

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)

Методические рекомендации

Элективные дисциплины:

- **МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ОСНОВ ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**
- **ВОЗМОЖНОСТИ ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ В БИОЛОГИИ, МЕДИЦИНЕ И ФАРМАЦИИ**
- **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОПАТОЛОГИЯ**

основная профессиональная образовательная программа
высшего образования - программа специалитета

33.05.01 Фармация

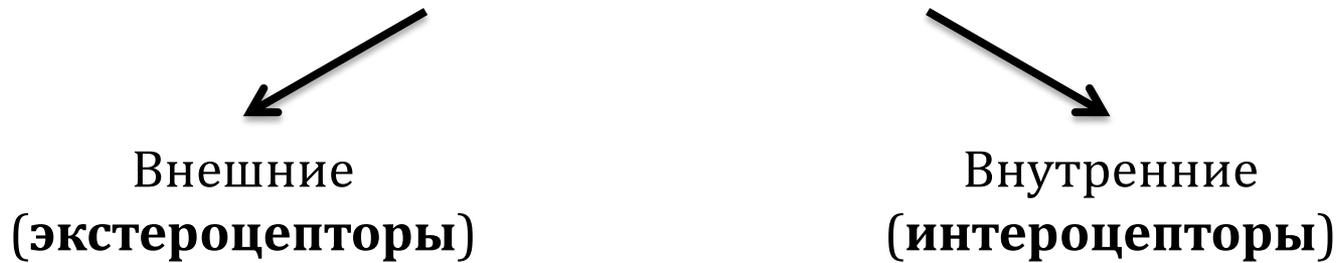


**Метод лекарственной дифференцировки
в оценке молекулярных аспектов действия
новых фармакологических агентов**

Козин С.В.
Кудряшов Н.В.



Сенсорные рецепторы ЦНС



Интероцептивные ощущения - это ощущения, возникающие при воздействии раздражителя на рецепторы во внутренних органах и тканях и отражающие внутренние состояния организма.

«Обучение, зависимое от состояния» – явление, состоящее в том, что в наиболее полной форме ранее выработанный условный рефлекс воспроизводится только в том состоянии организма, в котором происходила его выработка.

Способность фармакологических агентов обнаруживать **интероцептивные свойства** лежит в основе фундаментального феномена **«обучения, зависимого от состояния»**, одним из проявлений которого является **лекарственная дифференцировка (drug discrimination, ЛкД)**.



Если при обучении на фоне действия фармакологического агента воспроизведение условного рефлекса жестко детерминируется этим веществом, то говорят о наличии у вещества **интероцептивных (субъективных) эффектов**.

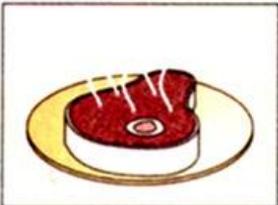
ДО ОБУЧЕНИЯ

Стимул

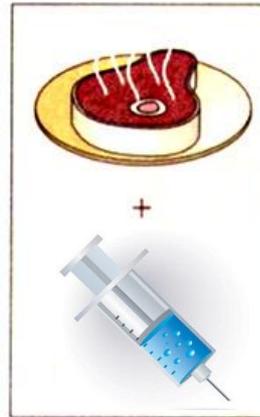
Условный стимул –
эффект вещества



Безусловный
стимул



Обучение



Воспроизведение

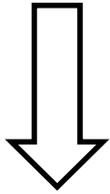
Условный стимул



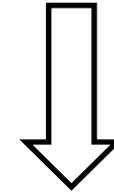
Реакция



Экспериментальное изучение интероцептивных эффектов веществ



Диссоциированное
обучение



Лекарственная
дифференцировка

Лекарственная дифференцировка (drug discrimination)
(или условнорефлекторный навык различения веществ)
проявляется в формировании дифференцировочных
условных реакций (двух и более), воспроизведение которых
носит альтернативный характер в зависимости от инъекции
фармакологических агентов, выполняющих в данной
ситуации функцию условного стимула



- **Лекарственная дифференцировка** является **оперантным методом**, т.е. основана на выработке **оперантного рефлекса**
- **Оперантное поведение** – активный действия животного, направленные на достижения поставленной цели
- В рамках оперантного поведения животное само ищет возможности достижения цели

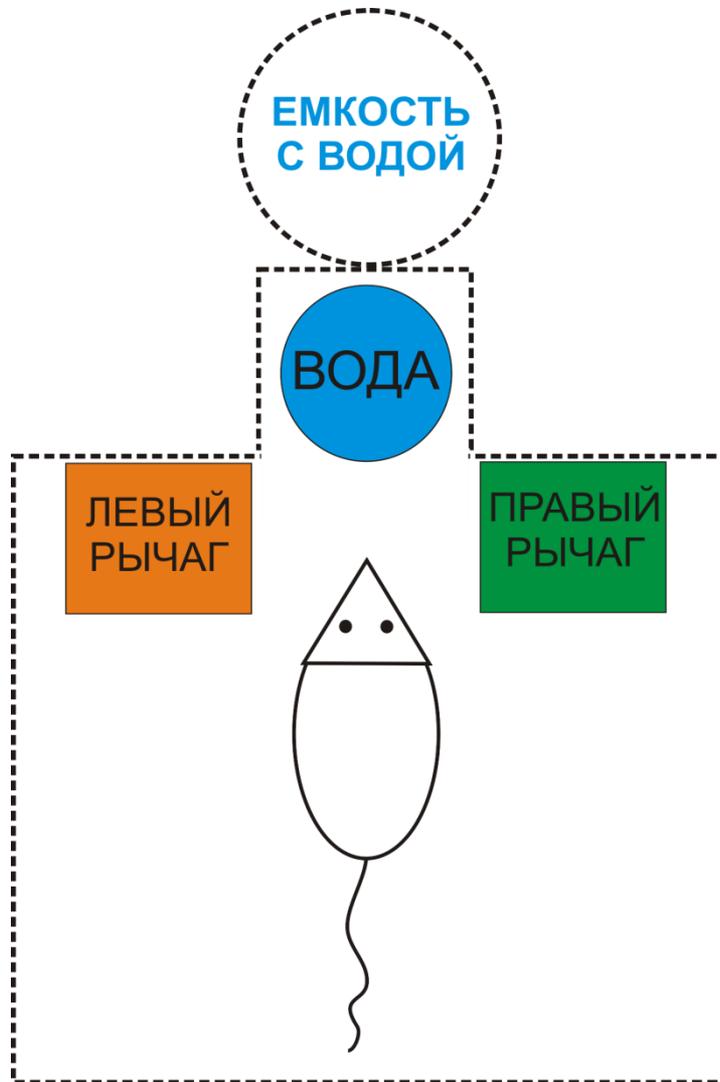


"The light goes on. I pull the lever. The food comes.
It's a full life."

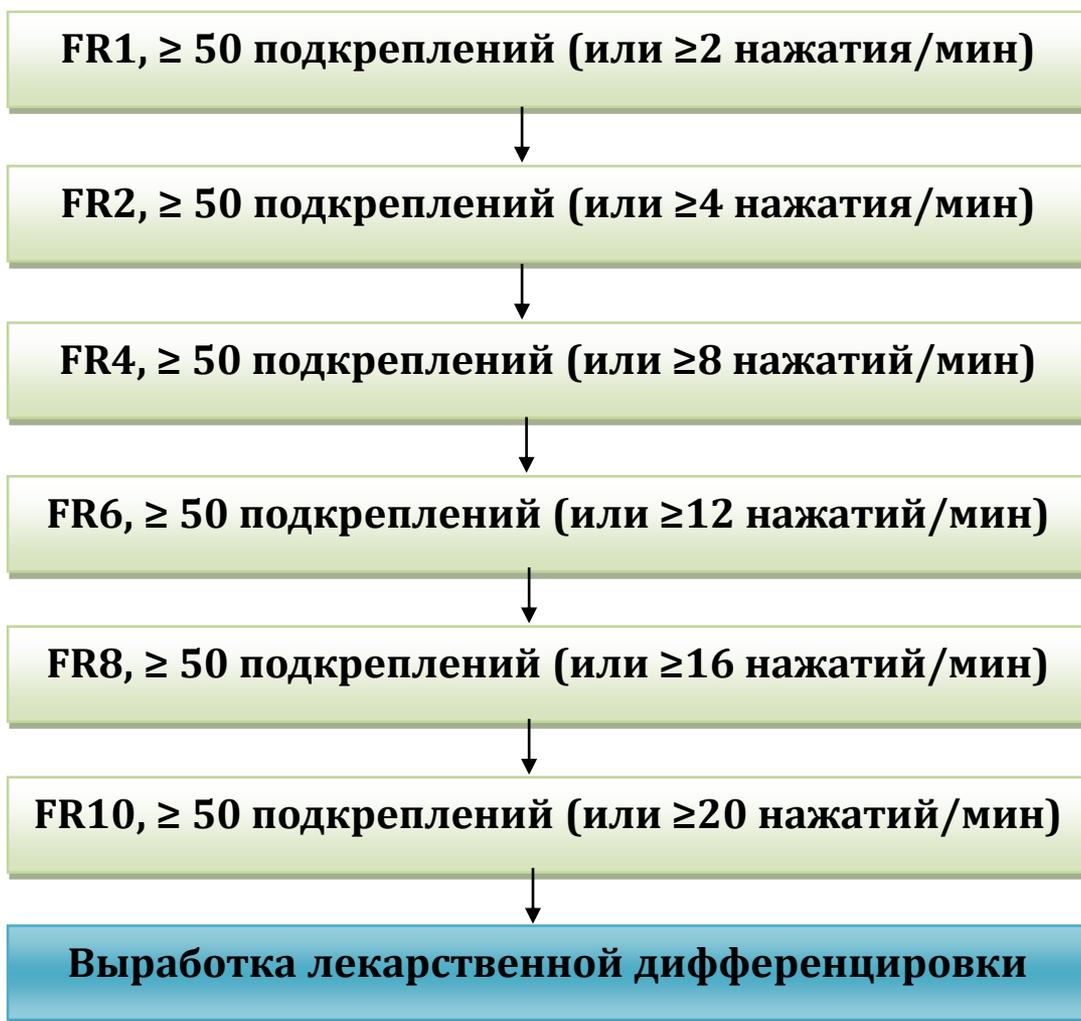
- Выработка оперантного рефлекса достигается путем обучения с подкреплением
- В случае лекарственной дифференцировки **условным стимулом** выступает **эффект вещества**



Камера Скиннера



- Выработка лекарственной дифференцировки осуществляется поэтапно в функциональных режимах (FR) от **1** до **10**
- При режиме FR-1 поощряется каждое однократное нажатие на рычаг, соответствующий введенному веществу (только левый или только правый), при FR-2 – каждое второе, при FR-3 – каждое третье и т.д. до 10 нажатий



Как это работает?

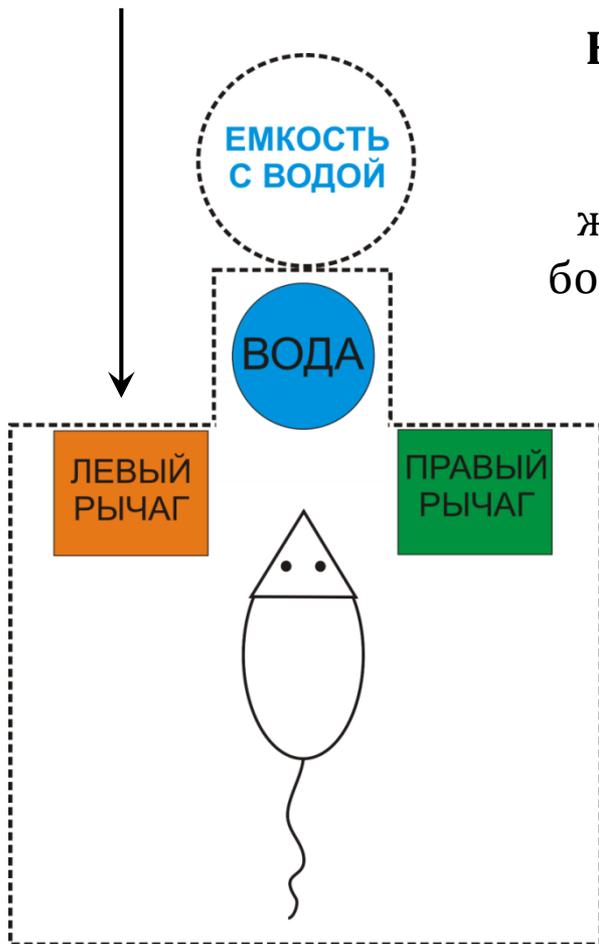
- Цель лекарственной дифференцировки – **научить** животное **различать 2 вещества** по своим субъективным ощущениями (интероцептивным свойствам веществ)
- Учим различать между собой:
 1. Препарат (тренировочный препарат)
 2. Плацебо (физиологический раствор)
- Инъекции препарата и плацебо чередуют в квазислучаной последовательности на протяжении всей выработки лекарственной дифференцировки
- Если на изучаемый препарат/вещество лекарственная дифференцировка вырабатывается, значит вещество обладает **дифференцировочными стимульными свойствами**



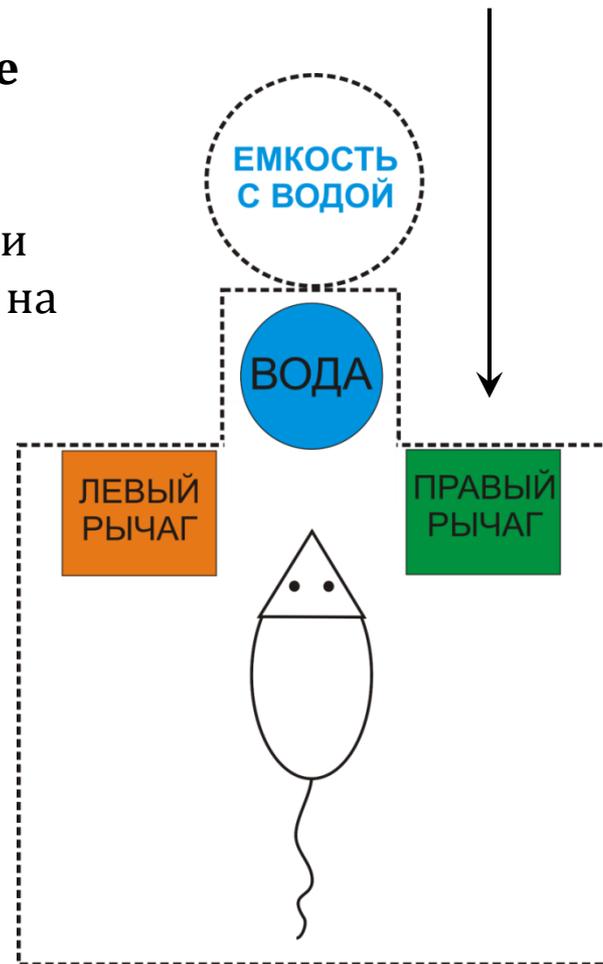
Как это работает?

После введения **препарата** животное должно нажимать **левый рычаг** для получения воды

После введения **плацебо** животное должно нажимать **правый рычаг** для получения воды



Как узнать, что животное обучилось?
За весь сеанс обучения животное совершило 80% и более правильных нажатий на рычаг!



Для чего нужна лекарственная дифференцировка в экспериментальной фармакологии?



Оценка наркотического потенциала и психического компонента лекарственной зависимости



Изучение молекулярных механизмов действия новых фармакологических агентов

Изучение молекулярных и нейрохимических механизмов действия фармакологических агентов в ЛкД

Заместительный тест

- После успешной выработки ЛкД на препарат с известным механизмом действия проводят заместительный тест
- Условия заместительного теста отличаются от условий обучений
- В заместительном тесте тренировочный препарат заменяют на изучаемое вещество и оценивают результат

Тест на антагонизм

- После успешной выработки ЛкД можно провести тест на антагонизм
- Для этого перед введением тренировочного препарата вводят изучаемое соединение
- Оценивают влияние изучаемого соединения на интероцептивные свойства тренировочного препарата

Результаты заместительного теста и их интерпретация

1. Изучаемое вещество полностью воспроизводит стимульные свойства тренировочного препарата ($\geq 80\%$ адекватных тренировочному препарату реакций)
 - **Молекулярный механизм действия изучаемого вещества идентичен механизму тренировочного препарата**
2. Изучаемое вещество не воспроизводит выработанную дифференцировку, животные выбирают рычаг, ассоциированный с плацебо
 - **Молекулярный механизм действия изучаемого вещества принципиально отличается от такового у тренировочного препарата**
3. Изучаемое вещество частично воспроизводит стимульные свойства тренировочного препарата (25-70% адекватных тренировочному препарату реакций)
 - **Молекулярный механизм действия изучаемого вещества частично подобен молекулярному механизму действия тренировочного препарата**



Практическое применение лекарственной дифференцировки (ЛкД) (примеры из собственной экспериментальной практики)

1. Выработать ЛкД «амитриптилин-физиологический раствор»

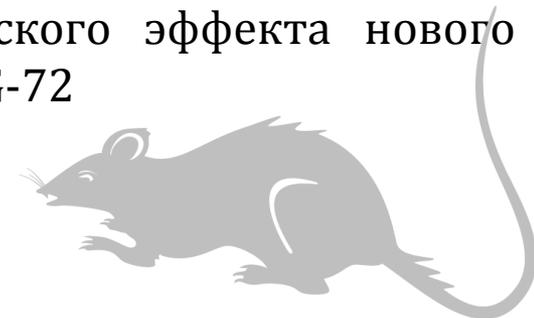
- **Зачем?**

- ✓ По данным литературы амитриптилин не вырабатывает ЛкД, хотя препарат обладает выраженными психотропными эффектами, которые могут обуславливать наличие у него интероцептивных свойств.
- ✓ В нашей лаборатории были изучены психотропные свойства двух новых оригинальных гетероциклических соединений под шифрами G-24 и G-27, которые, по предварительным данным, обладают антидепрессивным эффектом. Необходимо выяснить механизм этого эффекта, сравнив его с классическим препаратом амитриптилинов

2. Выработать ЛкД «коразол-физиологический раствор»

- **Зачем?**

- ✓ Оценить вовлеченность положительных модуляторных сайтов ГАМК_A-рецептора в механизм анксиолитического эффекта нового гетероциклического соединения под шифром G-72



Лекарственная дифференцировка «амитриптилин – физиологический раствор»

1. ЛкД «амитриптилин-физиологический раствор» была выработана
2. Вопреки данным западных коллег амитриптилин обладает интероцептивными свойствами, что вполне прогнозируемо и ожидаемо.
3. Как удалось выработать лекарственную дифференцировку?
 - **Перед началом обучения животным на протяжении 14 дней вводили амитриптилин**
4. Как оценить механизм действия новых соединений G-24 и G-27, используя выработанную ЛкД?
 - **Провести заместительный тест, в котором инъекцию амитриптилина заменят на инъекции изучаемых соединений**

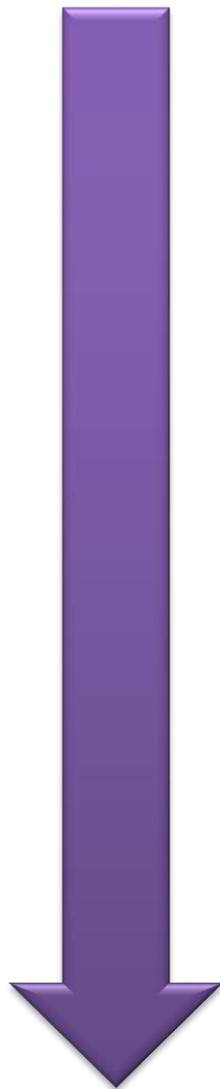


Лекарственная дифференцировка «амитриптилин – физиологический раствор»

Предварительное
ежедневное введение
амитриптилина (5 мг/кг)

Обучение животных
различать инъекции
амитриптилина и
плацебо – выработка
лекарственной
дифференцировки в
режимах от FR-1 до FR-10

Заместительное
тестирование с
различными веществами

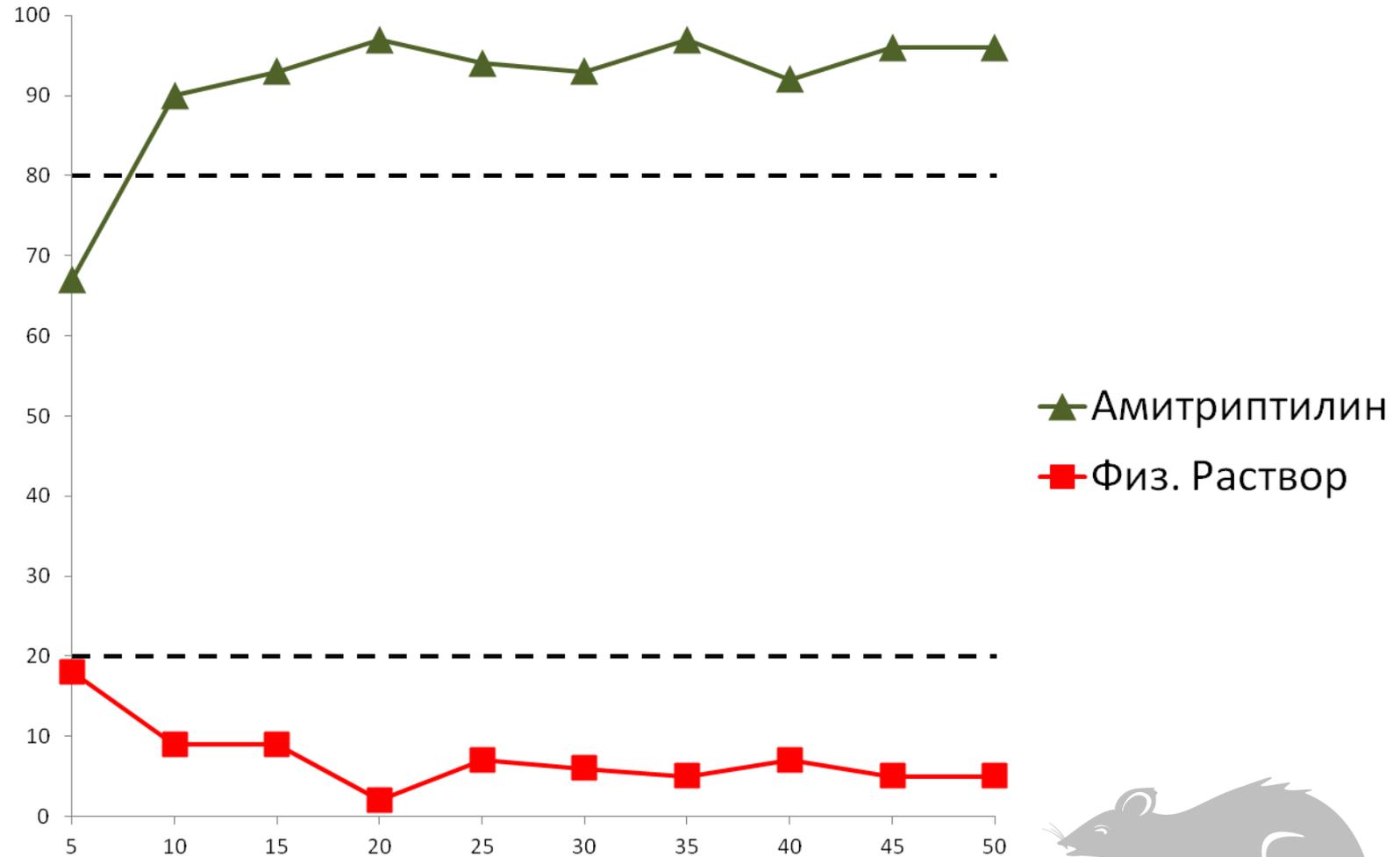


14 дней

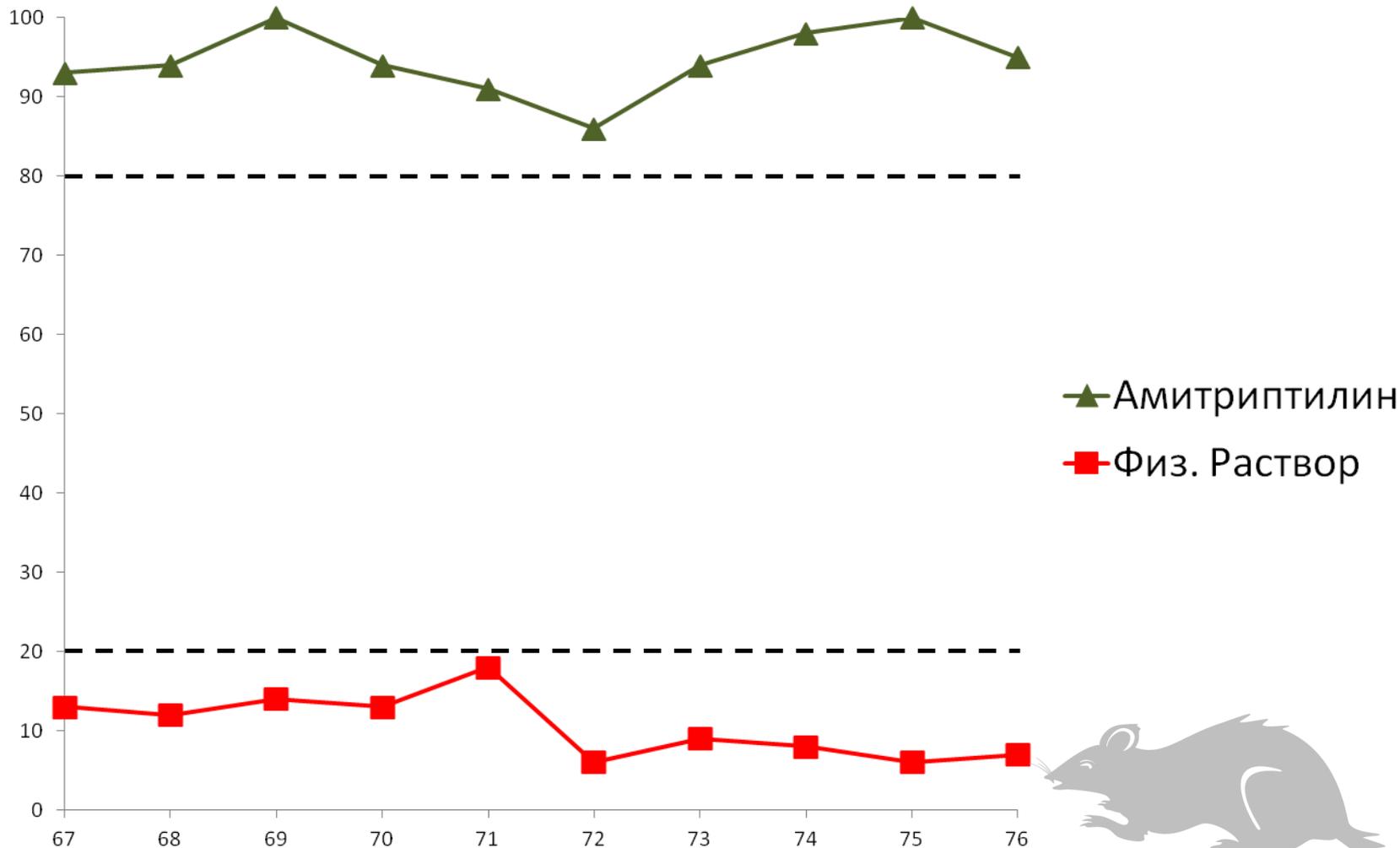
50 дней

По одному веществу с
недельными
интервалами

Динамика формирования ЛкД при использовании в качестве дифференцируемых стимулов амитриптилина и физиологического раствора



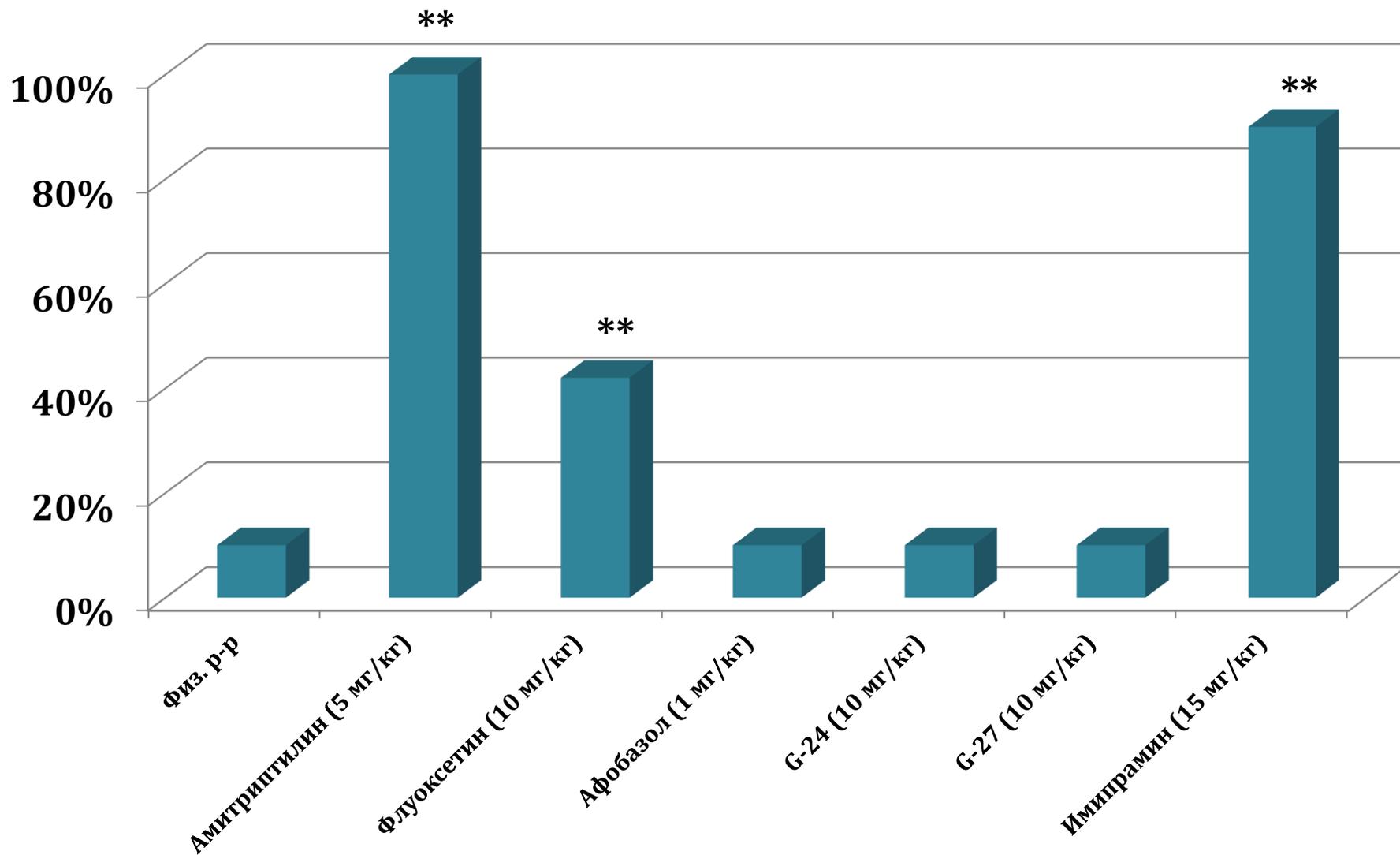
Динамика воспроизведения ЛкД при использовании в качестве дифференцируемых стимулов амитриптилина и физиологического раствора



▲ Амитриптилин
■ Физ. Раствор



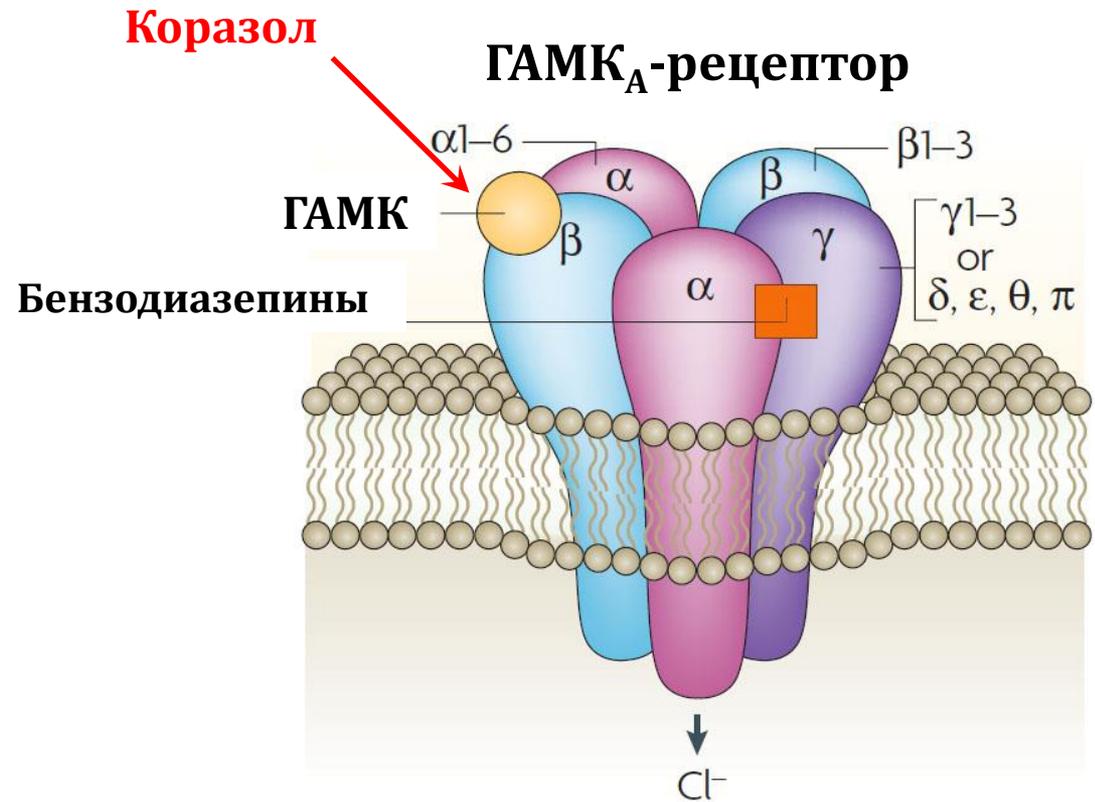
Результаты заместительного теста после выработки лекарственной дифференцировки «амитриптилин – физ. р-р»



** - Отличие от физиологического р-ра при $p < 0,01$

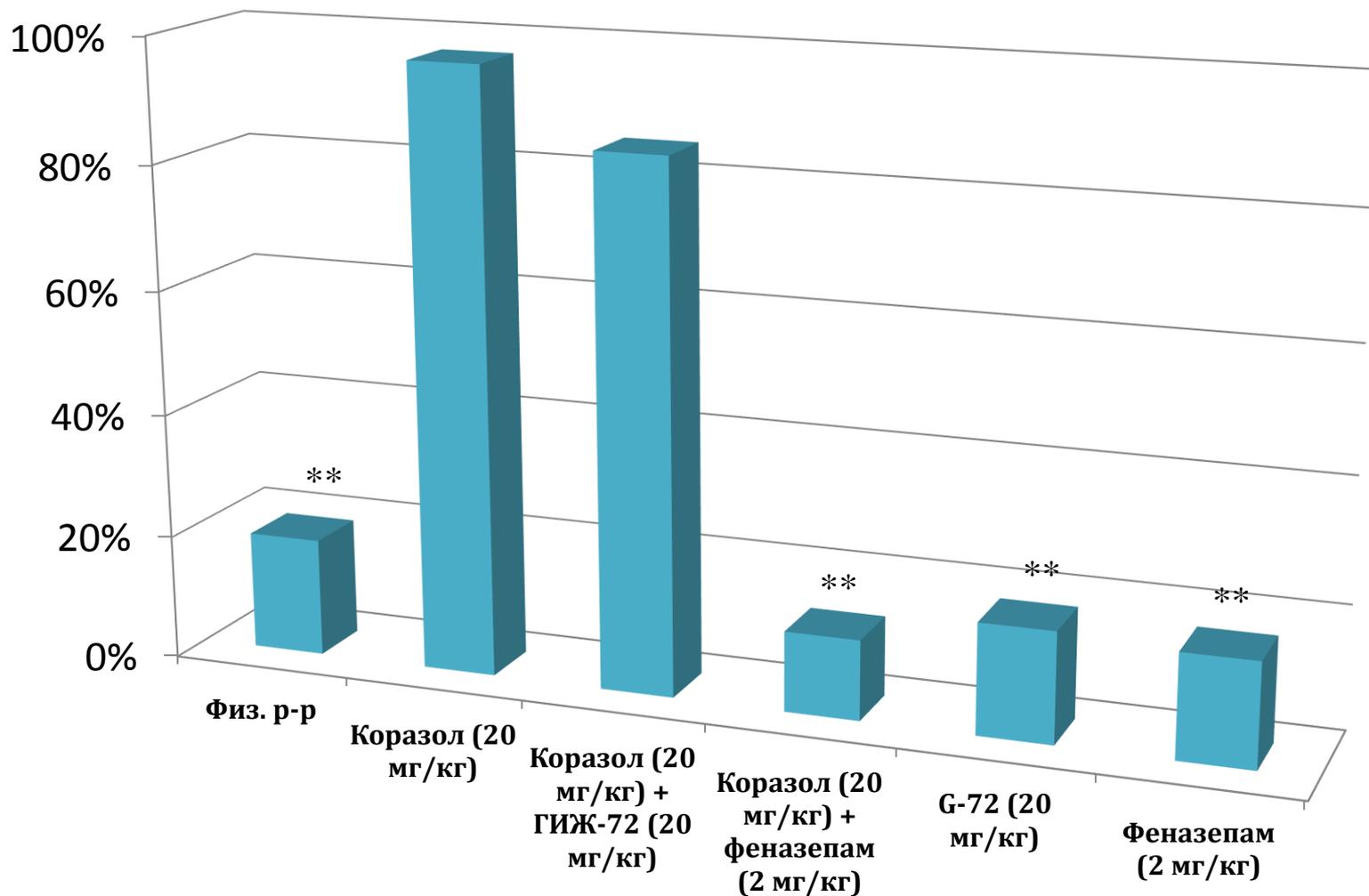
Лекарственная дифференцировка «коразол-физиологический раствор»

- Коразол (**пентилентетразол**) – психостимулятор, не применяемый в настоящее время в клинической практике.
- Механизм действия коразола – блокада ГАМК_A-рецептора
- Если вещество подавляет интероцептивные эффекты коразола, т.е. препятствует воспроизведению ЛкД, то оно является лигандом положительных модуляторных сайтов ГАМК_A-рецепторов
- Интероцептивные эффекты коразола подавляются барбитуратами, бензодиазепинами и другими ГАМКергическими препаратами
- Вещество G-72 является анксиолитиком и есть основания полагать, что этот эффект реализуется через ГАМК_A-рецептор



Jacob et al., Nature Reviews Neuroscience, 2008

Результаты теста на антагонизм после выработки лекарственной дифференцировки «коразол – физ. р-р»



** - Отличие от коразола при $p < 0,01$

Будьте здоровы!





Возможности оптической микроскопии в
биологии, медицине и фармации
Эффективное увеличение
Глубина резкости (ГРИП)

Бобкова Наталья Владимировна
профессор кафедры
фармацевтического естествознания, д.ф.н.

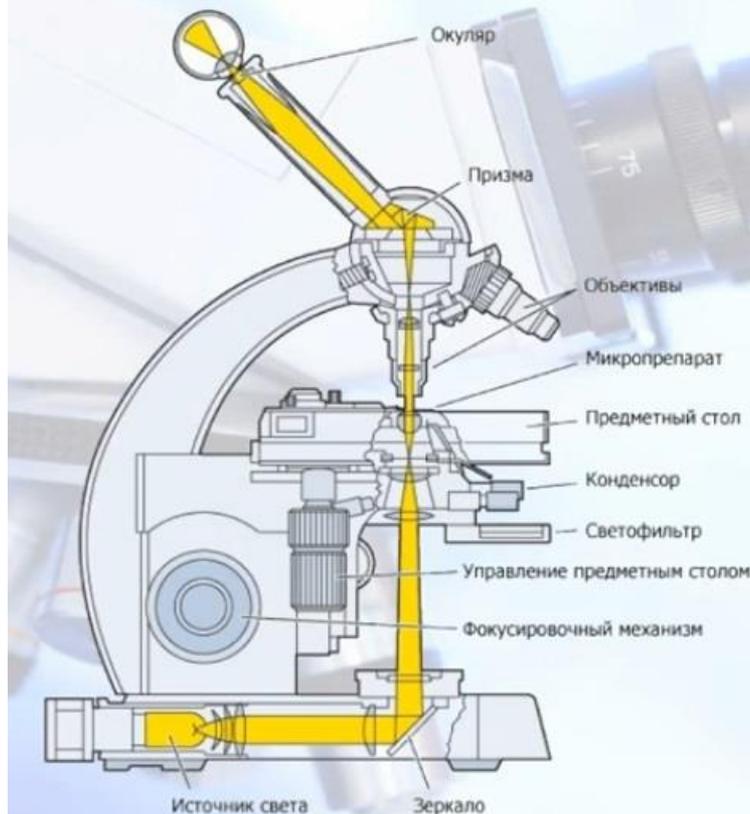
trigonellafoenum@yandex.ru

+7(916)0763866

Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)

МИКРОСКОП



*Микроскоп –
двухступенчатая
система увеличения.*

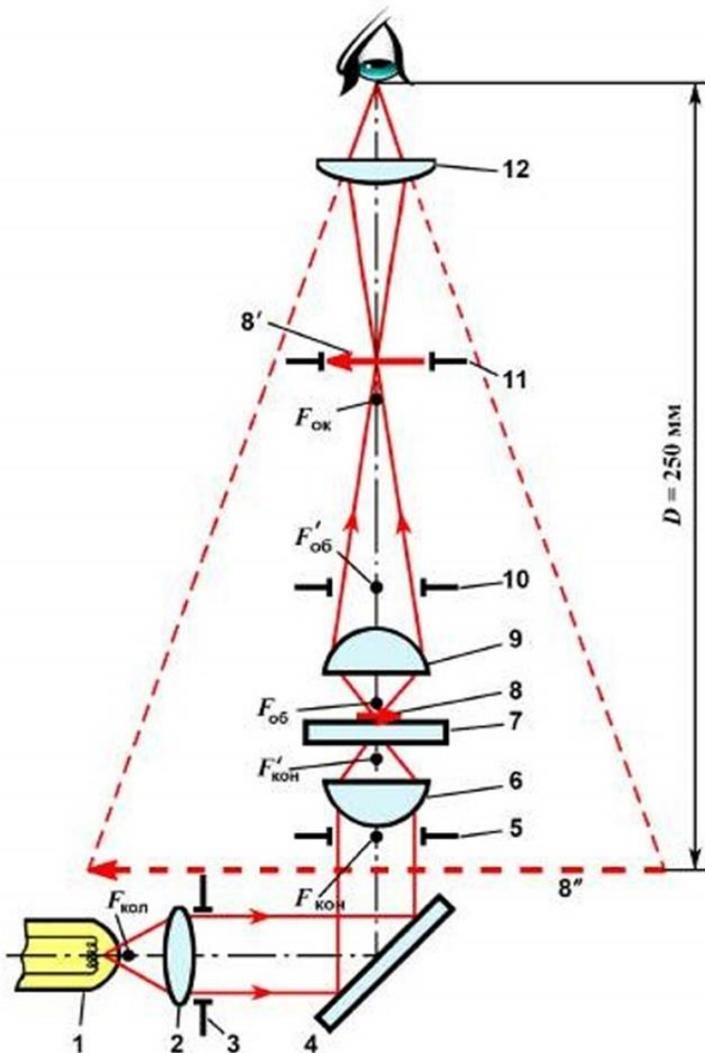
$$V = V_{об} \times V_{ок}$$

$V_{об}$ – увеличение объектива

$V_{ок}$ – увеличение окуляра

Возможности оптической микроскопии в биологии, медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)



Объектив создает действительное, перевернутое и увеличенное изображение в плоскости полевой диафрагмы окуляра. Это изображение рассматривают через окуляр, который работает как лупа.

Окуляр создает дополнительное увеличение и образует мнимое прямое изображение на расстоянии наилучшего видения D , принятого равным 250 мм.

Общее увеличение микроскопа равно произведению действительного увеличения объектива на видимое увеличение окуляра

Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)

Оптико-конструктивные характеристики светового микроскопа

1. Увеличение микроскопа
2. Разрешение микроскопа
3. Полезное (эффективное
увеличение)
4. Глубина резкости (ГРИП)
микроскопа

Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)

БАЗОВЫЕ ОПТИЧЕСКИЕ СХЕМЫ МИКРОСКОПА И ЕГО УВЕЛИЧЕНИЕ



$$V = \frac{f'_л}{f'_{об}} \times V_{ок}$$

$f'_{об}$ – фокусное расстояние объектива

$f'_л$ – фокусное расстояние тубусной линзы

$V_{ок}$ – увеличение окуляра

Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)



Labeling of the objective

Objective class, special designations are used for this, e.g. LD for Long Working Distance

Magnification/ numerical aperture

plus additional details on

- immersion medium (Oil/W/Glyc)
- adjustable cover glass correction (Korr.)
- contrast method

Tube length/cover glass thickness (mm)

ICS optics: ∞
Infinity Color Corrected System

standard cover glass: 0.17
without cover glass: 0
insensitive: -

Mechanical correction collar for

- cover glass thickness correction
- different immersion
- different temperature
- adjusting an iris diaphragm

Color of writing

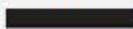
Contrast method

Standard 

Pol/DIC 

Ph 0 1 2 3 

Color coding of magnification

1.0/1.25 

2.5 

4/5 

6.3 

10 

16/20/25/32 

40/50 

63 

100/150 

Immersion fluid

Oil 

Water 

Glycerin 

Oil/Water/Glycerin 



Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)

Три объектива - 4x, 10x, 40x



Два окуляра - 10x и 16x

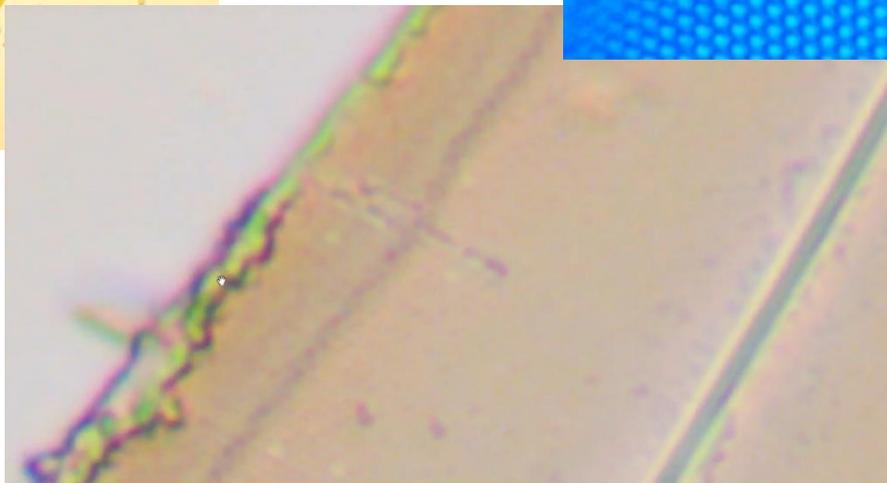


Три объектива и два окуляра дают возможность рассмотреть объект на шести различных увеличениях. Кратность микроскопа (X) = X (объектива)*X(окуляра)

Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)

Предел разрешения – это минимальное расстояние между двумя точками, при котором их изображения отличаются от изображения одной точки.



Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)

Предел разрешения – это минимальное расстояние между двумя точками, при котором их изображения отличаются от изображения одной точки.

Широко распространено заблуждение, что разрешение микроскопа и его увеличение связаны между собой жесткой связью – чем больше увеличение, тем более мелкие объекты мы сможем в него увидеть. Это не верно. Самым важным фактором всегда остается разрешение оптической системы. Ведь увеличение неразрешенного изображения не даст нам о нем новой информации.

Разрешение микроскопа зависит от числового значения апертуры объектива, а также от длины волны источника освещения. Как вы видите, параметра увеличения системы в этой формуле нет.

$$d = \frac{\lambda}{2A}$$

Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)

Предел разрешения микроскопа –

наименьшее расстояние между двумя точками предмета, при котором они различимы.

$$Z = \lambda / 2 n \sin \alpha$$

- ⊙ z – предел разрешения
- ⊙ λ - длина волны света
- ⊙ n – показатель преломления среды между объективом и объектом
- ⊙ α – апертурный угол

Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Увеличение и разрешение микроскопа

РАЗРЕШАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ОПТИЧЕСКОГО МИКРОСКОПА

$$\delta = 0,51 \times \frac{\lambda}{A_{об}}$$

или

$$\delta = \frac{\lambda}{A_{об} + A_{к}} \cong \frac{\lambda}{2A_{об}}$$

λ – длина волны свет; $A_{об}$ – апертура объектива;
 $A_{к}$ – апертура конденсора.

Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)

ЧИСЛОВАЯ АПЕРТУРА

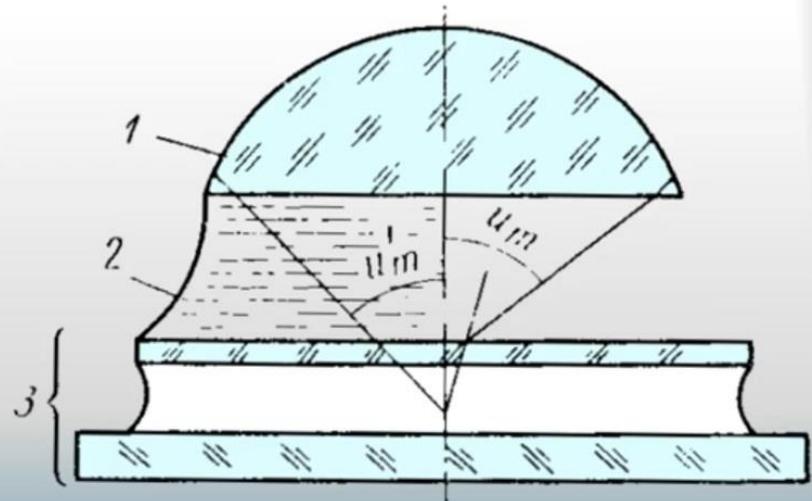
$$A = n \times \sin \mu$$

Если $\mu_k = 0, k = 1$
и $n \sin \varphi = A_{об}$:

$$\delta = \frac{\lambda}{A_{об}}$$

Если $\mu_k \neq 0, n \sin \mu_k = A_k$:

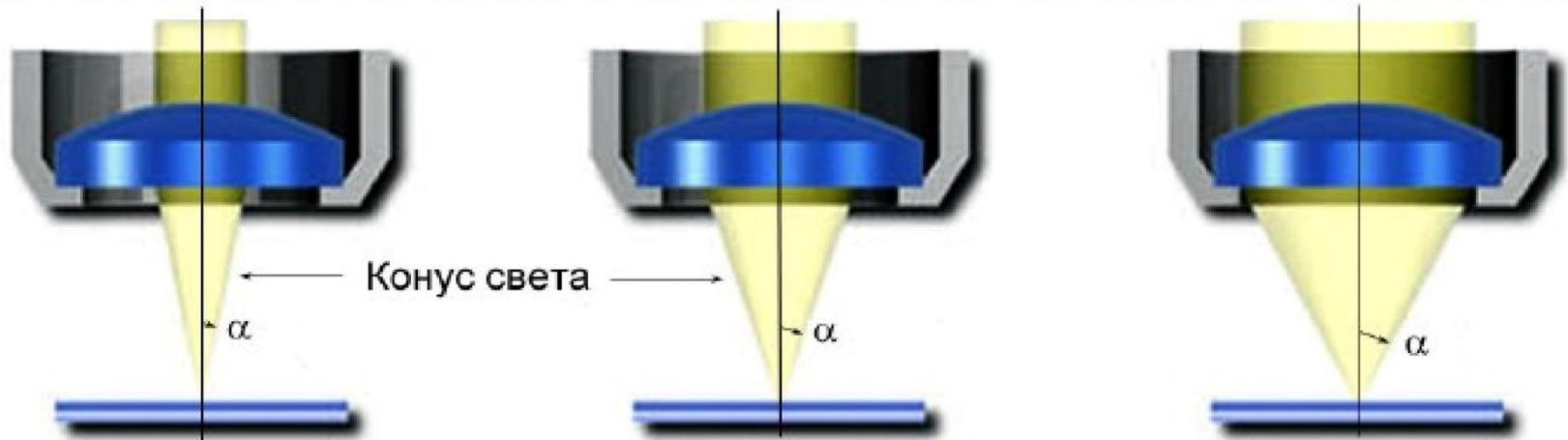
$$\delta = \frac{\lambda}{A_{об} + A_k}$$



Влияние иммерсии на
апертуру объектива.

- 1 – Фронтальная линза объектива
- 2 – Иммерсионная жидкость
- 3 - Препарат на предметном стекле,
закрит покровным стеклом.

Угловая и числовая апертуры



Числовая апертура (NA) – синус половинного угла (α) конуса света, собираемого объективом.

Для иммерсионного объектива величина апертуры умножается на коэффициент преломления иммерсионной жидкости (масла, воды):

$$NA = n \cdot \sin \alpha$$

Возможности оптической микроскопии в биологии, медицине и фармации

Увеличение и разрешение микроскопа

- Качество изображения определяется разрешающей способностью микроскопа, т.е. минимальным расстоянием, на котором оптика микроскопа может различить раздельно две близко расположенные точки.
- Разрешающая способность зависит от числовой апертуры объектива, конденсора и длины волны света, которым освещается препарат. Числовая апертура (раскрытие) зависит от угловой апертуры и показателя преломления среды, находящейся между фронтальной линзой объектива и конденсора и препаратом.
- **Угловая апертура объектива** - это максимальный угол , под которым могут попадать в объектив лучи, прошедшие через препарат.
- **Числовая апертура** объектива равна произведению синуса половины угловой апертуры на показатель преломления среды, находящейся между предметным стеклом и фронтальной линзой объектива.
- $N.A. = n \cdot \sin \alpha$ где,
N.A. - числовая апертура
n - показатель преломления среды между препаратом и объективом;
 $\sin \alpha$ - синус угла α равного половине угла угловой апертуры

Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Увеличение и разрешение микроскопа



Возможности оптической микроскопии в биологии, медицине и фармации

Объективы и окуляры микроскопа

ВНИМАНИЕ

Предположим, что у нас есть два варианта построения простого лабораторного микроскопа. Первый построим, используя объектив 40x NA 0,65 и окуляры 10x. Второй же будет использовать объектив 20x NA 0,4 окуляры 20x.

Увеличение микроскопов в обоих вариантах будет одинаковое = 400x (простое перемножение увеличения объектива и окуляров). А вот разрешение в первом варианте будет выше, чем во втором, так как числовая апертура объектива 40x больше.

$$d = \frac{\lambda}{2A}$$

Возможности оптической микроскопии в биологии, медицине и фармации

Объективы и окуляры микроскопа

Пути повышения оптической разрешающей способности:

○ **Выбор большого угла светового конуса**, как со стороны объектива, так и со стороны источника освещения. Благодаря этому, возможно, собрать в объективе более преломленные лучи света от очень тонких структур. Таким образом, первый путь повышения разрешения - это использование конденсора, числовая апертура которого соответствует числовой апертуре объектива.

○ **Второй способ** - использование иммерсионной жидкости между фронтальной линзой объектива и покровным стеклом. Так мы воздействуем на показатель преломления среды n

Методы повышения разрешения

Формула Аббе:

$$d = 0.61 \frac{\lambda}{n * \sin \alpha}$$

где λ – длина волны света;

n – показатель преломления среды ;

α – половина угла раскрытия объектива

$$d = 1.22 \lambda / (NA_{об} + NA_{кон})$$



Возможности оптической микроскопии в биологии, медицине и фармации

Объективы и окуляры микроскопа

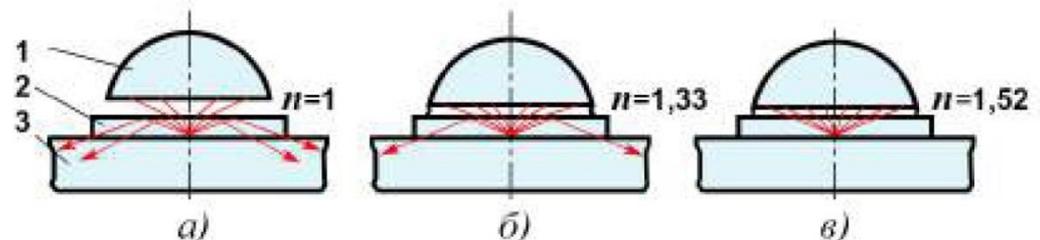
Пути повышения оптической разрешающей способности:

- Второй способ - использование иммерсионной жидкости между фронтальной линзой объектива и покровным стеклом. Так мы воздействуем на показатель преломления среды n

Применение иммерсионных объективов также приводит к уменьшению уровня рассеянного света и уменьшению потерь из-за полного внутреннего отражения в покровном стекле.

На рисунке представлен ход лучей в сухом объективе (а) и объективах водной (б) и масляной (в) иммерсий.

1 – фронтальная линза объектива; 2 – покровное стекло; 3 – предметное стекло;
 n – показатель преломления



Методы повышения разрешения

Формула Аббе:

$$d = 0.61 \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha}$$

где λ – длина волны света;

n – показатель преломления среды ;

α – половина угла раскрытия объектива

$$d = 1.22 \lambda / (NA_{об} + NA_{кон})$$



Возможности оптической микроскопии в биологии, медицине и фармации

Увеличение и разрешение микроскопа

Иммерсионные объективы:

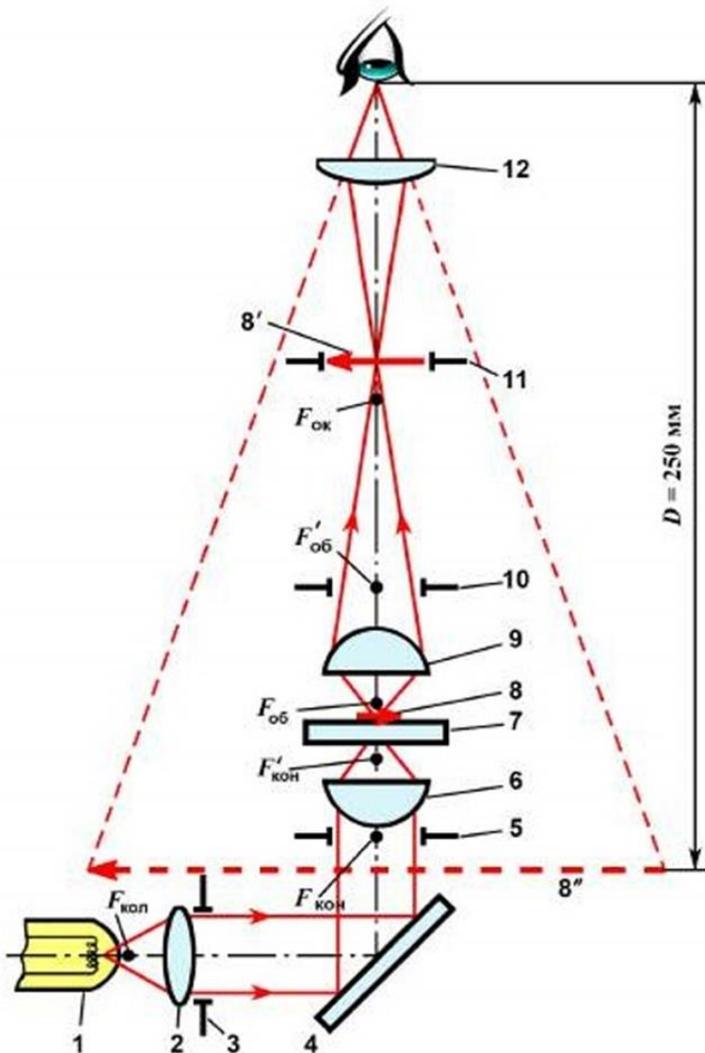
- водной иммерсии (белое кольцо)
- масляной иммерсии (черное кольцо)
- глицериновой иммерсии (желтое кольцо)
- монобромнафталиновой иммерсии (красное кольцо)

В световой микроскопии биологических препаратов применяются объективы водной и масляной иммерсии. Специальные кварцевые объективы глицериновой иммерсии пропускают коротковолновое ультрафиолетовое излучение и предназначены для ультрафиолетовой (не путать с люминесцентной) микроскопии (то есть для изучения биологических объектов, избирательно поглощающих ультрафиолетовые лучи). Объективы монобромнафталиновой иммерсии в микроскопии биологических объектов не используются.



Возможности оптической микроскопии в биологии, медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)



Объектив создает действительное, перевернутое и увеличенное изображение в плоскости полевой диафрагмы окуляра. Это изображение рассматривают через окуляр, который работает как лупа.

Окуляр создает дополнительное увеличение и образует мнимое прямое изображение на расстоянии наилучшего видения D , принятого равным 250 мм.

Общее увеличение микроскопа равно произведению действительного увеличения объектива на видимое увеличение окуляра

Возможности оптической микроскопии в биологии, медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)

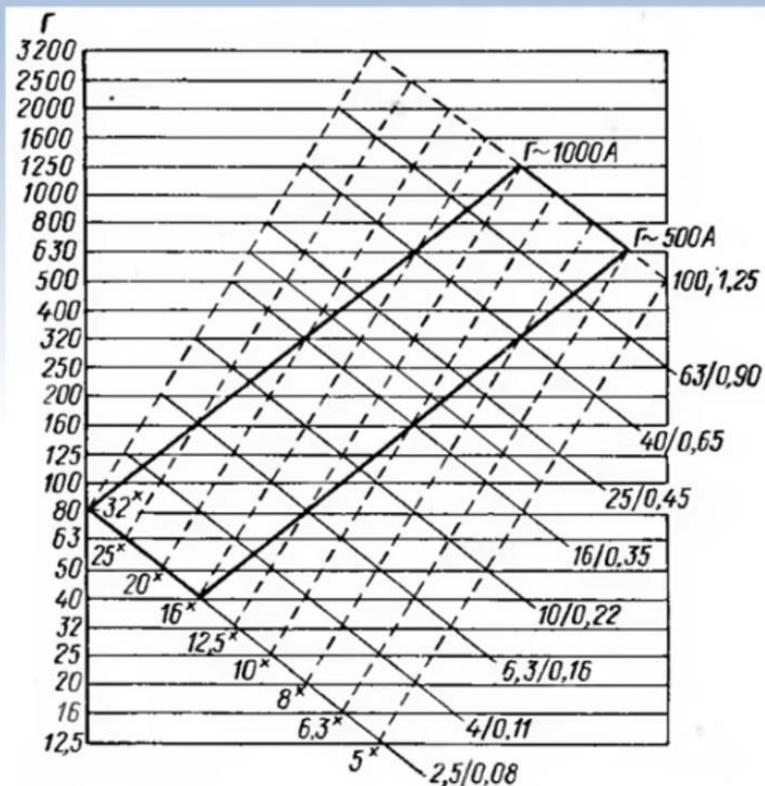
Средняя острота зрения человека находится в пределах $2' < \varepsilon < 4'$ (угловых минут) на *расстоянии наилучшего видения*, равного $D = 250 \text{ мм}$, что соответствует расстоянию между разрешаемыми деталями объекта $0,15 \div 0,30 \text{ мм}$ (при $\lambda = 0,0005 \text{ мм}$). Учитывая, что видимое увеличение микроскопа $\Gamma = 0,61\lambda/A$, получим **полезное увеличение микроскопа:**
 $\Gamma = \Gamma_{\text{ок}} \cdot \Gamma_{\text{об}} = (500 \div 1000) \text{ А.}$

В пределах полезного увеличения разрешающая способность микроскопа полностью реализуется. Увеличение меньше 500А не дает возможности увидеть все тонкости структуры препарата, так как разрешающая способность глаза в этом случае меньше, чем у микроскопа. При увеличении больше 1000А нельзя выявить никаких новых подробностей в изображении. При дальнейшем повышении увеличения качество изображения будет только ухудшаться из-за явлений, связанных со слишком малыми размерами выходного зрачка микроскопа.

Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)

ВЫБОР СОЧЕТАНИЯ ОБЪЕКТИВ-ОКУЛЯР эффективное увеличение



$$20 \times 0,40 \times 32 = 640$$

$$40 \times 0,65 \times 15 = 640$$

$$60 \times 0,85 \times 10 = 600$$

$$100 \times 1,25 \times 7 = 700$$

Что выбрать?

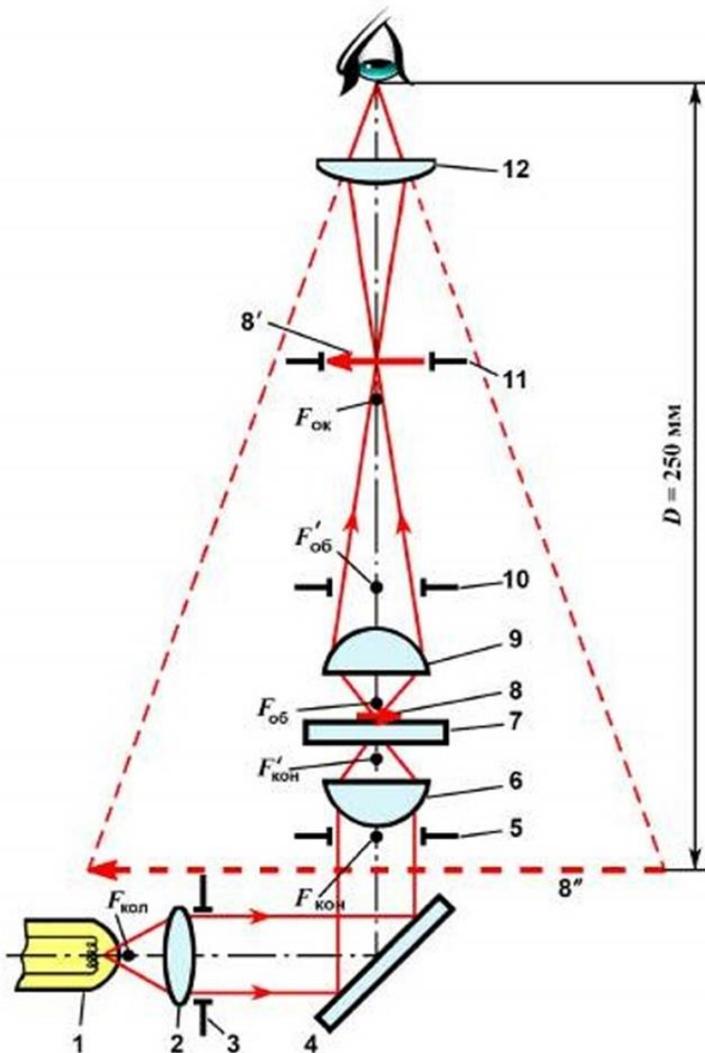
$$\Gamma = 500 \dots 1000 \times A$$

A — числовая апертура объектива

Γ — общее увеличение микроскопа

Возможности оптической микроскопии в биологии, медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)



Объектив создает действительное, перевернутое и увеличенное изображение в плоскости полевой диафрагмы окуляра. Это изображение рассматривают через окуляр, который работает как лупа.

Окуляр создает дополнительное увеличение и образует мнимое прямое изображение на расстоянии наилучшего видения D , принятого равным 250 мм.

Общее увеличение микроскопа равно произведению действительного увеличения объектива на видимое увеличение окуляра

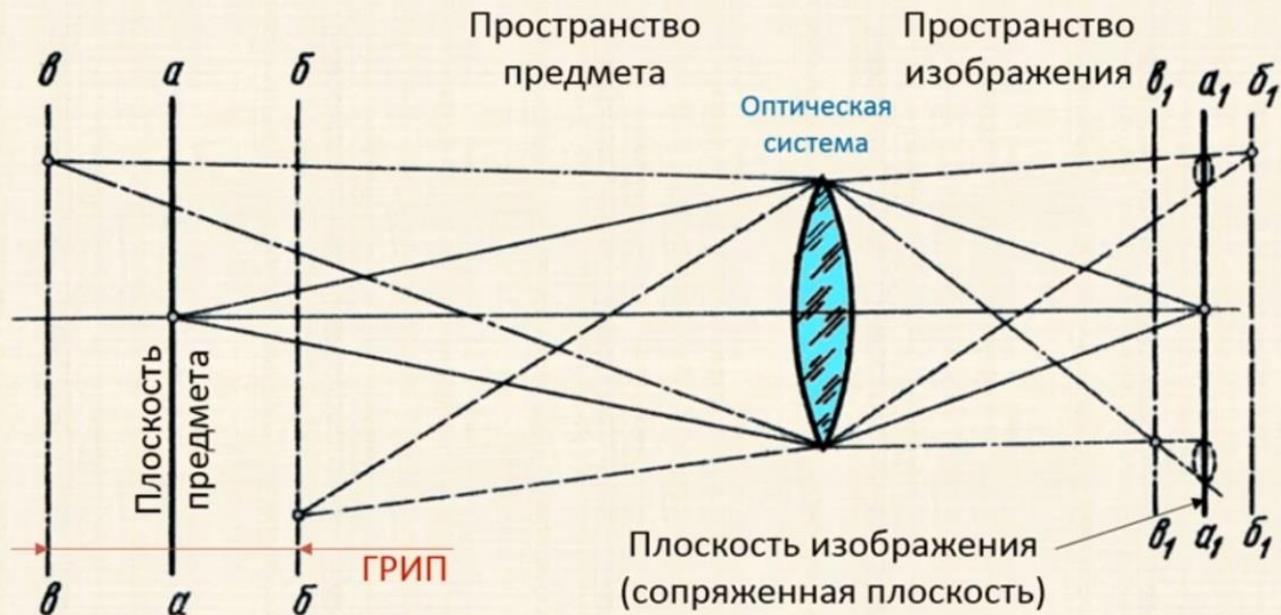
Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)

ГЛУБИНА РЕЗКОСТИ

Глубина резко изображаемого пространства (ГРИП)

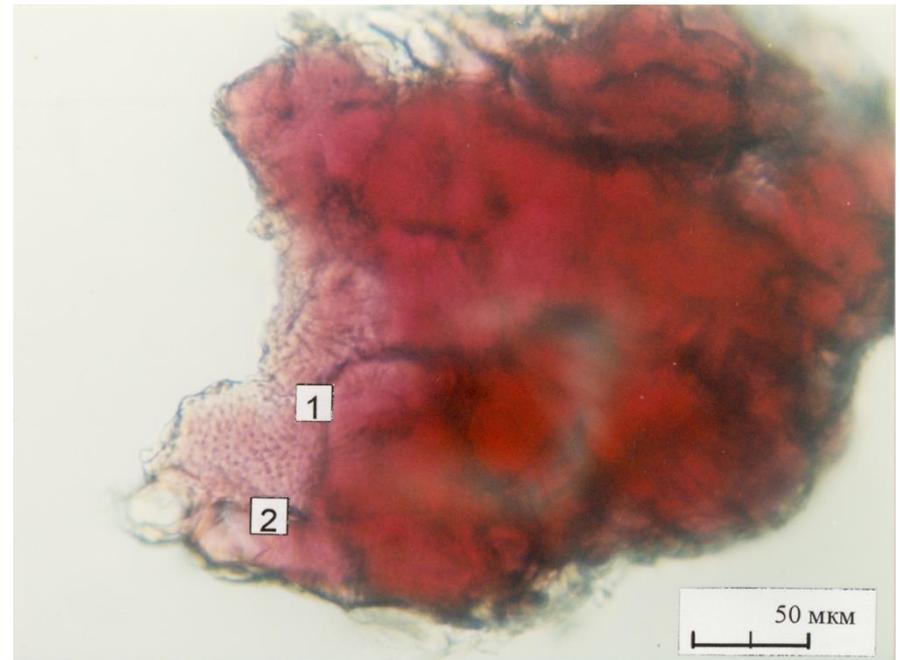
- Расстояние вдоль оптической оси объектива между двумя плоскостями в пространстве предметов, в пределах которых объекты отображаются в сопряженной плоскости субъективно резко.



Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)

- **Глубиной резкости микроскопа** является мера того, насколько все части объекта, который мы рассматриваем, остаются в фокусе одновременно; термин **глубина** фокуса относится к расстоянию, на которое изображение может перемещаться по отношению к объекту и оставаться в фокусе.

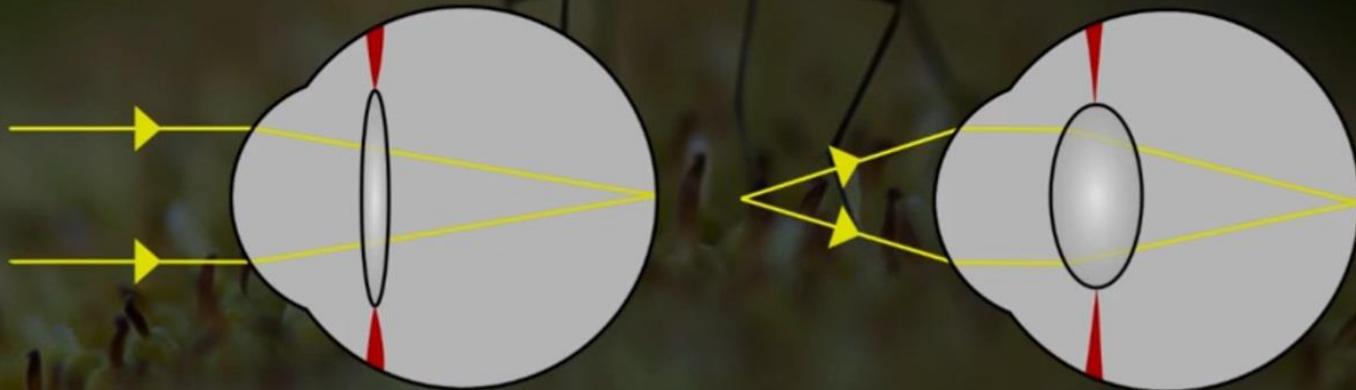


Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)

Глубина резкости изображения создаваемого микроскопом

- ГРИП микроскопа складывается из трех составляющих – *аккомодационной, геометрической* и *волновой* глубин резкости.



Аккомодационная составляющая:
 V – общее увеличение микроскопа.

$$T_{\text{ак}} = \frac{250000}{V^2} = [\text{мкм}]$$

Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)

Глубина резкости изображения создаваемого микроскопом

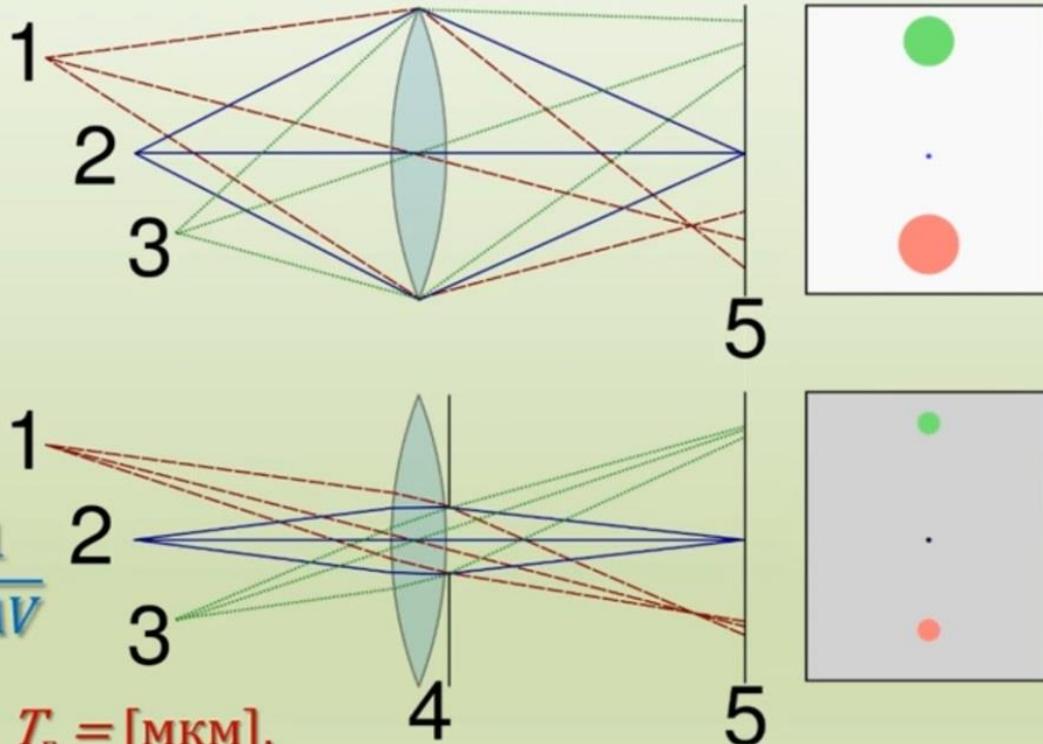
1...3 – точки в пространстве
предметов;
4 – диафрагма;
5 – плоскость изображения
(сопряжена с т.2).

Геометрическая
составляющая
глубины резкости:

$$T_r = \frac{250000\varepsilon}{AV} = \frac{1}{7AV}$$

Принимаем $\varepsilon = 2'$, $T_r = [\text{мкм}]$.

A – числовая апертура объектива;
 V – общее увеличение микроскопа.



Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)

Глубина резкости изображения наблюдаемого через микроскоп

- Волновая составляющая глубины резкости обусловлена природой света:

$$T_B = \frac{\lambda}{2A^2}$$

λ – длина волны света;
 A – числовая апертура объектива.

- Полная глубина резкости изображаемого пространства без перефокусировки микроскопа:

$$T = T_{ак} + T_{Г} + T_B = \frac{250000}{V^2} + \frac{1}{7AV} + \frac{\lambda}{2A^2}$$

V – общее увеличение микроскопа; A – числовая апертура объектива;
 λ [мкм] – длина волны света.

При использовании окуляра с сеткой и микрофотографии – аккомодационная составляющая отсутствует! $T_{ак} = 0$

Возможности оптической микроскопии в биологии,
медицине и фармации

Эффективное увеличение Глубина резкости (ГРИП)

Что нужно знать при работе с оптическим микроскопом:

- *Увеличение микроскопа:* $V = V_{об} \times V_{ок}$ $V = V_{об} \times V_{ок} \times q$
- *Разрешение микроскопа:* $\delta = \frac{\lambda}{2A}$ $A = \frac{\lambda}{2\delta}$
- *Полезное увеличение:* $\Gamma = 500 \dots 1000 \times A$
- *ГРИП микроскопа:* $T = T_{ак} + T_{\Gamma} + T_{в} = \frac{250000}{V^2} + \frac{1}{7AV} + \frac{\lambda}{2A^2}$

$V_{об}$ – увеличение объектива; $V_{ок}$ – увеличение окуляра; q – увеличение тубусной линзы; V – общее увеличение микроскопа; λ – длина волны света [мкм]; A – числовая апертура объектива.

КЛАССИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

Кафедра патологии человека Первого МГМУ

проф. Салтыков А. Б.

ИММУНОЛОГИЯ

исторически сформировалась
как раздел микробиологии



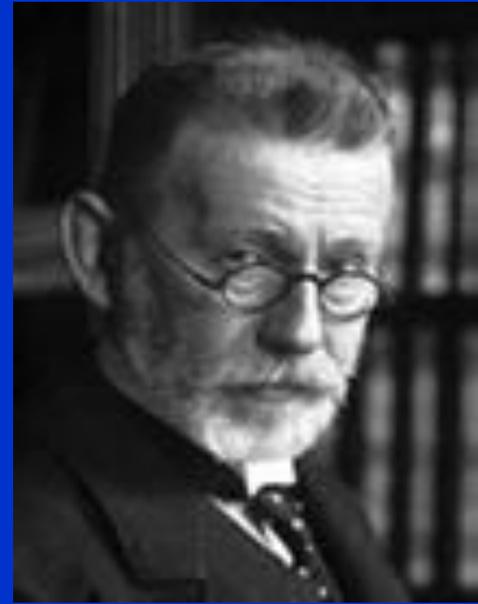
Дженнер Э.
1749 - 1823



Пастер Л.
1822 – 1895



Кох Р.
1843 – 1910



Эрлих П.
1854 – 1915

*ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ СПЕЦИФИЧНЫ
и НАПРАВЛЕННЫ ПРОТИВ ЧУЖЕРОДНОГО*

The
Economist

The Catholic church's unholy mess
Paul Ryan: the man with the plan
Generation Xhausted
China, victim of the Olympics?

On the origin of species

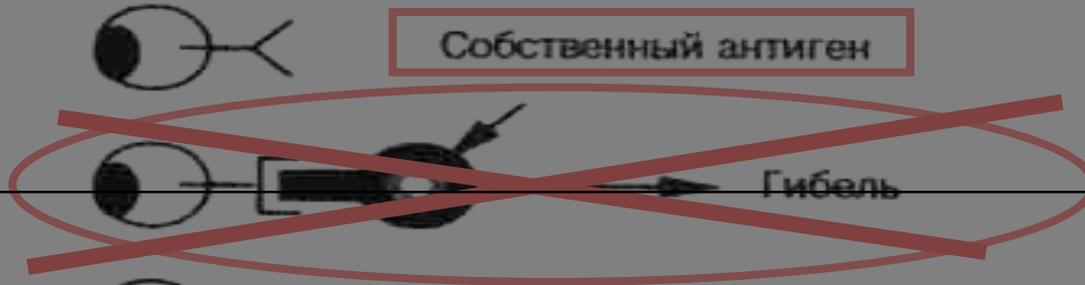
Microbes maketh man



**“Everything is infection
until proven otherwise”**

In: Infection and Autoimmunity
Ed.: Yehuda Shoenfeld, Noel Rose, 2004

Клонально – селекционная теория Бернета Ф., 1959



Эмбрион

Рождение

~~аутореактивные~~

~~антигены и Т-лимфоциты~~

несущих
одна клетка — один антиген — один АГ

Клональная селекция и
деление клеток — клональная экспансия

Супрессорный эффект



антигенная
депривация

Взаим. Fcy-рец. В-л.
с ревматоидным
фактором

Активир.
лимфоциты
экспрессируют Fas

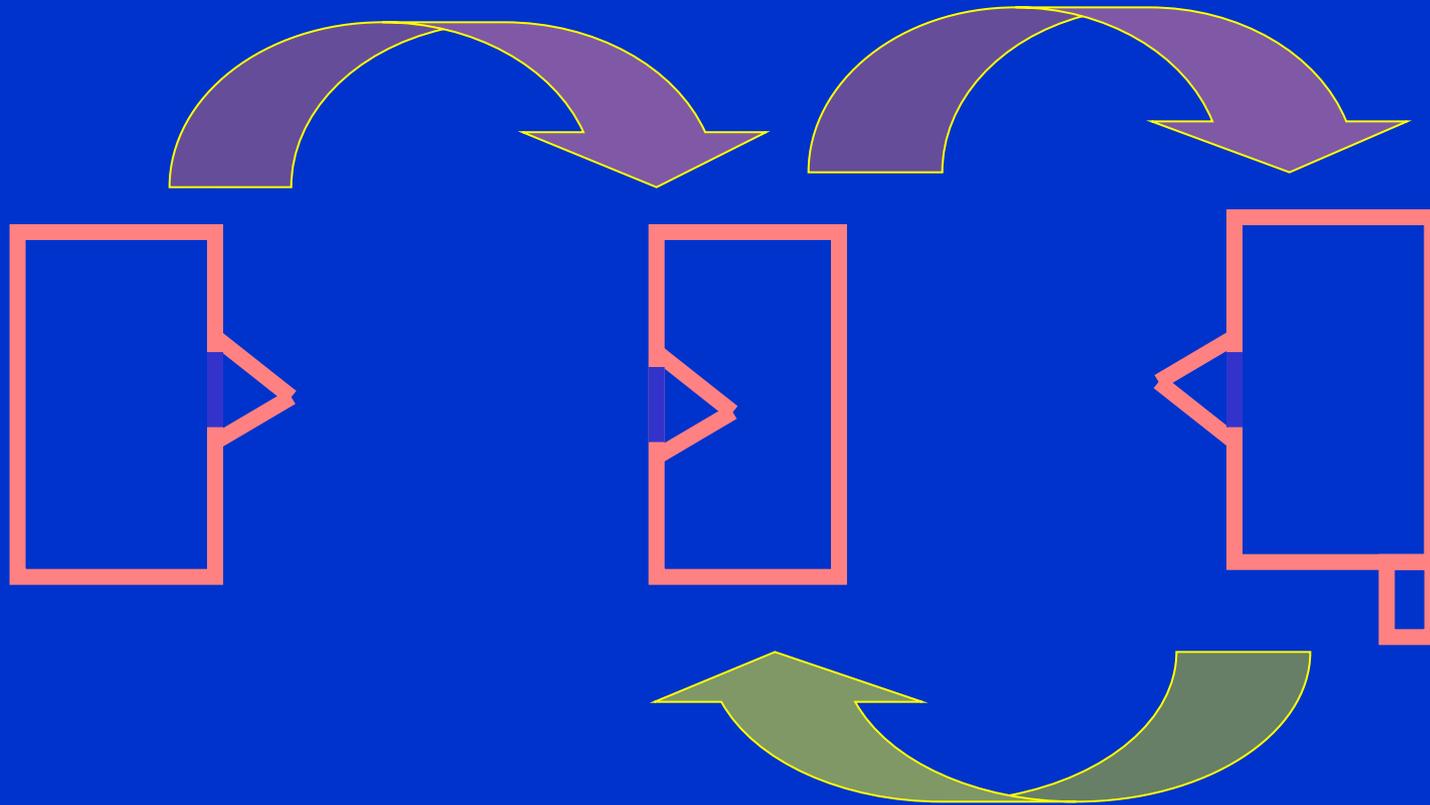
АПОПТОЗ,
↓ пролиферации

Синтез АКТГ
лимфоцитами

Через 3 недели -
программа AICD
(Activation Induced Cell
Death)

T- (CD25⁺)
B - регулят.
клетки

ИДИОТИП – АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ (ЕРНЕ Н., 1974)



АНТИГЕН

АНТИТЕЛО

АНТИ-АНТИТЕЛО

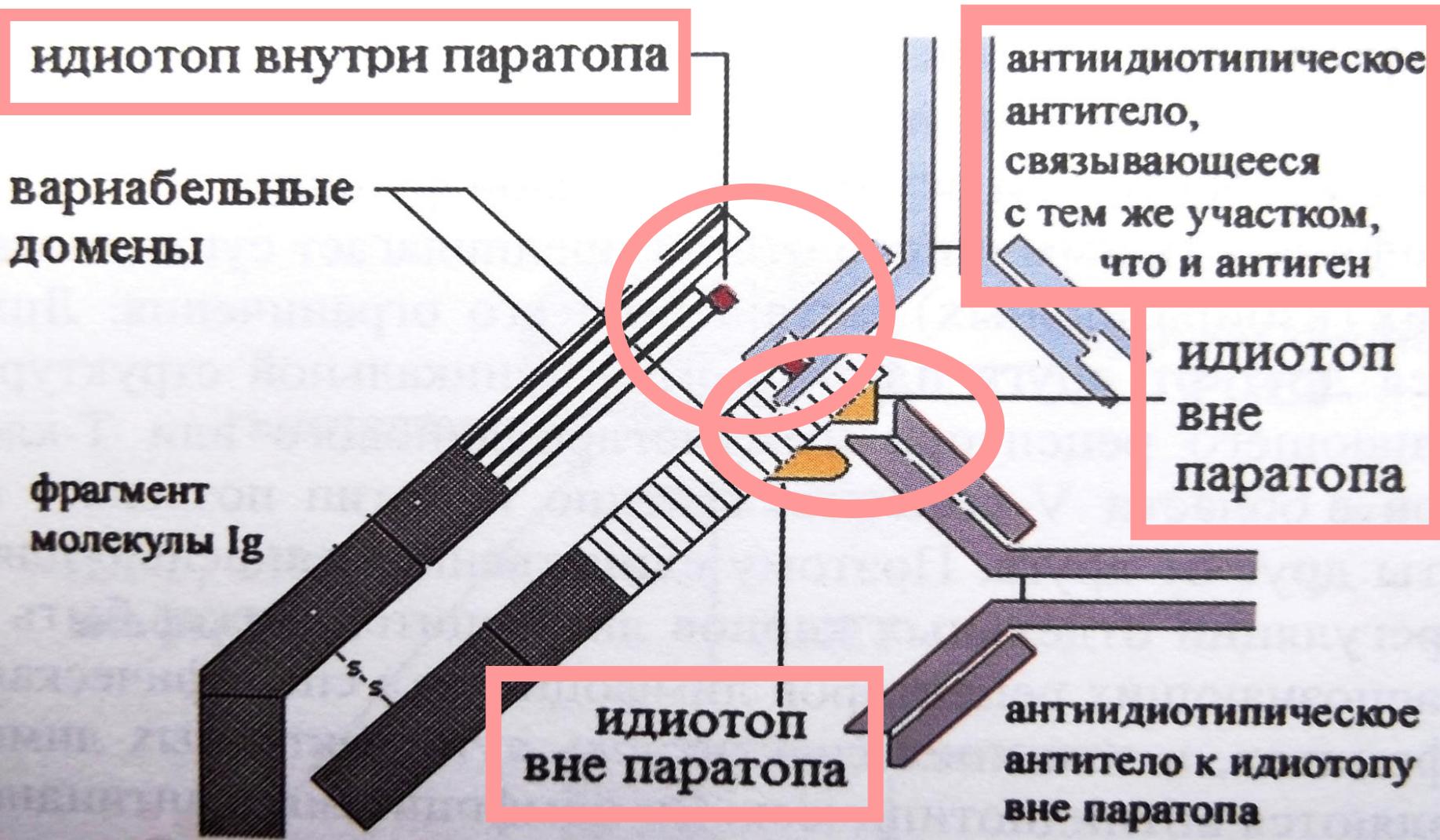
ЭПИТОП

ИДИОТИП

АНТИИДИОТИП

в т.ч. аутореактивные

ИДИОТИП – АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ



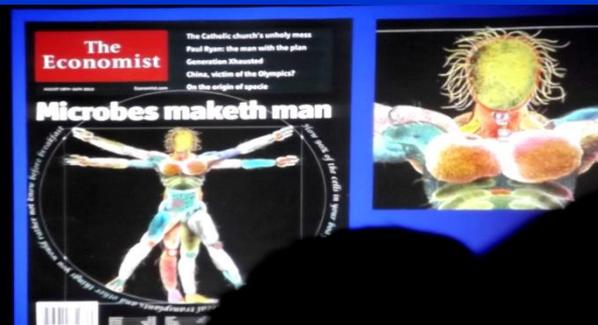
**ИММУННАЯ СИСТЕМА
"НЕ ВИДИТ" АУТО-АГ**

Иммунная система видит чужеродное

Атакует только чужеродное

Иммунные реакции строго специфичны

МОЛЕКУЛЯРНАЯ МИМИКРИЯ



ГОМОЛОГИЯ

ЭПИТОПОВ ЧЕЛОВЕКА

И МИКРООР-МОВ

Ревматоидный артрит (эндокардит), СКВ, диффузный гломерулонефрит, аутоиммунные поражения крови, противоопухолевые реакции, реакция Вассермана (выявляет антитела, гомологичные фосфолипидам трепонемы и кардиолипину человека)

МОДИФИКАЦИЯ

АГ И ауто-АГ

СУПЕРАНТИГЕНЫ

нет процессинга в АПК

активируют в 100-500 раз больше лимфоцитов

**ПОЛИКЛОНАЛЬНОСТЬ ОТВЕТА -
ПЕРЕЗРЕСТАЯ РЕАКТИВНОСТЬ**

Staphylococcus aureus, *Streptococcus pyogenes*,
Mycoplasma arthridis, часть онковирусов

T-лимфоциты в тимусе и НЛЛ



К
О
Р
К
О
В
А
Я

З
О
Н
А

М
О
Л
О
Д
О
В
А
Я

З
О
Н
А

АКТИВАЦИЯ T_H - и T_C -лимфоцитов



дендритная клетка



ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРЕДРАСПОСЯЖЕННОСТЬ

- ◆ HLA и индивидуальность иммунного ответа

HLA-DR2 - рассеянный склероз

HLA-DR3 - СКВ

HLA-DR4 - ревматоидный артрит

HLA-DR5 - б-нь Хашимото

- ◆ у любого человека не более 12 вариантов молекул HLA

- ◆ HLA и "родственные" им эпитопы патогенов
Перекрестная реактивность ауто-АГ

Отторжение трансплантата - - перекрестное реагирование по молекулам МНС

- ◆ **ПРЯМОЙ ПУТЬ** поликлон. активации
(неполная совместимость трансп-та по МНС)
комплекс «пептид донора + МНС донора»
воспринимается реципиентом как
«чужерод. пептид + собственная МНС»
- ◆ **НЕПРЯМОЙ ПУТЬ** (трансп-т персистирует)
- АПК презентируют аллогенные пептиды в
комплексе с МНС реципиента

♦ ↑ ДОСТУПНОСТИ ЗАБАРЬЕРНЫХ АУТО-АГ

Симпатическая офтальмия, тиреоидит Хашимото, орхит, демиелинизация нервов

♦ ИММУНОДЕФИЦИТЫ

↓ «знакомство» лимфоцитов с ауто-АГ

↓ супрессия и элиминация аутореактивных клонов

**АУТОАГРЕССИЯ ПО МЕХАНИЗМУ
ПЕРЕКРЕСТНОЙ РЕАКТИВНОСТИ**

Агаммаглобулинемия Брутона сопровождается ГЗТ с ревматоидным артритом, СКВ, дерматомиозитом (дефицит антиидиотипических ауто-АГ)

Гипоплазия тимуса - тотальный срыв иммунотолерантности

♦ ↑ доступности забарьерных ауто-АГ

Симпатическая офтальмия, тиреоидит Хашимото, орхит, демиелинизация нервов

♦ иммунодефициты

↓ «знакомство» лимфоцитов с ауто-АГ

↓ супрессия и элиминация аутореактивных клонов

АУТОАГРЕССИЯ ПО МЕХАНИЗМУ
ПЕРЕКРЕСТНОЙ РЕАКТИВНОСТИ

♦ гипотетическая теория

↓ АГ-возд-вий



↓ ВЫСОКОСПЕЦ. ИММУН. Р-ЦИЙ

множественные 3-мерные взаимодействия

CD4 TCR

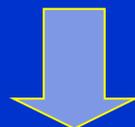


CD8 TCR



костимулирующие молекулы

CD28, CD40, CD80, CD86 (CD40 - CD154 при взаим. Th и В-л.)



относит. специфичность реагирования

дендритная
клетка

лимфоцит



ИММУННАЯ СИСТЕМА

Распознавание
и удаление ге-
нетически чуже-
родных В – В

Регуляция
гомеостаза -
концепция
иммункулуса

молекулярная
мимикрия
инфекции

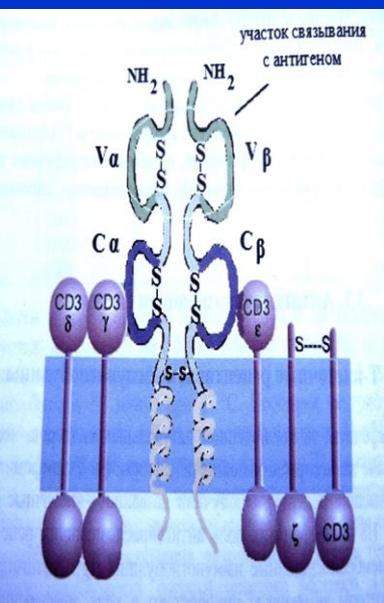
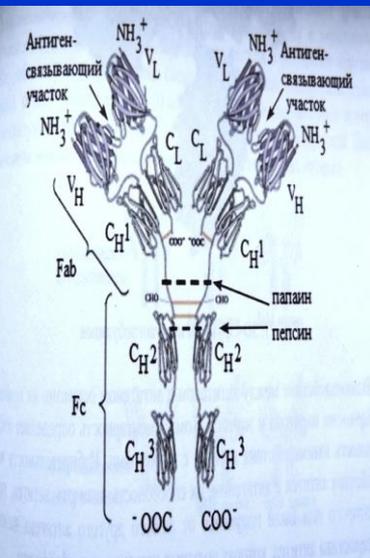


перекрестные
ауто-АГ
организма

любая реакция ~ аутоиммунная

Варьирование длины
АГ-связывающих
участков Ig, T-л, PRR

↑ СПЕЦИФИЧНОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА

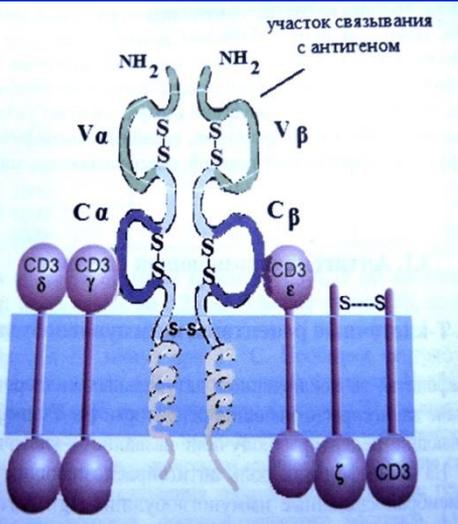
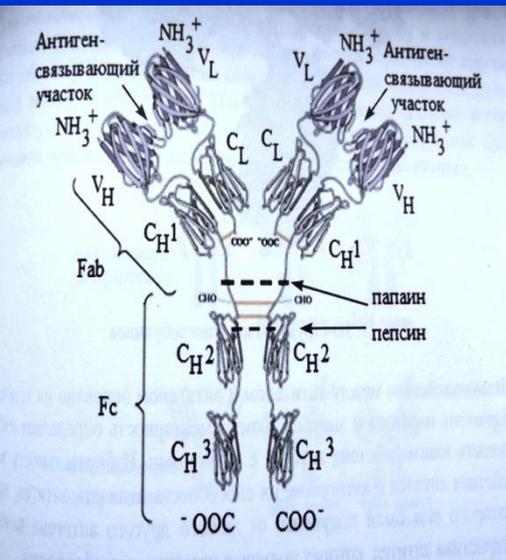


СОМАТИЧЕСКОЕ
ГИПЕРМУЛТИРОВАНИЕ
ГЕНОВ ВАРИАБ. ЗОНЫ I
IgG, IgA

РЕДАКТИРОВАНИЕ
АНТИГЕННЫХ
РЕЦЕПТОРОВ
ЛИМФОЦИТОВ И Ig

АПОПТОЗ ИЗЖИВАЮЩЕ-
ФИНИШ И КЛОНОВ

↑ СПЕЦИФИЧНОСТИ АДАПТ. ИММУН. ОТВЕТА СПОСОБСТВУЕТ



◆ НЕИЗМЕННОСТЬ АГ

◆ ПЕРСИСТИРОВАНИЕ АГ

◆ ОТСУТСТВИЕ ВОСТАЛЕНИЯ

НЕСТЕЦИФ. ИММУНОКОРРЕКЦИЯ

ИММУНОСУПРЕССИЯ

- Антигист. пр-ТЫ (цитеризин, фексофенадин, клемастин)
- Цитостатики (циклофосфамид, хлорамбуцил)
- Пептидные иммунодепрессанты (циклоспорин, FK 506) - блокаторы синтеза цитокинов

ИММУНОСТИМУЛЯЦИЯ

- Амиксин, дибазол (индукторы синтеза ИФН)
- Виферон, КИП-ферон (аналоги α -ИФН)
- Ликопид, полиоксидоний (активаторы АПК)

НЕИЗБИРАТЕЛЬНАЯ ИММУНОМОДУЛЯЦИЯ

- Донорские Ig (IVIG/SCIG-терапия) - при пат. иммуносупрессии и иммуноактивации

специф. лечение опухолей человека

- Вакцинация вирусным антигеном (профилактика и лечение рака шейки матки)
- Вакцинация дендритными клетками, обработанных лизатами опухолей → ↑ Тц при В-клеточной лимфоме и др. опухолях (изначально ДК больного не выполняют свои ф-ции из-за секреции опухолью ИЛ-10, ТФР-β – трансформир. фактора роста)
- Лечение моноклональными антителами
 - антитела, блокирующие рецепторы факторов роста
 - конъюгированными с цитотоксином (рицином)
 - конъюгированные с радиоакт. молекулой (йод¹³¹, индий-111)

специфическая иммуноterapia др. з-ний

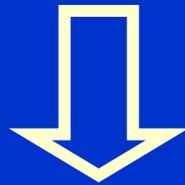
ИММУНОПРЕПАРАТЫ - биогенные пептиды, синтетич. пр-ты, в-ва микробного генеза (бронхомунал, рибомунил, постеризан, бестагин, имудон, деринта, ликопид, гистамин)
+ антибакт., противовоспалит. (гормон., негормон.), симптоматич. терапия

- ◆ **Осуществляется в период ремиссии**
- ◆ **Длительное дозированное лечение**
- ◆ **Начальные малые дозы постепенно** ↑
- ◆ **Обратная связь**

Много variaб. АГ - низкоспец. иммун. клоны
Хр.введение малых доз неизменного АГ - моноклональный
высокоспец. ответ

Хриинтраназальное или пероральное введение АГ при аутоиммунной патологии

- ◆ Активация $\gamma\delta$ -Т-л. (без процессинга и участия МНС, с к-рой связана предрасп-сть к патологии)
- ◆ Бòльшая длительность воздействия АГ при каждом приеме
- ◆ Нет воспаления (модификаций АГ)



высокоспецифичный супрессорный ответ

- Десенсибилизация по Безредко.
- Chase H., 1946 – скармливание м.свинкам динитрохлорбензола → ↓ кожной аллергии
- Профилактика и лечение СД-1 человека (Institute of Med.Research –Мельбурн, Австралия) - многократные распыления пр-та инсулина в виде аэрозоля на слизистую носа → ↑ $\gamma\delta$ -Т-супрес. л., регенерации β -клеток
- Коэн И. (Израиль) – многократные введения препарата DIA-Per-227 (пептидного фрагмента HSP-60) достоверно тормозят деструкцию β -клеток при недавно дебютировавшем СД-1

Орованной ИММУНОКОРРЕ

СЛИЗИСТО – ДЕСНЕВОЙ ТЕСТ [Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2013] - оценка скорости эмиграции лейкоцитов в полость рта после воздействия раствора пр - та на лигниновом носителе (диск из лигнина диаметром 10 мм и толщиной 3 мм, впитывающий 0,4 мл р-ра пр - та)

ИНДЕКС НАГРУЗКИ [Gerondakis S. et al., 2007] – максимальное значение соотношения адгезивной способности нейтрофилов и лимфоцитов в серии нагрузочных тестов

БАЛАНС провоспалительных и противовосп. цитокинов

Th1 / Th2 соотношение

◆ **БРОНХ. АСТМА атопич.**

- купирующие приступ пр - ты + специф. иммунотерапия (3 года)

◆ **БРОНХ. АСТМА инф.-аллергич.**

- антибакт. терапия + гистамин (2,5 лет)

◆ **ХРОНИЧ. РИНИТ**

- (специфич. аллергия) – купирующие пр - ты + специф. иммунотерапия (3 года)

◆ АТОПИЧ. ДЕРМАТИТ (специф. аллергия)

- антигист. пр-ты + гистамин (2 года)

◆ ХРОНИЧ. БРОНХИТ

– антибакт. терапия + ликопид, бронхомунал

◆ ХР. ПНЕВМОНИЯ

– антибакт. терапия + бронхомунал, ликопид,
стафилококковый анатоксин

◆ ТОНЗИЛИТ

- антибакт. терапия + ликопид, имудон

Спасибо за внимание

