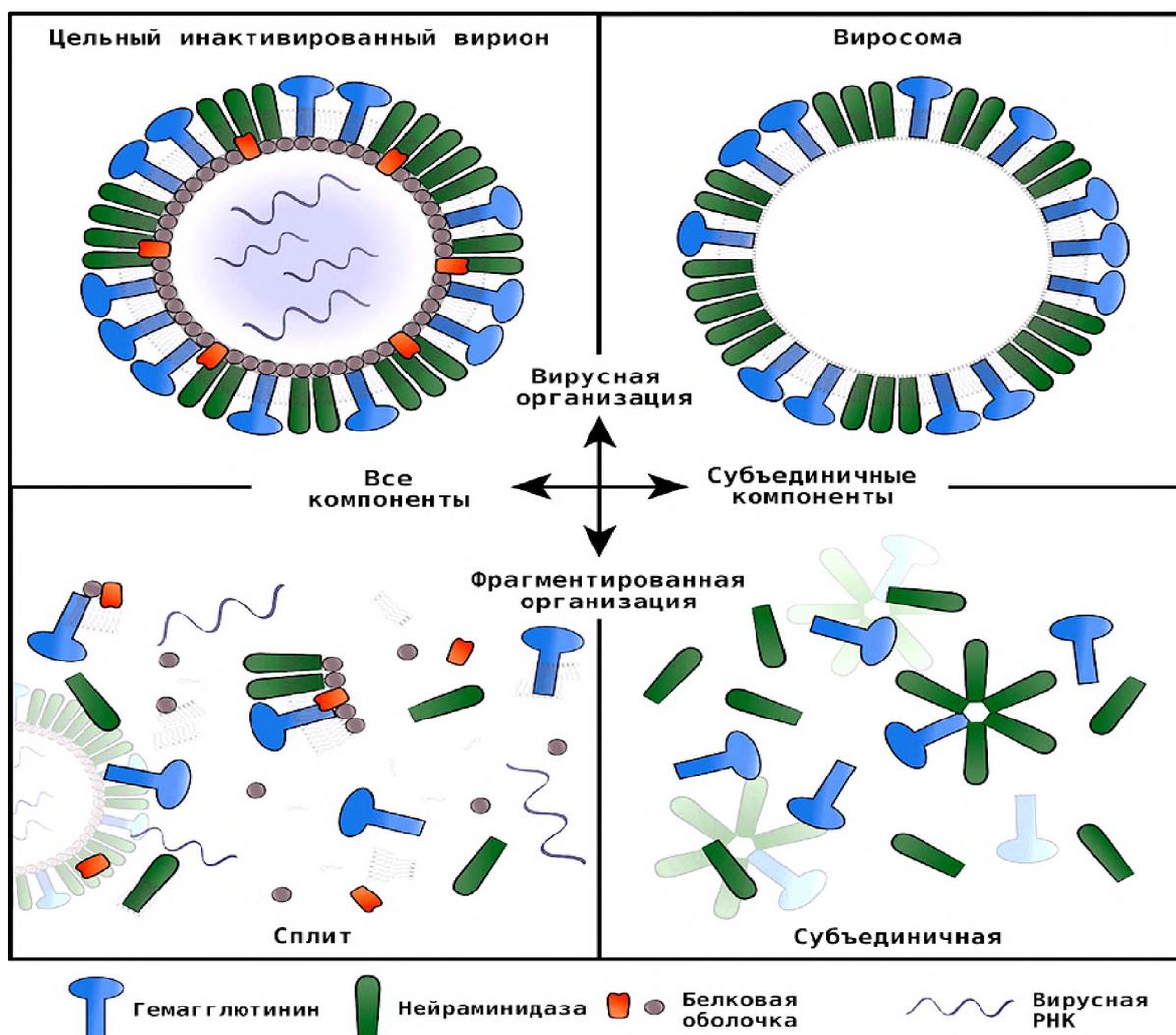


Рисунок 20 – Особенности конструирования фракционных вакцин
[\[https://biomolecula.ru\]](https://biomolecula.ru)

2.6.4. Особенности производства фракционных вакцин, не содержащих генетической информации

К этой группе вакцин относятся вакцины из вирусоподобных частиц (VLP – virus like particles).

Вирусоподобные частицы (рисунок 21) – это пустые частицы вирусов, состоящие из основных структурных белков, имитирующие организацию и конформацию нативных вирусов. Они формируются в результате самосборки белков вирусных капсидов при их помещении в клеточную культуру.

Вакцины на основе VLP обладают перед вакцинами других типов целым рядом преимуществ:

- сохраняется конформационная структура эпитопов, что обеспечивает эффективную активацию как гуморального, так и клеточного иммунного ответа, в том числе формирование специфических цитотоксических лимфоцитов;
- вирусоподобные частицы не содержат вирусных нуклеиновых кислот и не способны к самовоспроизведению, что обеспечивает их безопасность;

- эффективны при нанесении на слизистые оболочки, в том числе ротовой полости.

Существует много вариантов синтеза таких частиц. Для этого можно использовать культуры клеток млекопитающих, насекомых, растений, а также дрожжи и бактерии.

Это обеспечивает возможность подбора условий производства согласно специфическим требованиям, предъявляемым к каждому конкретному продукту.

Эффективная самосборка капсидов отдельных вирусов, а также корпускулярная природа вирусоподобных частиц значительно облегчают производство и очистку этого типа вакцин по сравнению растворимыми вакцинами на основе рекомбинантных белков.

На сегодняшний день сконструирован ряд VLP-вакцин (например, против ВИЧ, коронавирусов), которые вызывают образование вируснейтрализующих антител и стимулируют Т-клеточный цитотоксический ответ.

Создание VLP-вакцин является перспективным направлением, т.к. сохраняется конформационная структура эпитопов, что имеет значение для иммуногенности вакцин, а также отсутствует риск получения вирулентных ревертантов, что имеет место при применении живых аттенуированных вакцин.

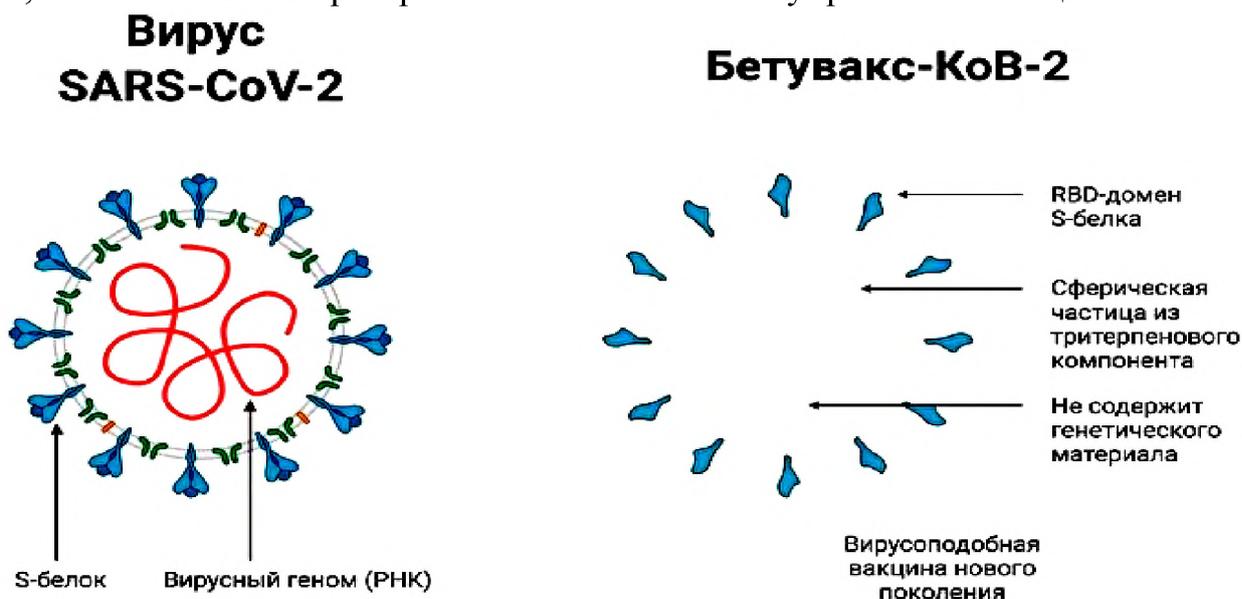


Рисунок 21 – Вирусоподобные частицы против коронавируса
[\[https://avatars.mds.yandex.net\]](https://avatars.mds.yandex.net)

2.6.5. Особенности производства фракционных вакцин на основе полисахаридов

К этой группе вакцин относятся чистые полисахаридные и конъюгированные полисахаридные вакцины.

Чистые полисахаридные вакцины содержат цепочки молекул сахаров (полисахаридов), обнаруживаемых в клеточной стенке ряда бактерий.

Некоторые патогенные бактерии защищены полисахаридной капсулой, которая помогает микроорганизмам уклониться от защитной системы организма человека. Полисахаридные вакцины стимулируют выработку иммунного ответа против этой капсулы.

Иммуногенность, присущая очищенным полисахаридным антигенам, выделенным из клеточных стенок бактерий, и безопасность их использования по сравнению с цельноклеточными бактериальными вакцинами в 1970-1980 гг. легли в основу разработки и последующего широкого применения бактериальных полисахаридных вакцин.

В качестве субстанции для производства данных вакцин производители используют очищенные, лиофильно высушенные капсульные полисахариды. Полисахаридный антиген вызывает серотип-специфический Т-независимый иммунный ответ с образованием антител класса М.

Однако наряду с несомненным достоинством этого типа вакцин (низкой реактогенностью) были отмечены ограничения в их применении: недостаточная иммуногенность и слабая способность к формированию иммунологической памяти.

Примерами таких вакцин являются менингококковые и пневмококковые полисахаридные вакцины, которые содержат полисахаридную оболочку (капсулу) инкапсулированной бактерии, которая очищена и уже не является инфекционной.

Конъюгированные субъединичные вакцины связывают полисахаридную цепь с белком-носителем, чтобы вызвать и усилить иммунный ответ.

Если полисахаридные антигены химически связаны (конъюгированы) с белком, который распознается Т-клетками, то конъюгированные вакцины могут вызвать выработку мощного иммунного ответа и иммунной памяти.

Способы получения конъюгата полисахарид-белок разнообразны и зависят от конкретного производителя:

- взаимодействие полисахарида с цианогенбромидом, затем с дигидразином адипиновой кислоты и дальнейшее связывание с белком-носителем;
- восстановительное аминирование с образованием оснований Шиффа (N-замещенные имины) из восстанавливающих концов полисахарида и боковых аминокислотных групп белка, при дальнейшем восстановлении этих иминов с помощью цианоборогидрида натрия;
- связывание полисахарида с носителем через бигенерические спейсеры, содержащие ковалентную тиоэфирную группу.

Вакцины против гемофильной инфекции типа b (Hib), пневмококковой инфекции (ПКВ-7, ПКВ-10, ПКВ-13) и менингококковой инфекции типа А являются конъюгированными вакцинами.

2.7. Современные подходы к конструированию вакцин

Со времени разработки Луи Пастером первых вакцин против пастереллеза, сибирской язвы и бешенства можно проследить смену нескольких поколений вакцинных препаратов:

- к препаратам *1-го поколения* относят вакцины, основу которых составляют живые аттенуированные или инактивированные корпускулярные антигены;
- к препаратам *2-го поколения* относят вакцины, основной состав которых представлен отдельными фракциями возбудителей болезни или продуктами их жизнедеятельности;
- к препаратам *3-го поколения* относят рекомбинантные векторные вакцины;
- к препаратам *4-го поколения* относят синтетические пептидные, форсифицированные, ДНК- и РНК-вакцины, VLP-вакцины, микрокапсулированные, липосомальные, антиидиотипические вакцины, а также вакцины, содержащие продукты генов гистосовместимости и некоторые др.

2.7.1. Синтетические пептидные вакцины

Синтетические пептидные вакцины – это препараты, содержащие искусственно синтезированные короткие пептиды, имитирующие небольшие участки протективных антигенов вируса, способные вызывать специфический иммунный ответ организма и защитить его от конкретного заболевания. Идентификация основных антигенных детерминант протективных антигенов многих вирусов позволила синтезировать антигенноактивные пептиды.

Синтетические пептидные вакцины являются одной из перспективных платформ для разработки средств профилактики инфекционных заболеваний. Технология создания пептидных вакцин предполагает использование современных биоинформатических средств, включая компьютерное моделирование.

Идея использования синтетических пептидов в качестве вакцин родилась при изучении клеточных и молекулярных механизмов развития иммунитета. Она исходила из логического представления, что экзогенные антигены путем эндоцитоза поступают в клетки организма, где расщепляются до пептидов, которые активируют клетки иммунной системы. Большинство природных антигенов представляют собой серию антигенных детерминант, каждая из которых способна вызывать иммунный ответ.

Изучение иммунизирующей активности коротких пептидных антигенов началось во второй половине XX века. Они оказались удобными аналогами для

изучения природных антигенов, т.к. их введение в организм вызывало сходные иммунологические реакции.

В 1974 г. М. Села впервые описал искусственно полученный пептид, вызывающий образование антител к белку лизоциму.

Идентификация антигенных детерминант, ответственных за иммуногенность многих патогенов, позволила синтезировать идентичные пептиды. Благодаря этому в дальнейшем была показана способность различных искусственных конструкций, созданных на основе синтетических пептидов, вызывать образование специфических антител и защиту животных от инфекционных заболеваний.

Наиболее значительные исследования по созданию синтетических пептидных вакцин проведены на модели вируса ящура. Такие препараты вызывали образование вируснейтрализующих антител у морских свинок и защиту у значительной части свиней и крупного рогатого скота при экспериментальном заражении вирулентным вирусом.

При определенных условиях синтетические пептиды могут обладать такими же свойствами, как и естественные антигены, выделенные из возбудителей инфекционных заболеваний. Молекула синтетических пептидных вакцин может содержать разнородные участки (эпитопы), которые способны формировать иммунитет к разным видам инфекций.

У синтетических пептидов нет недостатков, характерных для живых вакцин (реверсия вирулентности, остаточная вирулентность, неполная инактивация и т. п.). Синтетические вакцины обладают высокой степенью стандартности, слабой реактогенностью, они безопасны.

Анализ результатов лабораторных испытаний синтетических пептидов в качестве вакцин против различных инфекционных заболеваний показал, что многие из них обладают иммуногенными свойствами и вызывают образование специфических антител и защиту от заболеваний при экспериментальном заражении. Однако по выраженности они, как правило, значительно уступают существующим вакцинам.

Основная причина их недостаточной антигенной активности состоит в том, что короткие синтетические пептиды, в отличие от трехмерных эпитопов природных белков, не имеют соответственной конформационной организации (рисунок 22). Считается, что для иммунного ответа конформация более важна, чем линейная последовательность аминокислот и даже последо-

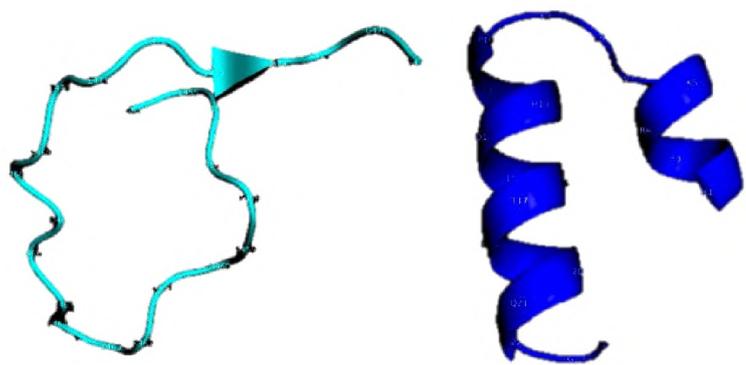


Рисунок 22 – Различия в пространственной структуре в белке реального вируса (слева) и пептида в вакцине (справа)

[<https://habrastorage.org>]

вательность антигенных детерминант. Этим объясняется известный факт, заключающийся в том, что циклизированные пептиды обладают большей иммуногенностью, чем их линейные аналоги.

Экспериментальные синтетические вакцины получены против дифтерии, холеры, стрептококковой инфекции, гепатита В, гриппа, ящура, клещевого энцефалита, против пневмококковой и сальмонеллезной инфекций.

2.7.2. Форсифицированные вакцины

Форсифицированные вакцины относятся к препаратам нового поколения, полученным путем химического ковалентного связывания (конъюгация) иммуномодуляторов с микробными антигенами, входящими в состав вакцин.

Использование иммуномодулирующих препаратов в вакцинопрофилактике диктуется необходимостью уменьшения дозы вводимого антигена. В качестве иммуномодуляторов используются некоторые синтетические полиэлектролиты, природные соединения и др. Эффект стимуляции антителогенеза полиэлектролитами связан с их способностью сорбироваться на клеточной мембране и прямо активировать деление и антигеннезависимую дифференцировку В-лимфоцитов.

К иммуномодуляторам, воздействующим на Т-систему иммунитета, относятся препараты, полученные из тимуса крупного рогатого скота (Т-активин и иммунофан), которые используются в качестве форсификаторов вакцинального процесса.

Перспективным может также оказаться совместное применение вакцинных препаратов и иммуностропных лекарственных средств, восстанавливающих реакции иммунитета, в том числе и способность к продукции антител.

Метод форсифицированной вакцинации можно считать актуальным, так как он открывает перспективы совершенствования вакцин в решении важного вопроса формирования протективного иммунитета, особенно при иммунодефицитных состояниях.

2.7.3. Микрокапсулированные вакцины

Микрокапсулированные вакцины созданы на основе инкапсуляции антигенов и антигенных эпитопов в биodeградируемые микросферы (рисунок 23), что позволяет доставить их к иммунокомпетентным клеткам и исключить возможность изменения их структуры под действием ферментов.

Преимуществом микросфер является возможность распадаться и освобождать антиген в заданное время.

Микрокапсулы состоят из нетоксичных неантигенных полимеров лактида или гликолида или их сополимеров, диаметр которых, как правило, не превышает 10 мкм.

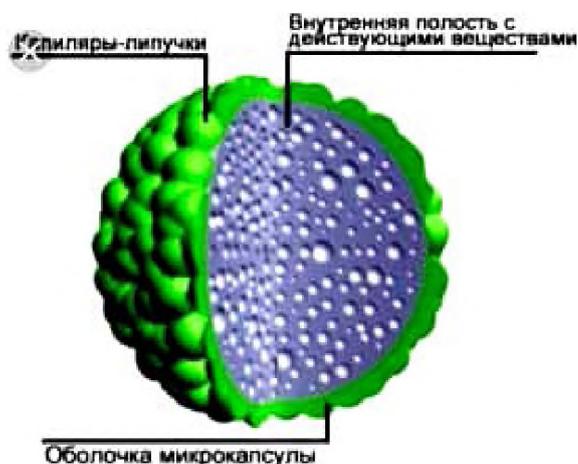


Рисунок 23 – Схематическое строение микрокапсулы

[<https://cucaracha.od.ua>]

Наиболее часто используют полимер *poly-DL-lactide-co-glycolide (PLGA)*. Он в организме подвергается биодegradации (гидролизу) с образованием молочной и гликолевой кислот, которые являются нормальными продуктами обмена веществ. В зависимости от размеров микросфер и от соотношения лактида к гликолиду в диполимере (чем больше лактида, тем медленнее процесс биодegradации) можно программировать скорость выделения антигена – от нескольких дней до нескольких месяцев.

Для инкапсулирования белковых антигенов с успехом применяют хитозановые частицы. *Хитозан* – природный полисахарид, получаемый из экзоскелета ракообразных, прост в производстве, инкапсуляция полипептидов может происходить как в процессе их образования, так и позднее – путем поверхностного поглощения, что значительно усиливает иммунный ответ организма на вакцинацию. Комбинированный с хитозаном материал повышает активацию антиген-презентирующих клеток, усиливает синтез цитокинов и вызывает пролиферацию антигенспецифических Т-клеток, или лимфоцитов – активных участников иммунного ответа. Поглощение инкапсулированных в хитозан антигенов дендритными клетками и макрофагами зависит от размера частиц, концентрации антигена и времени экспозиции.

Использование биодegradируемых микросфер позволяет провести одномоментную комплексную вакцинацию против нескольких инфекций. Каждая капсула может содержать несколько антигенов, а для иммунизации можно брать несколько различных капсул, что позволит значительно сократить количество инъекций.

При однократном применении смеси микросфер с коротким и длительным временем распада можно их использовать не только для первичной, но и для последующей вакцинации. Этот принцип был использован при разработке препарата столбнячного анатоксина и микрокапсульной формы инактивированной гриппозной вакцины, предназначенного для парентерального применения.

При использовании непарентерального пути введения микрокапсулированных вакцин (орально, интраназально, интравагинально) развивается не только гуморальный, но и местный иммунитет, который обусловлен продукцией иммуноглобулинов класса А. При оральном поступлении микросфера захватывается и транспортируется эпителиальными клетками пейеровых бляшек (М-клетками) в зависимости от их размера: при диаметре микросфер более 10 мкм они выделяются пейеровыми бляшками, с диаметром 5–10 мкм – остаются в них и утилизируются, а с диаметром менее 5 мкм – диссеминируются по системе циркуляции.

В качестве примера можно привести микрокапсулированную форму живой коревой вакцины, которая представлена частицами размером 0,2–10 мкм и обладает стабильными характеристиками. Заслуживает внимания микрокапсулированный вариант интраназальной вакцины против пандемического гриппа H1N1 с длительным сроком хранения, аналогов которой в мире не существует.

Инкапсуляция полипептидных антигенов в микрочастицы имеет следующие преимущества: частицы предотвращают дegradацию антигенов, облегчают поглощение химических агентов антиген-представляющими клетками, усили-

вают иммунный ответ непосредственно и с помощью воздействия адьювантов на основной антиген.

2.7.4. Липосомальные (липосомные) вакцины

Липосомальные (липосомные) вакцины представляют собой комплекс «антиген + липофильный носитель» (липосомы или липид-содержащие везикулы).

Липосомы (рисунок 24) – микроскопические пузырьки с двухслойной мембраной, состоящие из фосфолипидов, которые обеспечивают транспортирование антигенов к антигенпрезентирующим клеткам. Размеры липосом варьируют от 0,01 до 150 мкм. Для получения липосом широко используют технологию суперкритических растворов, которая позволяет получить многослойные липосомы, крупные и мелкие однослойные липосомы (от нескольких мкм до десятков нм – наносомы).

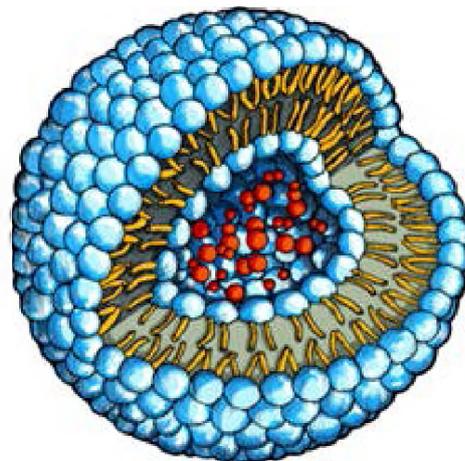


Рисунок 24 – Схематическое строение липосомы
[<http://himya.ru>]

Липосомы принято делить на анионные (заряженные отрицательно) и катионные (заряженные положительно).

Благодаря сходству с клеточными мембранами липосомы не токсичны, заключенное в них вещество защищено от разбавления и деградации в крови.

Антигены могут включаться в липосомы в растворимой водной фазе или прикрепляться к мембране, что обуславливает снижение их токсичности и более продолжительную циркуляцию. Антигены, включенные в состав поверхностной мембраны липосом, приобретают свойства адьюванта – потенцируют иммунный ответ на включенный в них бактериальный, вирусный или паразитарный антиген.

Механизм адьювантного действия липосом на инкорпорированный антиген точно неизвестен. Предполагают, что адьювантное свойство возникает благодаря медленному освобождению антигена и способности везикул со связанным антигеном мигрировать в региональные лимфатические узлы в месте инъекции и потенцировать иммунный ответ.

Используют также пришивание адресных молекул к поверхности липосом (например, антитела – к поверхностным белкам клеток-мишеней) для направленной доставки содержимого липосом. Если пришивают молекулы полиэтиленгликоля, то помимо защиты самих липосом от захвата клетками иммунной системы, увеличивается время нахождения липосом в кровотоке. Липосомы могут захватываться макрофагами (путем эндоцитоза с последующей деградацией их мембран) или сливаться с мембраной макрофагов, что приводит к экспонированию антигена на их поверхности. Это позволяет обеспечить липосомам целенаправленную доставку протективных антигенов в макрофаги различных органов, тем самым способствует повышению эффективности презентации антигена. При необходимости возможно в дальнейшем уточнить «адрес»

доставки вакцины благодаря встраиванию в липосомную мембрану вспомогательных сигнальных молекул.

Липосомальные вакцины стимулируют образование гуморального и клеточного иммунитета, а антигены, введенные внутрь липосом, усиливают иммунный ответ в 1000 раз.

В ветеринарной практике используют липосомальные вакцины против болезни Ньюкасла и реовирусной инфекции птиц. В Швейцарии разработана лицензированная липосомальная вакцина против гепатита А (Eрахal-Berna). На стадии испытаний находятся липосомальные вакцины для парентеральной иммунизации против гриппа, гепатита А и В, дифтерии, столбняка. США проводят клинические испытания липосомальной гриппозной вакцины из гемагглютинина и доклинические изучения липосомальной менингококковой В вакцины. Имеются публикации об успешной иммунизации липосомальными вакцинами через слизистые ЖКТ (вакцина эшерихиозная, шигеллезная Флекснера), в результате чего развивается не только общий, но и местный секреторный иммунитет.

2.7.5. ДНК-вакцины

Новый подход, позволяющий индуцировать у организма иммунный ответ без введения антигена, привел к появлению нового типа вакцин – ДНК-вакцин.

Принцип применения ДНК-вакцин заключается в том, что в организм вводят не белок-антиген, а нуклеиновую кислоту (ДНК), в которой закодирована информация о белке. Фрагменты ДНК вирусов и бактерий, имплантированные в клетки животных, способны синтезировать собственные белки (антигены). Сами клетки, получившие гены другого организма, в ответ начинают вырабатывать антитела на вновь синтезируемые белки.

Эксперименты по созданию ДНК-вакцин преимущественно ведутся с бактериальными плазмидами, которые содержатся вне хромосом. Плазмиды хороши в том плане, что сами по себе не провоцируют развитие инфекции. Их используют в качестве вектора.

Для получения ДНК-вакцин ген, кодирующий продукцию иммуногенного протеина какого-либо микроорганизма, встраивают в бактериальную плазмиду. Кроме гена, кодирующего вакцинирующий протеин, в плазмиду встраивают генетические элементы, которые необходимы для экспрессии («включения») этого гена в клетках эукариотов, в том числе животных, для обеспечения синтеза белка. Такую плазмиду вводят в культуру бактериальных клеток, чтобы получить большое количество копий. Затем плазмидную ДНК выделяют из бактерий, очищают от других молекул ДНК и примесей. Очищенная молекула ДНК и служит вакциной (рисунок 25).

Введение ДНК-вакцины обеспечивает синтез чужеродных протеинов клетками вакцинируемого организма, что приводит к последующей выработке иммунитета против соответствующего возбудителя.

При этом плазмиды, содержащие соответствующий ген, не встраиваются в ДНК хромосом животных.

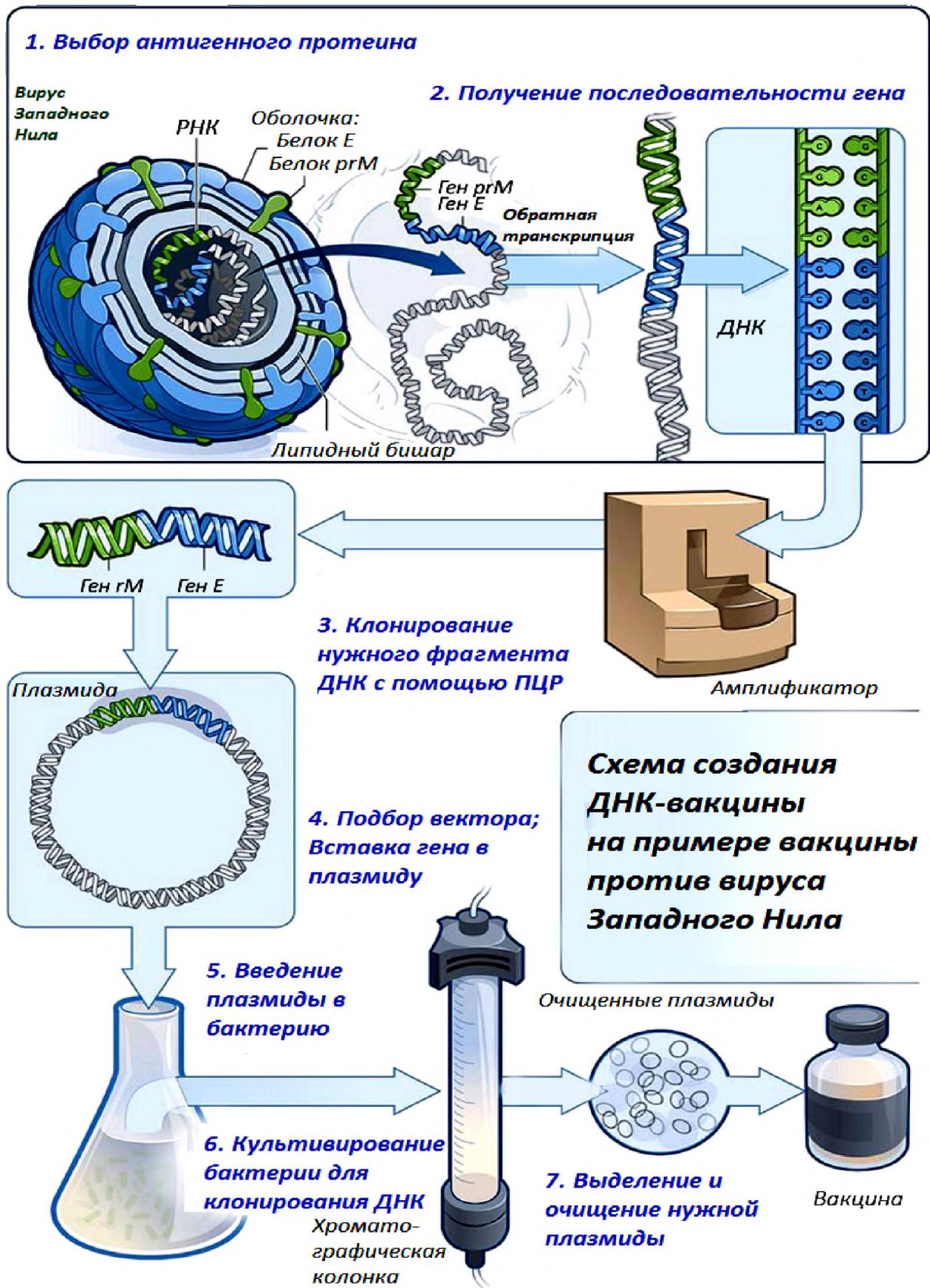


Рисунок 25 – Конструирование ДНК-вакцины против вируса Западного Нила
 [https://ru.wikipedia.org]

ДНК-вакцины вызывают более слабый иммунный ответ по сравнению с цельновирионными. Для повышения иммуногенности ДНК-вакцин применяют:

- включение иммуностимулирующих нуклеотидных последовательностей в ДНК-конструкцию;
- адьюванты;
- усовершенствованные методы доставки.

Доставка ДНК-вакцин осуществляется в антигенпрезентирующие клетки (макрофаги, дендритные клетки, В-лимфоциты), в которых будет происходить синтез и посттрансляционная модификация антигена, после чего он будет встроен в мембрану клетки, чтобы привлечь внимание иммунной системы.

Методы доставки генетического материала в клетку обычно разделяют на 2 группы: вирусные (посредством векторов) и невирусные (микроинъекции, электропорация, сонопорация, баллистическая трансфекция и др.).

Микроинъекции (рисунок 26). Для этого ДНК растворяют в воде или изотоническом растворе, при необходимости добавляют адьювант (вещество, которое усиливает иммунный ответ). Далее с помощью тонкой стеклянной трубки раствор вводят в мышечную ткань, где роль антигенпрезентирующих клеток выполняют дендритные клетки. Попав в ядро дендритной клетки, вакцина начинает экспрессировать, и происходит синтез белков-антигенов.

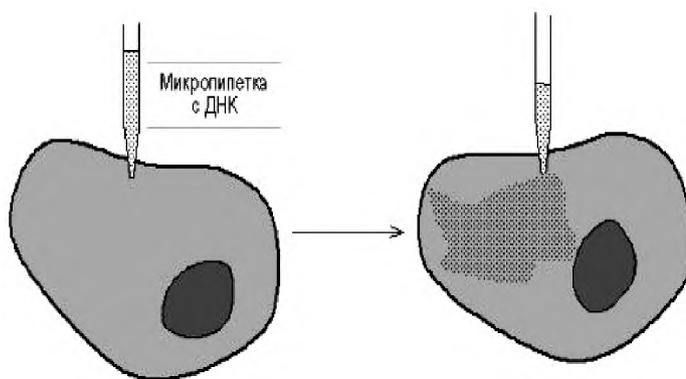


Рисунок 26 – Микроинъекции
[<https://nanotech.academic.ru>]

С помощью микроинъекций ДНК также можно вводить подкожно, в тимус, печень, опухолевую ткань, однако именно в мышечной ткани наблюдается наиболее длительная (до 1 года) экспрессия ДНК-вакцины. Благодаря высокой концентрации клеток Лангерганса (подтип дендритных клеток), привлекательной мишенью для ДНК-вакцинации является кожа. Для интрадермального (подкожного) введения используют массив из микроигл, длина которых несколько сотен микрометров.

Эффективность этого метода обычно низкая, поскольку сначала ДНК попадает в межклеточное пространство, а уже потом включается в клетки.

Электропорация (рисунок 27) – традиционный подход для доставки ДНК в бактериальные клетки и культуры клеток, который базируется на применении электрического импульса. Такой импульс создает поры в клеточной мембране, что способствует вхождению отрицательно заряженной ДНК. Электрический ток перегруппировывает липиды плазмалеммы таким образом, что образуется гидрофильный (сверху) или гидрофобный (снизу) канал. Прохождение гидрофильной молекулы ДНК возможно только через верхний вариант поры.

Прибор для электропорации имеет источник электрического тока и одноразовую сетку, которая состоит из шприца и игл-электродов. Шприц вводит вакцину в мышечную ткань, а электроды создают электрическое поле, которое облегчает вхождение ДНК в миоциты и дендритные клетки.

Электропорацию можно применять как для внутримышечного, так и для подкожного введения ДНК-вакцины.

Этот способ позволяет значительно повысить эффективность обычной инъекции. Действие электрического поля не только усиливает поглощение ДНК-вакцины клетками, но и стимулирует выработку иммунного ответа. Применение электропорации приводит к незначительному повреждению ткани – развивается локальный воспалительный процесс. Поврежденные клетки выделяют хемокины, поэтому к ним направляются макрофаги, лимфоциты и дендритные клетки. Увеличение концентрации иммунных клеток в месте введения вакцины повышает ее эффективность.

Недостатками являются незначительная болезненность в месте инъекции, необходимость в специализированных устройствах.

Вместо электрического поля можно использовать магнитное. Такие устройства действуют по тому же принципу, однако в этом случае процедура является полностью безболезненной и меньше повреждает клетки.

Сонопорация – метод переноса чужеродной ДНК в клетки с помощью ультразвука. Ультразвук увеличивает проницаемость клеточной мембраны, вследствие чего экзогенная ДНК легче проникает в клетку. Этот метод применяется для ввода молекул ДНК в клетки роговицы, мозга, костной ткани, почек, поджелудочной железы, эмбриональной ткани, скелетной и сердечной мышц.

Баллистическая трансфекция (биологическая баллистика) основывается на обстреливании (бомбардировке) органов и тканей микрочастицами тяжелых металлов (золото, вольфрам) диаметром 1-3 мкм, покрытых молекулами ДНК (рисунок 28). Введенная таким образом ДНК-вакцина экспрессируется в клетках-мишенях, а их продукты попадают в кровь. Для придания ускорения частицам используется специальное устройство – генная пушка. Микрочастицы проходят через клеточные мембраны и переносят генетическую конструкцию непосредственно в ядро клетки.

Глубина проникновения микрочастиц, как правило, невелика – до 1 мм, поэтому метод применяют преимущественно для трансфекции кожи или прилегающей хрящевой ткани. Особые условия обстрела позволяют микрочастицам проникать на глубину до 4–5 мм и переносить генные конструкции в волокна

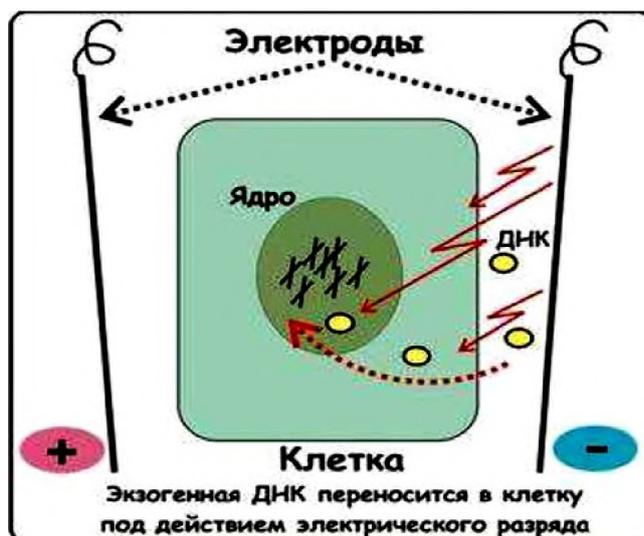


Рисунок 27 – Электропорация
[<https://cf.ppt-online.org>]

поперечно-полосатых мышц. Обычно клетки, находящиеся непосредственно по центру выстрела, погибают, в то время когда в зоне 0,6–1 см от центра находятся наиболее удачно протрансформированные клетки.

На сегодня для доставки ДНК используют частицы из золота или серебра, т.к. они не являются токсичными для клетки, в отличие от вольфрамовых.

Действие высокого давления. В 1999 г. были разработаны инъекционные приборы, которые способны вводить ДНК-вакцину без использования иглы. Такие устройства работают благодаря силе Лоренца: небольшой мощный магнит создает значительное давление, проводит в действие поршень, который выбрасывает лекарственный препарат со скоростью звука. Изменяя силу тока, можно выбирать глубину инъекции и дозировать лекарства. Процедура совершенно безболезненна и раньше использовалась для введения инсулина больным диабетом и при проведении масштабных вакцинаций.

Существенным недостатком этого метода является то, что высокое давление теоретически может изменять структуру вводимых молекул.

На сегодня разработаны приборы, которые могут доставить ДНК на глубину до 16 мм, в составе живого бактериального вектора.

Живые бактериальные векторы – это штаммы сальмонелл, шигелл или листерии, которые несут мутации в генах биосинтеза или инвазии, что устраняет их патогенность и способность сохранять свою жизнеспособность в организме хозяина или окружающей среде. Взамен в геном бактерий встраивают нужные гены иммуногенных протеинов.

Ослабленная бактерия вводится в организм пероральным путем (через рот, путем проглатывания) или интраназально (путем впрыска в носовое отверстие), поэтому этот способ вакцинации не требует никакого оборудования. Кроме того, такое введение стимулирует иммунный ответ слизистой оболочки, что важно, поскольку большинство патогенов попадают в организм через ротовое и назальное отверстия. Минуя желудок, ослабленные бактерии попадают в тонкий кишечник. Далее бактерии проникают в Пейеровы бляшки, где становятся мишенью для макрофагов и подвергаются фагоцитозу. В цитоплазме макрофагов происходит высвобождение бактериями ДНК-вакцины, после чего ДНК попадает в ядро, а бактерии обезвреживаются иммунной системой.

ДНК-вакцины обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными вакцинами:

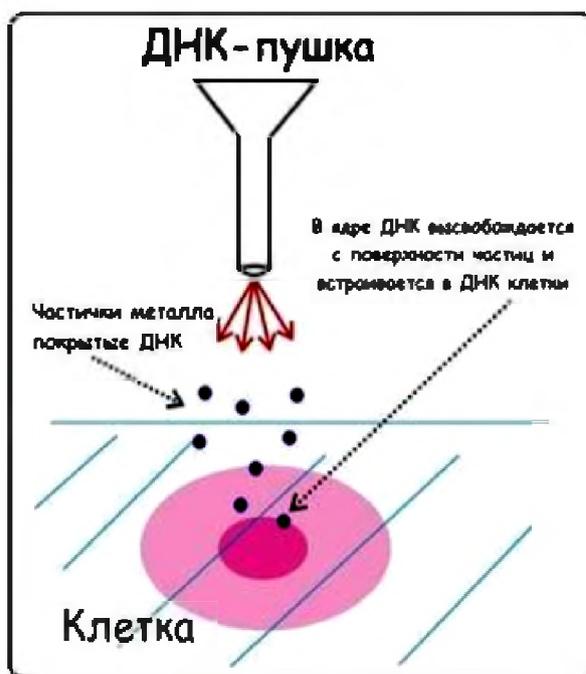


Рисунок 28 – Баллистическая трансфекция

[<https://thepresentation.ru>]

- способствуют выработке антител к нативной молекуле вирусных протеинов;
- способствуют выработке цитотоксических Т-лимфоцитов;
- могут избирательно воздействовать на различные субпопуляции Т-лимфоцитов;
- способствуют формированию длительного иммунитета;
- устраняют риск инфицирования.

Реальная возможность использовать эту технологию в медицине и ветеринарии появилась в середине 90-х гг. XX века. Новый подход достаточно прост, дешев и, самое главное, универсален.

Используя один и тот же плазмидный или вирусный вектор, можно создавать вакцины против различных инфекционных болезней, меняя только последовательность, кодирующую необходимые белки-антигены. При этом отпадает необходимость работать с опасными вирусами и бактериями, становится ненужной сложная и дорогостоящая процедура очистки белков. Препараты ДНК-вакцин не требуют специальных условий хранения и доставки, они стабильны длительное время при комнатной температуре.

Уже разработаны и испытываются ДНК-вакцины против инфекций, вызываемых вирусами гепатитов В и С, гриппа, лимфоцитарного хориоменингита, бешенства, иммунодефицита человека (ВИЧ), японского энцефалита, а также возбудителями сальмонеллеза, туберкулеза и некоторых паразитарных заболеваний (лейшманиоз, малярия). Эти инфекции крайне опасны для человечества, а попытки создать против них надежные вакцинные препараты классическими методами оказались безуспешными.

ДНК-вакцинация – одно из самых перспективных направлений в борьбе с раком. В опухоль можно вводить разные гены: те, что кодируют раковые антигены, гены цитокинов и иммуномодуляторов.

2.7.6. РНК-вакцины

РНК-вакцины – вакцины, действующей частью которых является обычно матричная рибонуклеиновая кислота (мРНК), кодирующая белок, характерный для патогена. Помимо собственно РНК, в вакцине присутствует липидная оболочка, защищающая РНК от разрушения и обеспечивающая проникновение РНК в клетку.

Когда вакцинная РНК попадает в клетку, клеточные механизмы синтеза белков продуцируют закодированный в РНК белок. Этот белок действует как антиген: его обнаруживает иммунная система организма и обучается на этом белке – в организме формируется иммунитет. В дальнейшем, при попадании в организм патогена, иммунная система опознает его по уже известному белку и уничтожает инфекцию, не давая развиться заболеванию (рисунок 29).

РНК-вакцины могут быть разработаны против всех белковых антигенов, поскольку после вакцинации РНК-вакциной во время трансляции из матрицы РНК образуется белок. Белки могут происходить, например, из вирусов, бактерий или опухолей (опухолевый антиген).

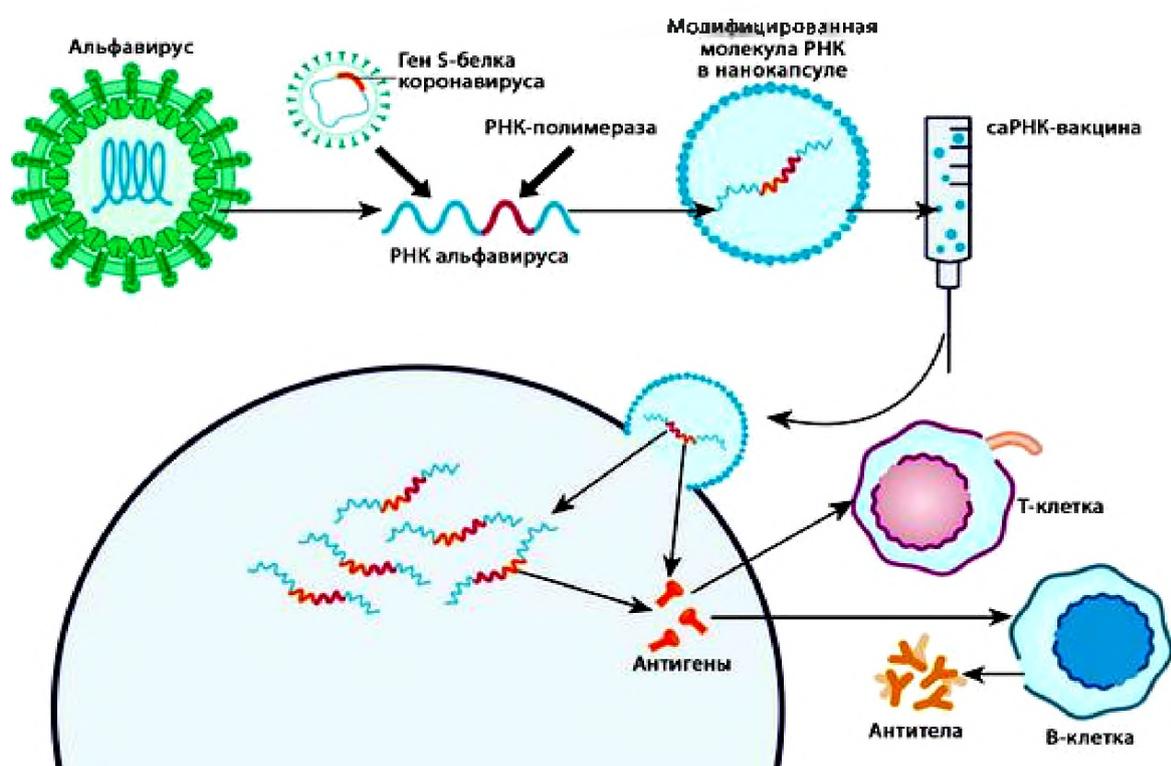


Рисунок 29 – Принцип действия РНК-вакцин
 [https://cdn21.img.ria.ru]

Использование РНК-вакцин для иммунизации против вирусных инфекционных заболеваний означает, что в организм больше не вводятся репродуктивные патогены или их фрагменты, как в случае неживых вакцин, а только мРНК антигенов с вспомогательным веществом, которое вводит РНК в клетки (реагент для трансфекции). Если трансфицированные мРНК клетки временно представляют этот компонент вируса, с которым необходимо бороться, иммунная система учится расщеплять антиген и, в случае реальной инфекции, защищать его от естественного патогена, в результате чего человек или животное приобретают иммунитет.

Чтобы создать мРНК-вакцину против вируса, не нужен сам вирус, достаточно иметь его секвенированный и расшифрованный геном. Вакцинная мРНК создается на основе короткой генетической последовательности из генома вируса, которая кодирует белок вируса (обычно поверхностный, с помощью которого вирус проникает в клетку). Синтезированная мРНК помещается в липидную наночастицу, которая доставляет вакцинную мРНК внутрь клетки. Внутри клетки мРНК взаимодействует с генетическим механизмом клетки, и он синтезирует закодированный в ней вирусный белок. Затем этот белок выходит на поверхность клетки, и иммунная система организма начинает на него реагировать, в процессе этой реакции вырабатывается иммунный ответ на вирусный белок.

Для создания РНК-вакцин применяются 2 основных подхода:

- использование нереплицирующейся мРНК, кодирующей, как правило, только 1 антиген;

- получение самоамплифицирующегося РНК-репликона из одноцепочечных (+/-)РНК вирусов, в геноме которых структурные гены заменены на гены, кодирующие необходимые антигены и РНК-полимеразу.

Вакцины на основе мРНК получают путем транскрипции *in vitro* из линейной ДНК-матрицы, в качестве которой выступает плазида, с использованием различных РНК-полимераз бактериофагов.

При использовании мРНК нет проблем с иммунным ответом на вектор, который часто препятствует повторному введению других вакцин. Кроме того, мРНК не может интегрироваться в геном клетки организма.

2.7.7. Вакцины, содержащие продукты генов гистосовместимости

Иммунный ответ к крупномолекулярным антигенам начинается с процессинга антигена вспомогательными клетками. Пептиды, образующиеся из антигена, не обладают выраженной иммуногенностью, но приобретают ее после взаимодействия с продуктами (антигенами) генов гистосовместимости I или II классов. Отсутствие таких продуктов является одной из основных генетических причин слабой иммунной реакции организма на вакцину.

Каждой инфекции соответствует свой набор антигенов гистосовместимости, отвечающий за высокий уровень иммунного ответа.

Отсутствие на клетках таких антигенов является одной из основных генетических причин слабой иммунной реакции. Введение в организм молекул гистосовместимости, несущих пептиды, соответствующие эпитопам инфекционных агентов, способствует усилению иммунитета.

Введение в организм молекул гистосовместимости, несущих пептиды, соответствующие эпитопам инфекционных агентов, способствует усилению иммунитета. При вакцинации протективные пептиды антигенов презентуются Т-лимфоцитам в комплексе с антигенами главного комплекса гистосовместимости. Причем, каждый протективный эпитоп может презентироваться с высоким уровнем иммунного ответа только определенным продуктам главного комплекса гистосовместимости (ГКГ). Для эффективной презентации антигена в состав вакцин рекомендуют вводить готовые антигены главного комплекса гистосовместимости или их комплексы с протективными эпитопами.

Доказана возможность индукции гуморального иммунитета с помощью конъюгатов, состоящих из пептидов (полученных из вирусов, бактерий, опухолей) и моноклональных антител к антигенам гистосовместимости класса II. Антитела доставляют вакцину к продуктам генов гистосовместимости. Вместо моноклональных антител можно использовать искусственно синтезированные пептиды, которые хорошо взаимодействуют с антигенами ГКГ.

На стадиях разработок находятся вакцины против цитомегаловирусной инфекции и онкологических заболеваний (меланомы, рака простаты, папилломы). Клинические испытания проходят вакцины следующих вариантов: комплекс антигенов главного комплекса гистосовместимости I класса с антигенами вируса гепатита В; комплекс олигопептида и моноклональных антител к антигенам главного комплекса гистосовместимости II класса.

По предварительным данным, вакцина, представляющая собой комплекс антигенов гистосовместимости класса I с антигенами вируса гепатита В, вызывает сильный ответ цитотоксических лимфоцитов и может способствовать усилению иммунитета у больных гепатитом В.

2.7.8. Антиидиотипические вакцины

Антиидиотипические вакцины – вакцины, полученные из гомологичных или гетерологичных идиотипов (структур, характеризующих индивидуальные антигенные свойства V-области молекулы антител и клеточных рецепторов).

Когда нативный антиген непригоден для иммунизации, можно использовать антиидиотипические вакцины.

Антиидиотипические антитела являются зеркальным отражением антигена и поэтому способны вызывать образование антител и цитотоксических клеток, реагирующих с антигеном.

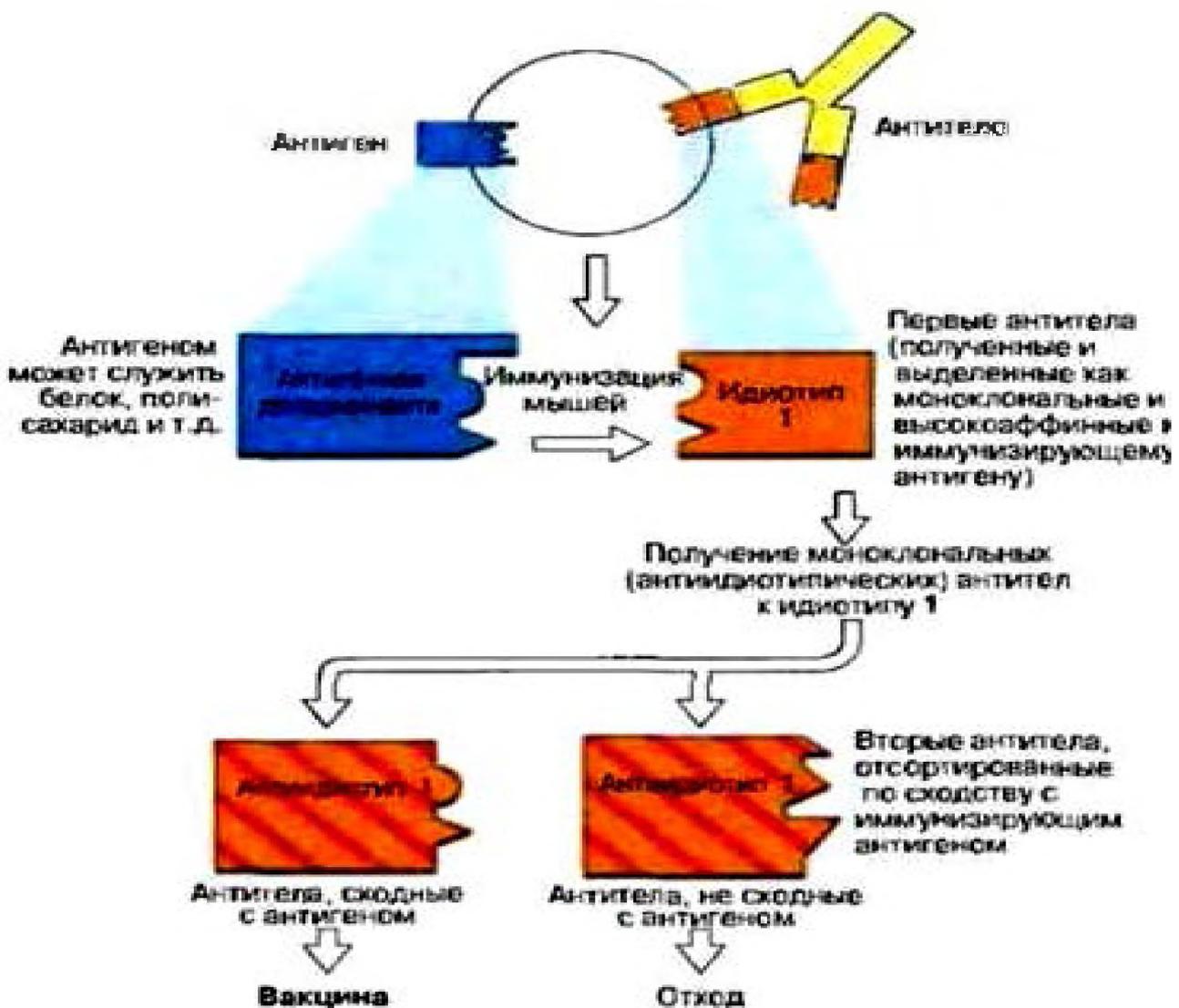


Рисунок 30 – Получение антиидиотипических вакцин

[<https://lifelib.info>]

Это единственный тип вакцин, созданный исключительно на основе теоретических представлений. Идея состоит в получении большого количества анти-

идиотипических моноклональных антител против V-области (идиотипа) иммуноглобулина, заведомо обладающего защитной активностью. Отобранные соответствующим образом антиидиотипические антитела будут по пространственной конфигурации подобны эпитопам исходного иммунизирующего антигена и пригодны для использования с целью активной иммунизации вместо него.

Такая стратегия, хотя и воспринимается нередко скептически, все же может оказаться действительно эффективной в тех случаях, когда сам по себе нативный антиген непригоден, т. е. не обладает иммуногенностью, как, например, некоторые бактериальные полисахариды или липид А из бактериального эндотоксина (липополисахарида). При этом моноклональные антитела имеют то преимущество, что они как белки должны индуцировать иммунологическую память, которой полисахариды и липиды обычно не вызывают.

Вакцины на основе антиидиотипических антител безопасны, т.к. идиотипы являются естественными эндогенными регуляторами иммунного ответа.

Получены экспериментальные антиидиотипические вакцины к возбудителям вирусных, бактериальных и паразитарных заболеваний.

2.8. Этапы разработки и тестирования вакцин

Разработка вакцины – долгий и дорогостоящий процесс. Разработка вакцины может растянуться на годы. Например, над препаратом от лихорадки Эбола ученые трудились почти 6 лет.

Прежде чем выйти на рынок, вакцина должна пройти ряд этапов.

1. Базовые исследования:

- базовые лабораторные исследования возбудителя;
- выбор первоначальной конструкции препарата.

2. Доклинические исследования:

- испытания на клеточных культурах (*in vitro*);
- опыты на лабораторных животных (*in vivo*);
- оценка безопасности и эффективности препарата;
- выявление серьезных побочных эффектов;
- определение максимальной переносимой дозы.

3. Клинические испытания обычно включают 3 фазы, однако в некоторых случаях для сокращения сроков испытаний несколько фаз испытаний объединяют в 1 фазу.

1-я фаза (участвуют обычно до 100 человек):

- оценка безопасности и переносимости препарата;
- выявление серьезных побочных эффектов;
- изучение иммунного ответа;

2-я фаза (участвует целевая возрастная группа из 100-1000 человек):

- оценка эффективности препарата;
- выявление других побочных эффектов;

- определение оптимальной дозы, способа и частоты введения;
- 3-я фаза (участвует целевая возрастная группа более 1000 человек):
- оценка эффективности препарата;
 - сравнение вакцины-кандидата с плацебо.
4. Госконтроль и регистрация:
- проведение независимых испытаний;
 - регистрация препарата;
 - сертификация производства.
5. Дальнейшие исследования:
- оценка безопасности и эффективности препарата;
 - выявление других побочных эффектов;
 - регулярные госпроверки производства;
 - контроль за качеством вакцин.

Контрольные вопросы

1. Что такое вакцины?
2. С именами каких ученых связано изобретение вакцин?
3. Какие требования предъявляются к вакцинам?
4. Какие компоненты входят в состав вакцин?
5. Как происходит формирование иммунного ответа на введение вакцин в организм?
6. Каким образом классифицируются вакцины?
7. Чем отличаются вакцины живые и инактивированные?
8. В чем заключаются особенности технологии производства живых вакцин?
9. В чем заключаются особенности технологии производства рекомбинантных векторных вакцин?
10. В чем заключаются особенности технологии производства инактивированных вакцин?
11. Охарактеризуйте современные подходы к конструированию вакцин.
12. Какие этапы разработки и тестирования в вакцинном производстве?

3. ПРОИЗВОДСТВО БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПАССИВНОЙ ИММУНИЗАЦИИ

3.1. Особенности производства гипериммунных сывороток

Гипериммунные (специфические) сыворотки представляют собой сыворотки крови животных, систематически иммунизированных бактериальными или вирусными антигенами, содержащие антитела, обладающие строго специфическим действием на бактериальные токсины, патогенные бактерии или вирусы, против которых иммунизировали животных.

Гипериммунные сыворотки по *направлению действия* подразделяются на:

- *лечебные сыворотки* – применяются для создания искусственного пассивного иммунитета для лечения инфекционных заболеваний;
- *профилактические сыворотки* – применяются для создания искусственного пассивного иммунитета для профилактики инфекционных заболеваний;
- *диагностические сыворотки* – применяются для идентификации патогенных микроорганизмов и других антигенов.

Лечебно-профилактические гипериммунные сыворотки по *природе антигена* подразделяются на:

- *антитоксические сыворотки* – применяются для профилактики и лечения инфекций, в основе развития которых лежит действие экзотоксинов, нейтрализуя их (применяют для профилактики и лечения столбняка, ботулизма, злокачественного отека на ранних сроках заболевания, т.к. антитоксины не оказывают лечебного действия и могут лишь предотвратить развитие интоксикации);
- *антибактериальные сыворотки* – применяются для профилактики и лечения бактериальных инфекций;
- *противовирусные сыворотки* – применяются для профилактики и лечения вирусных инфекций, а также возможных поствакцинальных осложнений после введения вакцин против этих инфекций.

Гипериммунные сыворотки помимо применения в качестве специфических средств терапии и профилактики при инфекционных болезнях служат сырьем для получения специфических и неспецифических иммуноглобулинов, а из отходов их производства получают гидролизаты белков, используемые в качестве основы питательных сред для выращивания клеточных линий и гибридом.

На получение высокоэффективных лечебно-профилактических сывороток влияют такие факторы, как:

- качество применяемых антигенов;
- неспецифические раздражители и адъюванты;
- индивидуальные особенности животных-продуцентов;

- метод и схемы гипериммунизации;
- содержание и кормление животных в период их подготовки и эксплуатации.

Получение гипериммунных сывороток осуществляется в несколько этапов (рисунок 31).



Рисунок 31 – Этапы производства гипериммунных сывороток

Для *приготовления антигенов* должны использоваться штаммы микроорганизмов, обладающие хорошо выраженными антигенными и иммуногенными свойствами.

Качество антигенов во многом зависит от их чистоты (неконтаминированность их посторонней микрофлорой, в том числе агентами вирусной природы, а также степень очистки антигенов от балластных белков), состояния суспензии микробных клеток, ее объема и концентрации.

При изготовлении гипериммунных сывороток применяют антигены, специфическое действие которых усилено адьювантными веществами, в качестве которых используют гель гидроокиси алюминия, алюмокалиевые квасцы и др. При этом большое значение имеет качество адьювантов – их чистота по отношению к содержанию побочных химических соединений, качество и стойкость образования геля, полнота адсорбции антигенов и т.д. При изготовлении большинства противовирусных гипериммунных сывороток используют антигены без адьювантов, т.к. такие антигены готовятся из вирусосодержащих суспензий, из тканей куриных эмбрионов, лабораторных животных или клеточных культур.

Отбор животных-производителей. Для приготовления гипериммунных сывороток чаще всего используют крупный рогатый скот (волы) и лошадей. Можно использовать коров, ослов, овец, коз, свиней.

Животных, применяемых для получения сывороток, завозят из стационарно благополучных по инфекционным болезням районов. При этом они должны

быть клинически здоровыми, средней и выше средней упитанности, свободными от накожных паразитов.

Всех завезенных на биофабрику животных выдерживают в карантине 45 суток. За это время их всесторонне обследуют с ежедневным двукратным (утром и вечером) измерением температуры тела, проверяют на пораженность гельминтами и при необходимости дегельминтизируют. Всех животных исследуют на инфекционные болезни, согласно требованиям нормативно-технической документации.

Волов используют для получения лечебно-профилактических сывороток против пастереллеза, сибирской язвы, рожи, анаэробных и других инфекций. Чаще используют животных красной степной, калмыцкой, симментальской, швицкой, астраханской и других пород в возрасте от 3 до 8 лет и массой не менее 350 кг. Их подвергают обязательному исследованию на туберкулез, бруцеллез, лептоспироз.

Лошадей используют для получения некоторых гипериммунных сывороток (противостолбнячной, противоботулинической, противодифтерийной и др.), нормальной сыворотки, сыворотки жеребых кобыл и желудочного сока. Чаще используют помеси донской и казахской пород в возрасте от 3 до 12 лет и массой от 450 до 500 кг. Их подвергают обязательному исследованию на сеп, инфекционную анемию, трихомоноз, бруцеллез, туберкулез, пироплазмидозы.

Свиней используют для получения противорожистой сыворотки. Чаще используют животных крупной белой породы в возрасте от 5 до 6 месяцев и массой не менее 80 кг. Их подвергают обязательному исследованию на туберкулез и бруцеллез.

Овец, баранов и валухов используют для получения некоторых диагностических (листериозных) и нормальных (для приготовления сывороточных сред с целью культивирования лептоспир) сывороток. Чаще используют животных в возрасте от 2 до 3 лет и массой от 30 до 45 кг. Их подвергают обязательному исследованию на бруцеллез, туберкулез, паратуберкулез.

Принято считать, что успех гипериммунизации в значительной степени зависит от породы и возраста животных. Более высокие титры антител получают при использовании для иммунизации породистых животных в возрасте от 3 до 10 лет. Пол животных не имеет существенного значения.

При отборе животных-продуцентов учитывают их физиологические и иммунобиологические показатели.

На активность выработки животным-продуцентом гипериммунной сыворотки антител влияют следующие факторы:

- тип нервной деятельности животного-продуцента;
- реактивность организма;
- порода;
- конституция;
- возраст.

Учитывая, что введение антигенов животным и периодическое кровопускание приводят к нарушению обмена веществ и анемии, а в ряде случаев, – и к

снижению титров антител, главное внимание уделяют вопросам полноценного, сбалансированного кормления животных-продуцентов.

Кормление животных-доноров отличается от кормления других животных и осуществляется по специально разработанным и утвержденным рационам. Такие рационы должны содержать по 11-12 к.ед. и по 1000-1200 г переваримого протеина, а также включать сочно-витаминные корма и быть строго сбалансированными по минеральному составу, что необходимо для восстановления крови после ее взятия.

Подготовка животных начинается с создания грундиммунитета, который повышает иммунологическую реактивность будущих продуцентов (способных выработать антитела в высоких титрах против введенного антигена). С этой целью перед гипериммунизацией проводят *грундиммунизацию (грундирование)*.

При проведении грундиммунизации животным вводят внутримышечно или подкожно дважды (с интервалом в 2–3 недели) убитый антиген или живые аттенуированные микроорганизмы (убитые или живые вакцины).

При этом организм животного сенсibiliзируется («знакомится» с антигеном) и в последующем при гипериммунизации быстро ответит на введение антигена выработкой антител.

Предварительное, правильно проведенное грундирование животных обеспечивает повышение (в 5 раз и более) титров специфических антител при последующей гипериммунизации тем же антигеном, увеличивает выход высокоактивного препарата и создает условия получения сывороток в более короткие сроки.

Теоретически обоснованно и практически целесообразно отбирать животных-продуцентов по иммунологическим показателям.

До начала грундиммунизации и через 7-8 суток после последнего введения антигена у животных берут кровь и определяют в ее сыворотке наличие антител к тому антигену, с помощью которого в последующем готовят гипериммунную сыворотку.

Выявление в сыворотке крови антител в титрах 1:800 и выше указывает на то, что данное животное может быть использовано как продуцент гипериммунной сыворотки, т.е. такое животное обладает высокой реактивностью организма, и его иммунная система способна вырабатывать антитела в необходимых титрах.

Всех животных, у которых при грундиммунизации не обнаруживают антител или обнаруживают в титре менее 1:800, подвергают выбраковке.

Гипериммунизация – это повторная иммунизация животных нарастающими дозами соответствующих антигенов, обеспечивающая длительное поддержание в организме высокого титра антител к соответствующему антигену.

При получении специфических гипериммунных сывороток используют прерывистую, непрерывную и ударную технологии гипериммунизации.

Прерывистая гипериммунизация предусматривает 12–30-дневные перерывы между циклами иммунизации. В этот период продуценты не подвергаются никаким манипуляциям. Во время отдыха происходит полное восстановление иммунологической реактивности организма, гематологических и биохимиче-

ских показателей крови, но вместе с тем наблюдается снижение титра антител чаще всего на 50-60%. Для повышения специфической активности сыворотки проводят новый, укороченный цикл гипериммунизации, состоящий, как правило, из 2–3 инъекций антигена, и вновь производят взятие крови. Эта технология гипериммунизации позволяет длительное время эксплуатировать продуцентов и наиболее широко используется на практике.

Непрерывная гипериммунизация заключается в том, что регулярных перерывов для отдыха между циклами не делается, а кровь берется между очередными инъекциями антигена. Данная технология позволяет получить за короткое время значительное количество специфической сыворотки, однако ее применение оправдано только для продуцентов, прошедших достаточное количество циклов эксплуатации и легко переносящих процесс гипериммунизации.

Ударная (кратковременная) гипериммунизация предусматривает кратковременное использование животных (не применяется при производстве лечебных сывороток, а применяется при получении диагностических сывороток, которые чаще всего изготавливаются на лабораторных животных и используются для получения сывороток, свободных от содержания групповых антител). После первого цикла иммунизации проводится несколько взятий крови с интервалами в 2-3 дня с последующим тотальным взятием крови либо сразу производят тотальное обескровливание.

В практике производства поливалентных гипериммунных сывороток широкое распространение получили ассоциированная и реже – комплексная иммунизация животных. Под *ассоциированной гипериммунизацией* понимают введение смеси различных антигенов, а под *комплексной гипериммунизацией* – одновременное введение нескольких антигенов, но каждого – в разные места.

При гипериммунизации сыворотка крови меняется. Обычно нарастает количество общего белка, увеличивается количество гамма- и бета-глобулиновых фракций, уменьшается содержание альбуминов.

Успех гипериммунизации животных-продуцентов во многом зависит не только от тщательного их подбора, качества антигена и адьювантных веществ, но и от правильно выбранной схемы гипериммунизации, правильной технологии выполнения этих схем иммунизации, а также технологии взятия крови или обескровливания продуцентов в конце их эксплуатации.

В процессе гипериммунизации используют различные пути введения антигена: подкожный, внутримышечный, внутривенный, внутрикожный, внутрибрюшинный, интралимфатический. Оптимальной считается комбинация нескольких путей введения антигена, которая позволяет вовлечь в процесс иммуногенеза наибольшее количество лимфоузлов и получить от продуцента сыворотку с высоким уровнем превентивной активности.

Антиген вводится обычно в несколько мест (в небольших дозах (5–25 мл) – подкожно в верхнюю часть шеи животного, а в больших количествах – внутримышечно в область спины и крупа) с таким расчетом, чтобы точки инъекции находились вблизи лимфатических узлов. При этом в иммуногенез быстрее вовлекается большое количество лимфоузлов, что повышает общую и иммунологическую реактивность организма. Введение антигена одновременно в

несколько мест, кроме того, обеспечивает лучшую рассасываемость его и появление более равномерных и менее болезненных инфильтратов.

Нужно иметь в виду, что при введении животному больших доз антигена образуются инфильтраты и абсцессы (абсцессы обычно бывают стерильными).

Места введения антигена или взятия крови протирают дезинфицирующими растворами.

Цикл гипериммунизации обычно длительный и составляет от 1 до 2 месяцев и более (в каждом случае цикл иммунизации во многом зависит от вида получаемой гипериммунной сыворотки). Схемы иммунизаций отличаются одна от другой даже при получении одной и той же сыворотки. Специалисты сывороточного производства считают, что каждое животное отличается индивидуальной реактивностью организма и для него необходима отдельная схема гипериммунизации.

Разнообразие схем иммунизации определяется такими причинами, как различие методов введения антигена, дозировка антигена, количество инъекций, интервалы между инъекциями, количество забираемой у животного крови, кратность цикловых взятий крови.

Например, для получения гипериммунной противосибиреязвенной сыворотки используют лошадей в возрасте от 3 до 10 лет. Вначале здоровым животным вводят 4-кратно вакцину Ценковского II для создания стойкого иммунитета (грундиммунизация), а потом лошадей подвергают гипериммунизации вирулентной суточной бульонной культурой возбудителя сибирской язвы. Всего используют 12 вирулентных штаммов возбудителя, комбинируя их по 4 в виде смеси для каждой иммунизации. Гипериммунизацию лошадей начинают с малых доз (0,5; 1,0; 2,5 и 5,5 мл) с интервалом в 3 суток. Затем культуры возбудителя сибирской язвы вводят с интервалами в 3–4 суток и в дозах 10,0; 20,0; 40,0; 80,0; 100,0; 110,0; 120,0; 130,0; 140,0; 150,0 мл. Обычно бывает достаточным ввести антиген 13 раз, и сыворотка лошадей-продуцентов становится активной. При введении доз от 10 до 80 мл к культуре добавляют 0,2% алюминиевых квасцов, а к дозам от 100 до 150 мл – 0,1% квасцов. При повышении у животных температуры тела интервал между инъекциями увеличивают до 4 или 5 суток.

Введение антигенов обычно не вызывает резких отклонений в состоянии здоровья животных, лишь иногда наблюдаются местные и общие реакции. Эффективность иммунизации животных повышается при дробном введении антигенов одновременно в различные участки тела с охватом возможно большего количества лимфатических узлов.

Взятие крови. По окончании гипериммунизации, когда в сыворотке крови животных установлен максимальный титр специфических антител (обычно через 7–10 суток после последней инъекции антигена), у них производят взятие крови. Этот период соответствует максимальному накоплению антител в крови животных и полностью укладывается в закономерности иммуногенеза.

К взятию крови животных приучают постепенно.

Количество забираемой крови зависит от таких факторов, как масса животного, количество предполагаемых взятий крови в данном цикле, титр антител, состояние здоровья животного.

Обычно при каждом взятии кровь берут из яремной вены из расчета $16 \text{ см}^3/\text{кг}$ массы животного (что составляет приблизительно 13% к общей массе крови животного) в стерильные бутылки, куда добавляют 10%-ный раствор натрия цитрата из расчета $34 \text{ см}^3/\text{л}$ крови.

Тотальное (полное) обескровливание проводят тогда, когда решается вопрос о прекращении использования животных в качестве продуцентов. Обычно это делают в момент максимального накопления антител и появления тенденции к снижению их синтеза. Перед тотальным взятием крови для получения ее в наибольших количествах животным обычно вводят сердечные препараты. Животные-продуценты могут пройти несколько циклов гипериммунизации (от 5 до 8), и решение вопроса о тотальном кровопускании принимается строго индивидуально.

Приготовление сывороточных препаратов. Сыворотку получают методом цитрирования крови (смешиванием свежей крови с раствором натрия цитрата) с последующим сепарированием (разделение крови на фракции: плазму и форменные элементы) и дефибринованием плазмы (удалением из плазмы крови белка фибрина), которое осуществляется путем добавления 30%-ного раствора кальция хлорида (из расчета $1,3 \text{ см}^3/\text{л}$ крови).

Сыворотку крови консервируют добавлением к ней 5%-ного раствора фенола до 0,5%-ной концентрации и отстаивают в специальных емкостях в течение 2 месяцев при температуре $+2...+15^\circ\text{C}$. Отстоявшуюся сыворотку фильтруют через пластины Ф, а затем через стерилизующие пластины СФ.

В последующем сыворотку расфасовывают во флаконы емкостью по 100 мл. Флаконы закрывают пробками, обкатывают алюминиевыми колпачками (для герметичности) и наносят этикетку.



Рисунок 32 – Технологическая схема приготовления сывороточных препаратов
[<https://studfile.net>]

Гипериммунные сыворотки, получаемые из крови путем удаления форменных элементов и фибрина, называются *нативными* (рисунок 35) в отличие

от *концентрированных* сывороток, подвергнутых дополнительной очистке и концентрации специальными методами.

Принципы очистки сывороток основаны на выделении из них активных белковых фракций, преимущественно гамма-глобулинов, и удалении балластных фракций, не являющихся носителями антител (альбумины).

Выделенные фракции растворяют в меньшем объеме растворителя, по сравнению с исходным объемом, что позволяет препарат сконцентрировать и вводить в меньших дозах.

Необходимость в получении концентрированных сывороток связана со значительными объемами выпускаемых лечебно-профилактических сывороток, а также с тем, что некоторые сыворотки вводят животным в больших дозах (с профилактической целью – по 20-60 мл, а с лечебной – по 40-120 мл). Уменьшение общего объема выпускаемых сывороток и повышения их активности достигается путем их очистки и концентрирования иммуноглобулиновой фракции гипериммунной сыворотки.

В производственных условиях *очистку и концентрацию сывороток* проводят чаще всего комбинированным способом, включающим такие операции, как:

- ферментативный гидролиз;
- прогрев в кислой среде;
- солевое фракционирование;
- дополнительная очистка от неактивных белков (с использованием органических растворителей, сорбентов);
- дополнительное выдерживание при пониженных температурах.

При такой обработке удаляется до 80-85% балластных белков сыворотки.

Кроме указанных методов очистки и концентрации сывороточных препаратов, гамма-глобулиновая фракция выделяется из сыворотки крови методом ультрафильтрации. Для этого используются ультрафильтрационные модули (УФУ-5, УФУ-15, УФУ-50, УФУ-100) на полых волокнах, отличающихся пределом задержания по молекулярной массе: 5000, 15000, 50000, 100000 Да.

Для задержания гамма-глобулинов лучше всего использовать УФУ-100, обеспечивающую практически полную задержку гамма-глобулинов на фильтре, т.к. молекулярная масса гамма-глобулинов составляет 160000–900000 Да.

В промышленном производстве готовится множество различных сывороток. Технологические приемы приготовления их в общих чертах одинаковы (рисунок 33).

В то же время для приготовления отдельных сывороток имеются свои технологические особенности производства, которые для каждой сыворотки оговорены в соответствующей научно-технической документации.

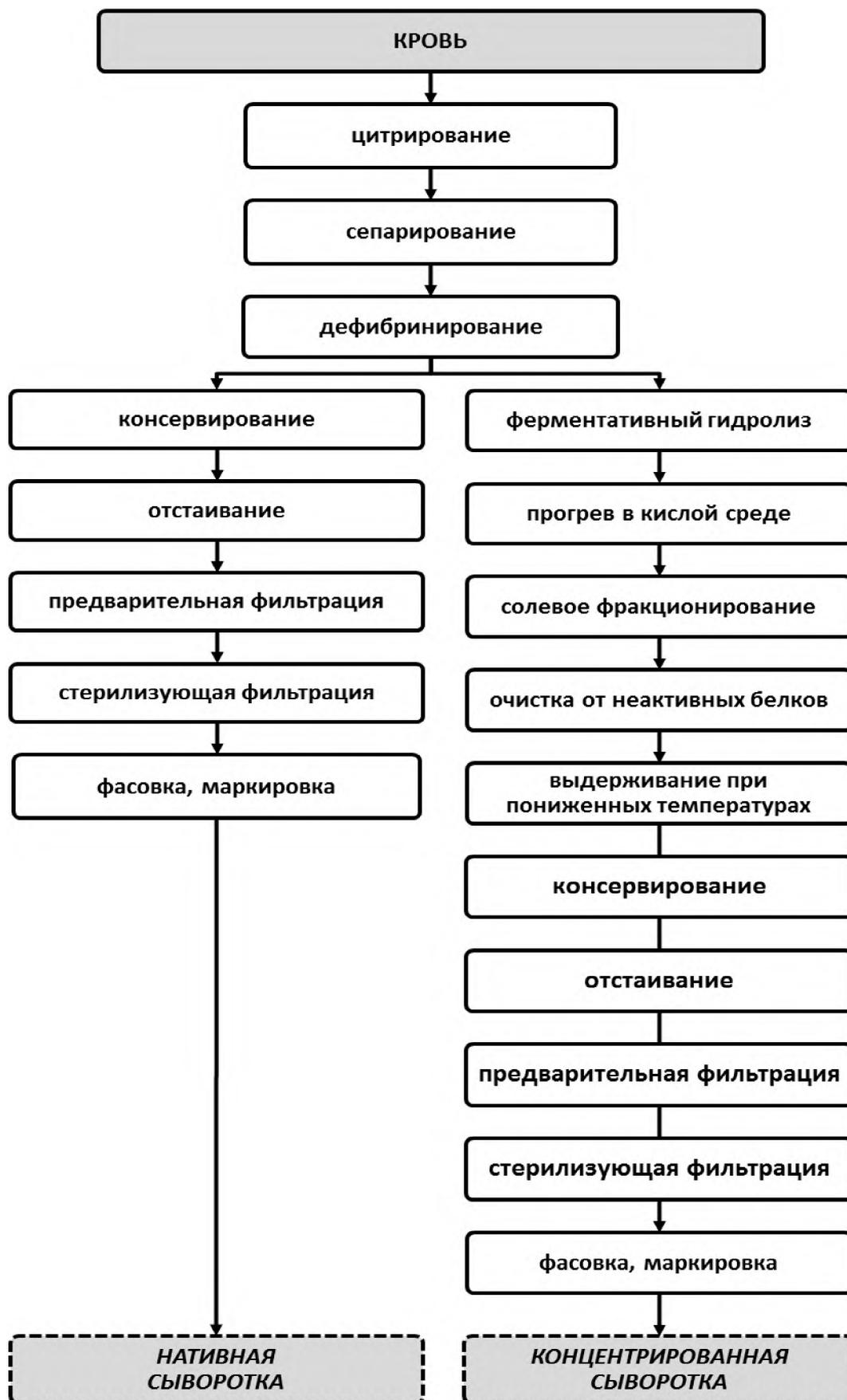


Рисунок 33 – Технологические операции приготовления сывороточных препаратов

3.2. Особенности промышленного получения глобулиновых препаратов

В предупреждении инфекционных болезней и лечении больных животных большую роль играют глобулиновые препараты, к которым относятся:

- *неспецифический (нормальный) гамма-глобулин*, полученный из сыворотки крови здоровых животных;
- *специфические иммунные глобулины*, выделенные из гипериммунных сывороток или сывороток переболевших животных (сыворотка животных-реконвалесцентов).

Гамма-глобулин (γ -глобулин) представляет собой белковую фракцию сыворотки крови, которая выполняет функцию защитных антител в организме и обладает наименьшей электрофоретической подвижностью.

Гамма-глобулины не являются однородным сывороточным белком. Методом электрофореза на бумаге они разделяются на гамма-1 и гамма-2 глобулины, а наиболее тонкими методами – на значительно большее число фракций. Из белковых фракций сыворотки крови гамма-глобулиновая является самой неоднородной (имеется более 16 подфракций). Однако все подфракции гамма-глобулина очень близки по физико-химическим свойствам и электрофоретической подвижности.

Аминокислотный состав гамма-глобулинов обладает видовой специфичностью и недостаточно изучен. Наиболее детально и различными авторами исследован аминокислотный состав гамма-глобулинов человека, у животных такие сведения получены в отношении крупного рогатого скота и лошадей.

Содержание гамма-глобулина в сыворотке крови животных различно и непостоянно. Оно подвержено не только индивидуальным колебаниям, но и, в значительной мере, зависит от упитанности, возраста, пола, породы, полового цикла, беременности, времени и условий исследований.

Особенно изменяется содержание гамма-глобулинов и белкового спектра сыворотки крови в целом при различных воспалительных процессах, инфекционных заболеваниях. Этот фактор является одним из диагностических признаков. Значительно увеличивается содержание гамма-глобулина при иммунизации животных, под воздействием введенного антигена.

Установлено, что у молодых особей содержание гамма-глобулина значительно ниже, чем у взрослых, а у новорожденных он отсутствует совсем.

Различие в составе сывороточных белков у эмбрионов млекопитающих связано с морфологическими особенностями строения плаценты. Гамма-глобулины обнаружены в крови тех животных, у которых строение плаценты обеспечивает тесный контакт с кровью матери и зародыша и делает возможным переход гамма-глобулинов из материнской крови в кровь эмбриона.

Огромное значение имеют глобулиновые препараты для сохранения новорожденного молодняка сельскохозяйственных животных.

В настоящее время широкое применение нашли глобулины против вирусных инфекций (болезни Ауески, ящура, классической чумы свиней, оспы дифтерита птиц, бешенства и др.), бактериальных инфекций (рожи свиней,

сальмонеллеза телят и поросят, колибактериоза, инфекционного атрофического ринита, сибирской язвы, бруцеллеза, пастереллеза и др.), получают также ассоциированный гамма-глобулин.

Гамма-глобулин влияет и на иммунологические функции организма, т. е. помимо специфического действия гамма-глобулин может оказывать неспецифическое стимулирующее влияние на организм животного, повышая его реактивность.

Установление связи антител с гамма-глобулиновой фракцией сыворотки крови послужило стимулом для разработки методов ее выделения с целью применения в клинической практике и изучения физико-химических свойств.

К настоящему времени известно большое число различных методов фракционирования сывороточных белков (химических, физических и физико-химических).

К химическим и физико-химическим методам относятся:

- высаливание нейтральными солями (сернокислым аммонием, хлористым натрием, сернокислым натрием и др.);
- изоэлектрическое осаждение;
- разведение с изменением ионной силы раствора;
- фракционирование при помощи органических осадителей (этилового и метилового спирта, ацетона, эфира);
- осаждение при помощи катионов;
- осаждение при помощи анионов;
- применение ионообменных смол.

К физическим методам относятся:

- ультрафильтрация через полупроницаемые мембраны;
- ультрацентрифугирование;
- электрофоретическое разделение (метод препаративного и квекционного электрофореза).

Существует целый ряд комбинированных методов получения гамма-глобулиновых препаратов.

Однако из большого числа предложенных методов получения гамма-глобулинов производственное значение имеют не многие: солевой, спиртовой, риваноловый и спиртово-хлороформный.

Контрольные вопросы

1. Что понимают под пассивной иммунизацией?
2. Что такое гипериммунные сыворотки? Их классификация и применение.
3. В чем заключаются особенности промышленного производства гипериммунных сывороток?
4. Что такое иммуноглобулины? Их биологическое значение и применение.
5. В чем заключаются особенности промышленного получения иммуноглобулинов?

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биотехнология биологически активных веществ : учебное пособие для студентов высших учебных заведений / ред.: И. М. Грачева, Л. А. Иванова. – Москва : НПО «Элевар», 2006. – 453 с.
2. Бенин, В. М. Современная иммунобиотехнология на страже биологической безопасности / В. М. Бенин // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2008. – №2. – С. 35–39.
3. Васильев, Д. А. Современные методы иммунодиагностики инфекционных болезней (радиоиммунологический анализ, иммуноферментный анализ) : учебное пособие / Д. А. Васильев, П. И. Барышников, Б.В. Новиков. – Ульяновск : УГСХА, 1998. – 38 с.
4. Герловский, Д. О. Прикладные аспекты иммунологии : курс лекций / Д. О. Герловский. – Минск : БГУ, 2016. – 138 с.
5. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак ; пер. с англ. Н. В. Баскакова [и др.] ; ред. Н. К. Янковский. – Москва : Мир, 2002. – 589 с.
6. Гринь, С. А. Современные биотехнологические процессы и иммунологические методы при промышленном производстве ветеринарных препаратов : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / С. А. Гринь ; ГНУ ВНИИЭВ РАСХН. – Щелково, 2008. – 52 с.
7. Краснопольский, Ю. М. Фармацевтическая биотехнология. Технология производства иммунобиологических препаратов : учебное пособие / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : НГУ «ХПИ», 2009. – 352 с.
8. Основы фармацевтической биотехнологии : учебное пособие / Т. П. Прищеп [и др.]. – Ростов-на-Дону : Феникс ; Томск : Издательство НТЛ, 2006. – 256 с.
9. Промышленная микробиология : учебное пособие для вузов по специальностям «Микробиология» и «Биология» / З. А. Аркадьева [и др.] ; под ред. Н. С. Егорова. – Москва : Высшая школа, 1989. – 688 с.
10. Разговоров, П. Б. Технология получения биологически активных веществ : учебное пособие / П. Б. Разговоров. – Иваново : Ивановский государственный химико-технологический университет, 2010. – 72 с.
11. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс] : электрон. учеб. пособие / Н. А. Войнов [и др.] ; под науч. ред. Т. Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2009. – 1 электрон. опт. диск (DVD).
12. Теоретические и практические основы производства вакцинных и сывороточных препаратов против эшерихиоза и сальмонеллеза животных : монография / А. П. Медведев [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2020. – 264 с.

При оформлении обложки использовано изображение с сайта
<https://storage.theoryandpractice.ru>

Учебное издание

Кошнеров Андрей Геннадьевич,
Красочко Ирина Александровна,
Корочкин Рудольф Борисович и др.

**БИОТЕХНОЛОГИЯ.
ВЕТЕРИНАРНАЯ ИММУНОБИОТЕХНОЛОГИЯ**

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск И. А. Красочко
Технический редактор Е. А. Алисейко
Компьютерный набор Е. А. Капранова
Компьютерная верстка Т. А. Никитенко
Корректор Е. В. Морозова

Подписано в печать 27.10.2023. Формат 60×84 1/16.
Бумага офсетная. Ризография.
Усл. печ. л. 5,75. Уч.-изд. л. 4,89. Тираж 150 экз. Заказ 2415.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной медицины».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/ 362 от 13.06.2014.
ЛП №: 02330/470 от 01.10.2014 г.
Ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026, г. Витебск.
Тел.: (0212) 48-17-82.
E-mail: rio@vsavm.by
<http://www.vsavm.by>