БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

А. Г. Песнякевич

ИММУНОЛОГИЯ

Допущено
Министерством образования Республики Беларусь
в качестве учебного пособия для студентов
учреждений высшего образования по специальностям
«Биология (по направлениям)», «Биохимия», «Микробиология»

МИНСК
БГУ
2018

УДК 577.27(075.8)
ББК 28.074я73
П28

Р е ц е н з е н т ы :
кафедра экологии Гродненского государственного
университета имени Янки Купалы
(заведующий кафедрой кандидат биологических наук, доцент *Г. Г. Юхневич*);
кандидат биологических наук, доцент *Л. Н. Валентович*

Песнякевич, А. Г.

П28 Иммунология : учеб. пособие / А. Г. Песнякевич. – Минск : БГУ, 2018. – 255 с. : ил.

ISBN 978-985-566-628-9.

В учебном пособии дана характеристика иммунной системы человека, на клеточно-молекулярном уровне описаны конститутивные и индуцибельные механизмы защиты организма от проникновения чужеродных антигенов, рассмотрены структура иммуноглобулинов и генетические основы формирования их специфичности. Приводятся сведения о методах биологических исследований, базирующихся на использовании антител, а также об иммунодефицитах и их клинических проявлениях.

Предназначено для студентов учреждений высшего образования по специальностям «Биология (по направлениям)», «Биохимия», «Микробиология».

УДК 577.27(075.8)
ББК 28.074я73

ISBN 978-985-566-628-9

© Песнякевич А. Г., 2018
© БГУ, 2018

ВВЕДЕНИЕ

Курс «Иммунология» направлен прежде всего на получение элементарных сведений о свойственных высшим животным (в том числе и человеку) механизмах защиты их внутренней среды от чужеродных органических молекул.

Необходимость такой защиты вытекает из понимания того, что в основе существования любого организма (начиная от самой простой по строению клетки и заканчивая человеком) лежит упорядоченное физико-химическое взаимодействие составляющих этот объект молекул. Причем порядок последовательных взаимодействий определяется имеющейся в этом организме наследственной информацией и является высокоспецифическим, поскольку складывался в ходе длительной эволюции ныне существующих видов. Исходя из этого, во внутреннюю среду организмов из окружающей среды, условно говоря, допускаются только те молекулы, присутствие которых не сможет нарушить запрограммированный ход метаболических процессов. У одноклеточных организмов, а также у питающихся диффузионно через поверхность тела растений и грибов проблема потенциально возможного проникновения дестабилизирующих метаболизм агентов решается в основном за счет избирательной проницаемости мембран клеток. Но у многоклеточных животных большинство клеток непосредственно с окружающей организм средой не контактируют и эволюционно приспособлены к существованию в относительно постоянных условиях тканевой жидкости, которая и является для них окружающей средой. В этом случае проблема сводится к предотвращению попадания ненужных организму молекул в тканевую жидкость или максимально быстрому их удалению, если проникновение все-таки произошло. Для решения этой проблемы и существует развившаяся в ходе эволюции животных специализированная система органов, клеток и продуцируемых этими клетками молекул, называемая иммунной.

Следует отметить, что дестабилизацию нормального состояния внутренней среды могут вызвать и собственные клетки и молекулы организма, если они изменяются в течение жизни. Учитывая то, что организм млекопитающего, например взрослого человека, состоит из 10^{12}–10^{13} клеток, причем многие клетки постоянно возобновляются, а частота мутаций конкретных генов колеблется в пределах 10^{-6}–10^{-12},

можно предполагать появление довольно значительного количества генетически измененных клеток. Распознавание и элиминация таких клеток, по всей вероятности, также является задачей иммунной системы, что находит косвенное подтверждение в следующих фактах: у больных, которые длительное время получали иммунодепрессирующую терапию (например, при пересадке органов), а также у детей, имеющих врожденные дефекты иммунной системы, частота встречаемости злокачественных (раковых) опухолей в десятки и сотни раз выше, чем у здоровых.

Название этой системы сложилось исторически. В основе лежит первоначальное понимание человечеством болезней (по сути своей являющихся наиболее наглядной демонстрацией дестабилизации нормального состояния организма) как налагаемой на человека силами природы (в понимании того времени – Богом) дани. С этой точки зрения те, кто в течение жизни не заболевал какой-либо болезнью или, выздоровев, оказывался невосприимчивым к вторичному заражению, считались от такой дани освобожденными или обладающими иммунитетом, поскольку в латинском языке *immunitas* означает освобождение от уплаты налагаемых государством налогов и воинской обязанности. С развитием наук и постепенным отказом от идеалистических представлений о природе становилось понятно, что не следует относиться к недугам как к ниспосланному свыше неизбежному злу и что человек сам способен защитить себя от инфекционных заболеваний. Однако это слово не только не исчезло из научного лексикона, но и легло в основу названия научного направления, призванного объяснить, как именно организм защищается от таких болезней.

Возникновение иммунологии как науки связано с изучением недугов человека не случайно. Во второй половине XIX в., благодаря работам Луи Пастера, Роберта Коха и ряда других исследователей, удалось доказать, что причиной заразных болезней являются проникающие извне микроорганизмы. Было также установлено, что в основе развития симптомов конкретного заболевания лежат специфические различия бактерий, а проявления защиты человеческого организма от воздействия этих разных возбудителей в целом оказываются схожими. Следовательно, помимо изучения собственно болезнетворных микроорганизмов, существенным становилось выяснение тех особенностей организма человека, которые определяют защиту от болезнетворного начала. В современном понимании инфицирование организма каким-либо микроорганизмом – это фактически попадание во внутреннюю среду несвойственных ей изначально (т. е. чужеродных) молекул, и борьба макроорганизма с болезнетворным микроорганизмом, по сути, является борьбой именно с этими молекулами. Исходя из сказанного, изучение причин возникновения иммунитета к инфекционным заболеваниям являлось практически изучением той системы, которая призвана защищать внутреннюю среду от вторжения всего чужеродного, в том числе и не связанного непосредственно с развитием болезней. Это в целом и подтвердилось дальнейшим ходом развития иммунологии как науки.

КРАТКИЙ ИСТОРИЧЕСКИЙ ОЧЕРК РАЗВИТИЯ ИММУНОЛОГИИ

Предпосылками развития иммунологии большинство исследователей считают накопленный человечеством опыт наблюдений за развитием инфекционных заболеваний. С незапамятных времен считается, что во время эпидемий не заболевали те, кто уже перенес эту болезнь. Более того, имеются исторические сведения, что в Древнем Китае (около 590 г. до н. э.), а также в античные времена в Индии применялось заражение людей натуральной оспой с целью сделать их невосприимчивыми в период эпидемий. Для этого корочки из оспенных пустул на теле выздоравливающих вдыхали через нос или наносили материал из оспенных поражений на кусочки хлопковой ткани, выдерживали в течение года и затем прикладывали к специально сделанным царапинам на коже. В Европе практику такой защиты от оспы относят к времени правления короля Англии Георга I, когда жена британского посла в Константинополе леди Мэри Уортли Монтегю узнала на Востоке о методе введения заразного материала из оспин болеющих в вену реципиентов с помощью большой иглы. Процедура была небезопасной, поскольку часто приводила не только к заболеванию оспой, но и к развитию других тяжелых болезней, в частности сифилиса и лепры. Тем не менее король Георг I воспринял это восточное новшество благосклонно и даже дал указание подвергнуть такому воздействию двух своих внуков, что способствовало распространению этого приема защиты от оспы на Британских островах. Основной причиной того, что люди соглашались на такую рискованную профилактику, было следующее: во времена Георга I из 100 человек 60 заболевали оспой, и половина из них умирали от болезни.

В 1758 г. врач из Эдинбурга Френсис Хоум (Francis Home) применил такой же принцип для защиты от кори: с помощью ватных тампонов он переносил материал с пораженных коревой сыпью участков кожи больных на царапины на теле прививаемых, и 7 из 15 подвергнутых такому воздействию пациентов переболели корью в наименее выраженной форме, получив иммунитет к этому заболеванию на время дальнейшей жизни.

Следующим шагом в этом направлении стали эксперименты Эдварда Дженнера (Edward Jenner, 1749–1823). Основой для них стали наблюдения фермера из окрестностей Дорчестера по имени Бенджамин Джестай (Benjamin Jesty), согласно которым доярки гораздо реже

болели натуральной оспой, чем другие люди. Дженнер предположил, что причиной мог быть ежедневный контакт рук доярок с пораженной коровьей оспой кожей вымени. Для проверки правильности своего предположения Дженнер в 1796–1798 гг. провел направленное заражение нескольких своих клиентов материалом из оспенных пустул на вымени коров и убедился, что эти люди действительно приобрели иммунитет против натуральной оспы. Результаты своих исследований по вакцинации (название было дано от латинского наименования коров – *vacca*) он изложил в статье «Inquiry of 1798», которую представил в Королевское научное общество (The Royal Society). Поначалу методика Дженнера была подвергнута критике, но затем в 1802 г. он получил парламентские субсидии для развития оспопрививания и организовал специальный институт в Лондоне, после чего оно стало распространяться по разным странам. Так, врач из Гарварда Бенджамин Вотерхауз (Benjamin Waterhouse) начал внедрять оспопрививание по методике Дженнера в Северной Америке, французский император Наполеон приказал вакцинировать личный состав своей армии, а первый привитый в России крестьянский мальчик получил в честь этого знаменательного события фамилию Вакцинов.

Однако, несмотря на практическое использование вакцинации, понимание причин возникновения у прививаемых иммунитета стало возможным только после открытия Антони ван Левенгуком (Leeuwenhoek, 1632–1723) мира микроорганизмов и создания Луи Пастером (Pasteur, 1822–1895) зародышевой теории инфекционных болезней, согласно которой причиной заболевания является проникновение в организм болезнетворных бактерий. Разработанный Робертом Кохом (Koch, 1843–1910) метод выделения чистых культур бактерий позволил не только однозначно доказать причастность микроорганизмов к развитию болезней, но и установить, что именно контакт макроорганизма с возбудителем делает его иммунным. В 1881 г. Пастером и его сотрудниками было установлено, что заражение животных длительно выращиваемыми на питательных средах возбудителями куриной холеры не приводит к развитию симптомов заболевания, но делает этих животных устойчивыми к нему. Подобного рода ослабление вирулентности болезнетворных микроорганизмов получило название **аттенюации** и было применено для направленного, научно обоснованного создания вакцинных препаратов.

Одновременно становилось очевидным, что в результате контакта с возбудителем в макроорганизме появляются какие-то отсутствующие до этого защитные факторы. Направленный поиск их стал основной задачей, и в 1890 г. в институте Роберта Коха в Берлине Эмиль фон Беринг (Behring, 1854–1917) и Шибасабуро Китасато (Kitasato, 1852–1931) продемонстрировали присутствие в крови иммунизируемых столбнячными или дифтерийными бактериями животных специфических белков, названных ими антитоксинами. Введение сывороток крови таких животных интактным (никогда не контактировавшим с возбудителями столбняка или дифтерии) организмам приводило к появлению у последних выраженной устойчивости к данным заболеваниям. Это было первым научным, экспериментально полученным доказательством выработки макроорганизмом специфических веществ в ответ на присутствие болезнетворных микроорганизмов, поэтому некоторые авторы предлагают считать 1890 год годом основания иммунологии как науки о защитных силах организма.

В дальнейшем детальным изучением защитных веществ плазмы крови начал активно заниматься немецкий ученый Пауль Эрлих (Ehrlich, 1854–1915). Подробно исследуя лечебные свойства сывороток иммунных животных, он показал, что антитела (так стали называть открытые Берингом и Китасато антитоксины) относятся к глобулиновой фракции белков плазмы крови; они способны передаваться через плаценту из организма матери в организм развивающегося плода; выработка антител происходит не только при контакте с болезнетворными микроорганизмами или их токсинами, но и при введении в кровь других органических веществ. Из исследований Эрлиха вытекало следующее: основу защиты организма от чужеродных агентов определяют растворенные в плазме крови вещества, и подобного рода воззрения к концу XIX в. получили название гуморальной теории иммунитета.

Однако не все занимающиеся проблемой инфекционных заболеваний деятели науки придерживались мнения, что защита макроорганизма от инфекции определяется только гуморальными факторами. Начатые в 1882 г. исследования русского ученого Ильи Ильича Мечникова (1845–1916) указывали на способность лейкоцитов крови млекопитающих активно поглощать и уничтожать болезнетворные микроорганизмы в ходе процесса, названного фагоцитозом. Возглавив по предложению Луи Пастера специально созданную для изучения фагоцитоза лабораторию в Пастеровском институте в Париже, Мечников к началу XX в. стал основоположником фагоцитарной теории, или теории клеточного иммунитета.

Дальнейшие эксперименты, проводимые приверженцами этих теорий, привели к слиянию формировавшихся направлений, что и нашло отражение в присуждении Нобелевской премии по физиологии и медицине 1908 года совместно Илье Мечникову и Паулю Эрлиху за вклад в развитие теории иммунитета. Фактически именно эта награда стала признанием иммунологии как особой отрасли знаний, поскольку Нобелевская премия 1901 года, лауреатом которой стал Эмиль фон Беринг, все-таки была по своей формулировке чисто медицинской: «...за работы по серотерапии, и прежде всего за ее использование в борьбе с дифтерией».

С этих пор Нобелевские премии, традиционно считающиеся показателем значимости для человечества той или иной области науки, стали своеобразным отражением постоянного прогресса иммунологии (табл. 1).

Таблица 1

Нобелевские премии за исследования в области иммунологии

Год присуждения	Фамилии лауреатов	Премия присуждена за
1901	Э. Беринг (E. Behring)	открытие антитоксических антител и разработку метода серотерапии
1905	Р. Кох (R. Koch)	исследования в области туберкулеза
1908	И. И. Мечников, П. Эрлих (P. Ehrlich)	вклад в развитие теории иммунитета
1913	Ш. Рише (C. Richet)	открытие анафилаксии

Окончание табл. 1

Год присуждения	Фамилии лауреатов	Премия присуждена за
1919	Ж. Борде (J. Bordet)	изучение системы комплемента
1930	К. Ландштейнер (K. Landsteiner)	открытие групп крови
1960	Ф. М. Бёрнет (F. M. Burnet), П. Б. Медавар (P. B. Medawar)	изучение приобретенной иммунологической толерантности
1972	Р. Портер (R. Porter), Д. Эдельман (G. Edelman)	изучение структуры иммуноглобулинов
1980	Дж. Д. Снелл (G. D. Snell), Ж. Доссе (J. Dausset), Б. Бенасерраф (B.Benacerraf)	исследование генетических детерминант главного комплекса гистосовместимости
1984	Н. Ерне (N. Jerne), Ц. Мильштейн (C. Milstein), Г. Кёллер (G. Köhler)	разработку учения об идиотипической сети (Н. Ерне); создание гибридомной технологии для получения моноклональных антител (Ц. Мильштейн и Г. Кёллер)
1987	С. Тонегава (S. Tonegawa)	исследование соматической рекомбинации генов иммуноглобулинов как основы формирования разнообразия антигенраспознающих рецепторов лимфоцитов
1997	Р. Цинкернагель (R. Zinkernagel), П. Доэрти (P. Doherty)	открытие роли молекул главного комплекса гистосовместимости в презентации антигена
2011	Б. Бетлер (B. Beutler), Ж. Хоффман (J. Hoffmann), Р. Штейнман (R. Steinman)	открытие путей активации врожденного иммунитета (Б. Бетлер и Ж. Хоффман), открытие дендритных клеток и их роли в адаптивном иммунитете (Р. Штейнман)

Параллельно с основной на тот период ветвью иммунологии, непосредственно связанной с инфекционными болезнями, в конце XIX в. были заложены основы двух новых направлений, условно относящихся к так называемой неинфекционной иммунологии.

Французский исследователь Шарль Рише (Richet, 1850–1935), изучая влияние токсических веществ морских беспозвоночных на собак, установил, что организм последних способен отвечать на повторное введение небольших доз токсина чрезвычайно бурной, не наблюдавшейся при первоначальном введении препарата реакцией. Он назвал это явление анафилаксией («обратной профилактикой») и посвятил его изучению последующие десять лет. За это время выяснилось, что случаи нежелательных реакций организмов людей и животных на профилактическое и терапевтическое введение сывороток, а также аллергические реакции на различные вещества фактически являются проявлениями анафилаксии. В опу-

бликованной в 1912 г. монографии «Анафилаксия» Рише обобщил результаты своих исследований, из которых вытекало, что иммунная система имеет отношение не только к защите от инфекционных болезней. Эта работа была удостоена Нобелевской премии 1913 года.

Еще одна ветвь иммунологии зародилась в ходе изучений, имевших непосредственное отношение к защите от инфекционных заболеваний. Изучая в конце XIX в. в лаборатории Мечникова в Пастеровском институте механизмы лизиса бактерий под влиянием белков плазмы крови, Жюль Борде (Bordet, 1870–1961) не только открыл (совместно с Рихардом Пфейффером) систему комплемента, но и обнаружил, что иммунная система способна реагировать на чужие клетки крови так же, как и на болезнетворные микроорганизмы. И хотя сам Борде получил Нобелевскую премию 1919 года за исследования системы комплемента (т. е. в рамках инфекционной иммунологии как научного направления), в сущности, продолжая его исследования по иммунному отторжению эритроцитов, Карл Ландштейнер (Landsteiner, 1868–1943) открыл группы крови человека, за что в 1930 г. также был удостоен Нобелевской премии.

Помимо огромного медицинского значения, заключавшегося в разработке безопасной системы переливания крови, эта ветвь иммунологии дала доказательства существования различий конкретных индивидуумов на клеточном уровне и реагирования на эти различия иммунной системы, что во многом определило развитие иммунологии в XX в. Фактически проблема отторжения пересаживаемых тканей и органов становилась проблемой иммунологической, и занимавшийся изначально пересадками кожи Питер Брайн Медавар (Medawar, 1915–1987) получил широкую известность именно как иммунолог. Работы Медавара и сотрудников стали экспериментальным подтверждением опубликованной в 1949 г. общей теории иммунитета Фрэнка Макфарлейна Бёрнета (Burnet, 1899–1985), согласно которой иммунная система формируется в процессе эмбрионального развития и именно в этот период организм приобретает иммунную нечувствительность (толерантность) к собственным молекулам и клеткам. За изучение приобретенной иммунологической толерантности эти исследователи получили Нобелевскую премию 1960 года.

Это направление получило развитие в работах Джорджа Девиса Снелла (Snell, 1903–1996). Под его руководством было установлено, что у мышей имеется 14 систем генов, определяющих реакции отторжения при пересадках тканей. Одна из таких групп генов, названная H2-системой (от англ. hystocompatibility – тканевая совместимость), оказалась причастной и к развитию других иммунных реакций. Жан Доссе (Dausset, 1916–2006), исследуя антигенные свойства лейкоцитов, обнаружил существование подобных систем генов у человека и назвал их HLA (от англ. **H**uman **L**eucocytes **A**ntigens – человеческие лейкоцитарные антигены). Проведенные в различных лабораториях мира эксперименты показали аналогичность H2-системы мышей и HLA-системы человека, в результате чего утвердилось представление о существовании у всех высших животных подобных генетических систем, получивших общее название «главный комплекс гистосовместимости», или сокращенно MHC (от англ. **M**ajor **H**ystocompatibility **C**omplex). Изучая роль входящих в комплекс генов, Барух Бенасерраф (Benacerraf, 1920–2011) и его коллеги

сумели установить причастность продуктов этих генов – специфических поверхностных молекул клеток высших организмов – не только к отторжению пересаженных тканей, но и к развитию любых иммунных реакций, в том числе и приводящих к продукции антител. Так утвердилось новое направление в иммунологии, получившее название «иммуногенетика», а его основатели Джордж Снелл, Жан Доссе и Барух Бенасерраф стали лауреатами Нобелевской премии 1980 года.

Тогда же, в 60-х гг. XX в., в основном благодаря работам Родни Портера (Porter, 1917–1985) и Джеральда Эдельмана (Edelman, 1929–2014), удалось расшифровать молекулярную структуру антител и их антигенсвязывающих центров, за что эти исследователи получили Нобелевскую премию 1972 года.

Подтверждение на молекулярном уровне высочайшей специфичности связывания антител с вызывающими их продукцию антигенами, с одной стороны, стало основой для разработки новых методов очистки и идентификации органических молекул, а с другой – стимулировало интерес к выяснению причин столь огромного разнообразия антител и распознающих антигены клеточных рецепторов. Две Нобелевские премии 1980-х годов как раз и отражают эти два направления в развитии иммунологии в середине второй половины XX в.

Обладателями Нобелевской премии 1984 г. стали Нильс Ерне (Jerne, 1911–1994), Георг Кёллер (Köhler, 1946–1995) и Цезарь Мильштейн (Milstein, 1927–2002). Удостоенным столь высокой награды достижением этих ученых было создание метода, позволяющего получать суспензии абсолютно одинаковых по специфичности, так называемых моноклональных, антител, применение которых в биологических и медицинских исследованиях привело к существенному прогрессу на молекулярном и клеточном уровнях. В то же время прогресс молекулярной биологии позволил Сусуму Тонегава (Tonegawa, 1936) показать, как генетические перестройки в хромосомах лейкоцитов обеспечивают фантастически богатое многообразие антител и антигенраспознающих рецепторов, что также было удостоено в 1987 г. Нобелевской премии.

Таким образом, формировавшаяся первоначально как чисто прикладная отрасль медицины иммунология за 100 лет превратилась в одну из ведущих современных биологических наук, достижения которой не только позволили найти эффективные способы борьбы с бактериальными и вирусными заболеваниями, но и в какой-то мере объяснить, чем и как определяется индивидуальность на клеточном уровне и как реализуется взаимодействие клеток млекопитающих между собой. Последняя Нобелевская премия XX в. за исследования в области иммунологии является своеобразным отражением слияния инфекционной и неинфекционной иммунологии, поскольку присуждена за работы, описывающие роль конкретных молекул во взаимодействиях клеток иммунной системы в период развития иммунных ответов на антиген. Обладателями премии стали Питер Доэрти (Doherty, 1940) и Рольф Цинкернагель (Zinkernagel, 1944), которые доказали участие белков главного комплекса гистосовместимости в представлении чужеродных антигенов иммунокомпетентным клеткам.

Произошедший во второй половине XX в. переход на молекулярный уровень несколько изменил задачи иммунологии как науки. Несмотря на то что предметом изучения по-прежнему остается иммунная система в целом и ее роль в защите

организма от чужеродных объектов, основные усилия иммунологов начала XXI в. направлены на выяснение механизмов регуляции деятельности иммунокомпетентных клеток и конкретной роли образуемых этими клетками молекул в ходе реализации такой защиты.

Отражением успешности и перспективности такого подхода стала еще одна Нобелевская премия по физиологии и медицине. Лауреаты 2011 года Брюс Бетлер (Beutler, 1947) и Жюль Хоффман (Hoffmann, 1941) получили эту награду за описание структуры и функционирования рецепторов миелоидных клеток иммунной системы, обеспечивающих распознавание так называемых образов патогенности. Представление о том, что отвечающие в целом за казавшийся ранее неспецифическим врожденный (видовой) иммунитет фагоцитирующие клетки все-таки избирательно реагируют на проникающие во внутреннюю среду чужеродные молекулы, начало формироваться в 80-х гг. XX в., но получило достойное экспериментальное подтверждение только в начале нынешнего столетия. Тогда же более глубоким молекулярно-биологическим содержанием наполнялось и понимание механизмов развития специфического (адаптивного, приобретенного, индивидуального) иммунитета. В частности, удалось существенно пополнить сведения о молекулах, участвующих в процессах активации клетками врожденного иммунитета лимфоцитов, обуславливающих специфический иммунный ответ. Ральф Штейнман (Steinman, 1943–2011) стал третьим лауреатом Нобелевской премии 2011 года за описание особенностей запускающих иммунный ответ дендритных клеток и роли отдельных молекул во взаимодействии этих лейкоцитов с другими иммунокомпетентными клетками.

Существенно углубились к настоящему времени и представления о механизмах, контролирующих развитие клеток иммунной системы и регуляцию их размножения, супрессирования и активирования в ходе жизнедеятельности организма. Именно это направление в изучении иммунной системы на молекулярном уровне считается одним из самых перспективных, поскольку в его рамках предполагается найти основу для решения ряда практических задач, стоящих перед так называемой прикладной иммунологией. Именно она, опираясь на исследования теоретического плана, получает дополнительные возможности для разработки вакцинных препаратов нового поколения, поиска путей корректирования работы иммунной системы в ходе патологических процессов инфекционной и неинфекционной природы, усовершенствования уже существующих иммунологических методов исследования, применяемых не только в медицинской практике, но и во всех областях современной биологии.

Даже из приведенного выше краткого изложения истории развития иммунологии как науки можно понять, что арсенал используемых иммунологами методов необычайно широк. Исходя из особенностей строения и функционирования иммунной системы, для ее изучения приходится привлекать весь основной методический аппарат анатомии, физиологии, гистологии и цитологии высших животных, биохимические методы очистки и определения различных свойств органических молекул, а на современном этапе и все методы молекулярной биологии и генетической инженерии, включая клонирование и экспрессирование отдельных генов, секвенирование белков и нуклеиновых кислот,

направленное получение мутаций путем замены генов и получение клеточных линий и трансгенных животных с конкретными генетическими нарушениями. Естественно, что все методы в той или иной степени адаптируются и модифицируются применительно к изучаемым объектам, что и приводит к появлению специфических, применяющихся только в исследованиях иммунной системы методов. В то же время разрабатываемые изначально в рамках иммунологических исследований методы, в которых используются антитела, сегодня приняты на вооружение большинством биологических наук, поскольку их высочайшая разрешающая способность и эффективность доказаны всем ходом развития биологии в конце XX – начале XXI в.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Наряду с другими системами организма иммунная система функционирует в неразрывной связи с ними и в какой-то мере может рассматриваться как их часть. Так, некоторые из составляющих ее органов и клеток фактически являются компонентами кровеносной системы, но с точки зрения выполняемой ими функции – защиты внутренней среды от проникновения нарушающих гомеостаз органических молекул – эти органы и клетки резонно рассматривать как отдельную систему.

Органы иммунной системы принято делить на **центральные (или первичные)** и **периферические (или вторичные)**, исходя не столько из их расположения в организме, сколько из степени их значимости в поддержании нормального состояния этой системы. **Красный костный мозг и тимус (вилочковую железу)** относят к первичным органам иммунной системы вследствие того, что именно в них возникают и проходят основные этапы развития составляющие иммунную систему клетки. Те же органы, в которых эти клетки осуществляют лишь некоторые этапы своего развития и временно локализуются в ходе присущей этим клеткам циркуляции по организму, считают вторичными. Таковыми в иммунной системе являются **селезенка**, **лимфатические узлы** и не отделенные от окружающих тканей соединительно-тканными оболочками лимфоидные скопления: **миндалины и аденоиды** носоглотки, а также специфические лимфоидные образования в стенках кишечника, называемые **пейеровыми бляшками**.

В отличие от ряда других систем организма (например, опорно-двигательной или пищеварительной) иммунная система, благодаря подвижности составляющих ее клеток, распространена по всему телу. Относимые к ней клетки, изначально являющиеся клетками крови, способны проникать через стенки капилляров и перемещаться между клетками других тканей, что и делает внутреннюю среду практически в любой точке организма доступной для воздействия иммунной системы. Конкретно **клетками иммунной системы** принято считать все лейкоциты крови, условно разделяемые на пять групп: **моноциты**, **лимфоциты**, **нейтрофилы**, **эозинофилы**, **базофилы**. Первые две группы относятся к агранулоцитам (они не имеют выявляемых стандартными методами окрашивания гранул в цитоплазме), три последние – к гра-

нулоцитам. Особой разновидностью гранулоцитов считаются присутствующие не в кровотоке, а среди клеток других тканей **тучные клетки**, которые по своим характеристикам и некоторым функциям близки к базофилам.

Моноциты крови способны проходить через стенки капилляров и превращаться в **тканевые макрофаги**. Во вторичных лимфоидных органах из крови в ткани способны проходить и лимфоциты, часть из которых вновь может возвращаться в кровоток. Лимфоциты принято разделять, исходя из мест их первичного формирования, на **Т-лимфоциты** (проходят основные этапы созревания в тимусе) и **В-лимфоциты** (у млекопитающих в основном созревают в красном костном мозге).

Третий компонент иммунной системы – **секретируемые ее клетками молекулы**, поскольку часть из них функционирует в ходе реализации защитных реакций как самостоятельно действующие агенты. Характерным примером таких молекул являются выделяемые В-лимфоцитами **иммуноглобулины** (называемые также **антителами**), способные специфически взаимодействовать с конкретными чужеродными антигенами без какого-либо влияния других составляющих иммунной системы.

Помимо иммуноглобулинов молекулами иммунной системы принято считать и вещества, регулирующие деятельность как иммунокомпетентных клеток, так и некоторых других клеток организма. В настоящее время, вероятно, из-за недостаточной изученности всего многообразия и функций этих молекул, иммунологам еще не удалось найти некий общий термин, обозначающий все медиаторы межклеточных взаимодействий, но наиболее часто используемыми названиями для них являются: **цитокины**, **лимфокины и интерлейкины**. Следует отметить, что, исходя из контекста обсуждаемого вопроса, в иммунологической и медицинской литературе одни и те же молекулы могут фигурировать под любым из этих названий, и это необходимо учитывать при чтении.

К молекулам иммунной системы, действующим как защитные вещества самостоятельно, следует отнести и присутствующие во внутренней среде организма постоянно или появляющиеся при соответствующей индукции гуморальные факторы, среди которых наиболее известны **белки системы комплемента**, **α- и β-интерфероны**, **белки острой фазы воспаления**.

Строение органов иммунной системы, характерные особенности входящих в нее отдельных групп клеток и молекул, а также выполняемые этими компонентами иммунной системы функции будут изложены в данном пособии по ходу рассмотрения основных факторов защиты внутренней среды организма от чужеродных агентов.

ФАКТОРЫ ЗАЩИТЫ ВНУТРЕННЕЙ СРЕДЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ОТ ЧУЖЕРОДНЫХ АГЕНТОВ

1

Как уже упоминалось, главным предназначением иммунной системы является защита от чего-либо чужеродного, способного нарушить постоянство внутренней среды.

Несомненно, что длительная эволюция, приведшая к возникновению столь высокоорганизованных форм жизни, как млекопитающие, проходила при постоянном воздействии на организмы множества факторов, потенциально способных вызвать нарушение гомеостаза. Исходя из этого, собственно строение организма животных и присущие им физиологические функции в какой-то мере обеспечивают и защиту от них, что позволяет разделить все **защитные механизмы** на **конститутивные** и **индуцибельные**. Следует отметить, что в современной учебной литературе (вероятно, как следствие переводов с английского языка) синонимами термина «конститутивные» в этом контексте могут употребляться термины «природные» (от англ. natural) и «врожденные» (от англ. innate). Аналогично для обозначения индуцибельных защитных механизмов могут применяться термины «приобретенные» (от англ. acquired) и «приспособительные» (от англ. adaptive).

Отличительными чертами конститутивных (врожденных) защитных механизмов являются их постоянное присутствие в организме и отсутствие выраженной специфичности, т. е. сходность их проявления при действии различных факторов. Такого рода механизмы способны одновременно защищать организм от целого ряда факторов практически сразу после начала их воздействия. В то же время **индуцибельные защитные реакции** отсутствуют в организме изначально, 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.

Следует подчеркнуть, что в целом подобного рода разделение защитных механизмов достаточно условно, поскольку при воздействии любого из дестабилизирующих факторов защищающийся организм использует и те и другие средства, и обычно механизмы, относимые к конститутивным, стимулируют развитие индуцибельных, а эффективность конститутивных изменяется в зависимости от присутствия

и степени выражения индуцибельных. Тем не менее можно считать, что конститутивные защитные механизмы – первый барьер или эшелон защиты от биологической агрессии, а индуцибельные – второй, поскольку они, как правило, включаются на полную мощность только тогда, когда первый барьер в той или иной степени преодолевается.

К конститутивным защитным барьерам традиционно относят **непроницаемость покровов, лизоцим, гидролитические ферменты и соляную кислоту желудочно-кишечного тракта, интерфероны, воспаление, фагоцитоз, действие естественных киллеров (NK-клеток), систему комплемента и другие присутствующие в крови гуморальные факторы конститутивной защиты**.

Индуцибельные защитные механизмы – это все формы иммунного ответа, основанные на специфическом распознавании чужеродных антигенов. Чаще всего для их реализации требуется гораздо больше времени, чем для проявления конститутивных факторов защиты, а также обязательным является участие иммунокомпетентных клеток лимфоцитарной группы. Основными и наиболее изученными среди них выступают: **ответ на тимусзависимые антигены, приводящий к появлению специфических антител и соответствующих клеток иммунологической памяти**; **действие Т-киллеров**, **ограниченных по молекулам главного комплекса гистосовместимости**; **гиперчувствительность замедленного типа**; **гиперчувствительность немедленного типа.**

1.1. КОНСТИТУТИВНЫЕ ФАКТОРЫ ЗАЩИТЫ

1.1.1. Непроницаемость покровов

Общая поверхность организма взрослого человека, соприкасающаяся с окружающей средой, имеет площадь около 400 м^2. Из нее кожные покровы составляют всего лишь около 2 м^2, но они подвержены, как правило, наиболее постоянному и наиболее жесткому воздействию внешних факторов, в том числе и биологического происхождения. Строение кожи как органа обеспечивает создание существенного механического барьера на пути агрессивных биологических факторов среды. Внешнюю поверхность кожи образует **многослойный эпителий (эпидермис)**, клетки которого способны синтезировать в значительных количествах роговое вещество. Это вещество, состоящее преимущественно из белка кератина, придает поверхностному слою эпителия относительную устойчивость к механическим воздействиям и к тому же крайне медленно разлагается большинством видов микроорганизмов. Отмирающие в результате накопления рогового вещества поверхностные слои постоянно слущиваются, обеспечивая тем самым частичное механическое удаление попавших на поверхность эпидермиса микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности. В то же время в нижних слоях эпидермиса происходит постоянное образование новых клеток, замещающих отмирающие, поэтому защитный эффект эпидермального слоя кожи не утрачивается. Более того, чем сильнее воздействие на поверхностные слои эпидермиса, тем интенсивнее происходит образование новых слоев, что и определяет неравномерность тол-

щины эпидермального слоя в различных участках кожи. Несмотря на то что через собственно эпидермис не проходят капилляры кровеносной системы, нижние его слои получают достаточное количество необходимых для постоянного деления питательных веществ из прилегающего слоя собственно кожи (дермы). Это обеспечивается особенностями строения верхнего слоя дермы и нижнего слоя эпидермиса, которое создает максимальную поверхность соприкосновения за счет взаимопроникновения этих слоев друг в друга.

Собственно кожа (дерма) представлена плотной волокнистой соединительной тканью, отличительной чертой которой является наличие большого количества плотного межклеточного вещества. Основные компоненты этого вещества – белки коллаген и эластин, образующие волокна, и заполняющий пространство между этими волокнами полисахарид гиалуроновая кислота. Такое сочетание создает прочный плотный и в то же время растяжимый механический барьер на пути стремящихся проникнуть внутрь микроорганизмов и молекул. Преодолеть этот барьер способны только микроорганизмы, продуцирующие коллагеназы и гиалорунидазы, причем для их эффективного воздействия необходимо, чтобы эти микроорганизмы могли противостоять другим защитным механизмам, определяемым кожей. Имеющиеся в коже **потовые железы** помимо выполнения своей основной терморегулирующей функции играют существенную роль и в формировании защитных свойств кожи. Присутствие в составе потовой жидкости небольших количеств низкомолекулярных органических соединений (молочной кислоты, некоторых аминокислот, мочевой кислоты и мочевины) и ее кислотность (pH 5,5) являются неблагоприятными для бактерий и грибов факторами. В то же время в составе секретов **сальных желез** кожи также присутствуют неблагоприятно действующие на микроорганизмы вещества – триглицериды, другие многоатомные спирты, свободные жирные кислоты. Совместное действие этих секретов в целом придает поверхности кожи бактерицидные свойства, что экспериментально подтверждается гибелью помещенных на поверхность чистой кожи сапротрофных бактерий в течение часа после нанесения. Следует подчеркнуть значение секрета сальных желез как водоотталкивающего средства, поскольку попадающие с водой на поверхность кожи микроорганизмы (например, при купании в естественных водоемах) удаляются при стекании воды с несмачиваемой кожи. В то же время (и это имеет более важное значение в защите) этот же жировой секрет предохраняет кожу от иссушения и последующего растрескивания, которое (как это можно наблюдать у пациентов с гипофункцией сальных желез или при полном их отсутствии) приводит к резкому снижению уровня ее защитных свойств.

Слизистые оболочки обеспечивают защиту организма несколько иным путем. Из-за почти полного отсутствия в составе образующих слизистые оболочки эпителиальных тканей межклеточного вещества механическая прочность слизистых оболочек крайне невелика, и клетки слизистых довольно легко повреждаются при воздействии внешних факторов. Однако их высокая регенеративная способность позволяет компенсировать возникающие повреждения, а слой выделяемой этими клетками слизи препятствует непосредственному воздействию микроорганизмов на клетки. Постоянное удаление выделяемых секретов в результате пассивного

стекания или активности имеющихся в некоторых слизистых оболочках ресничных клеток способствует и удалению попавших на поверхность частиц.

Поскольку процесс такого удаления, как правило, растянут во времени, большинство секретов слизистых имеют в своем составе **бактерицидные вещества**. Наиболее ярко это выражено в слизистых оболочках дыхательных путей и глаз, где в составе выделяемой слизи присутствует значительное количество **лизоцима** – ацетилмурамидазы, субстратом для которой является один из основных компонентов клеточной стенки бактерий – пептидогликан муреин. Кроме того, имеющиеся в слизи носа полисахаридные субстанции обладают некоторым противовирусным действием. Наглядным примером значения выделяемой в дыхательном тракте слизи в борьбе с микроорганизмами служит знакомое каждому увеличение ее количества при многих респираторных заболеваниях.

В верхнем отделе пищеварительного тракта роль защитного секрета играет образуемая слизистой оболочкой и специализированными железами слюна, которая помимо пищеварительных ферментов содержит лизоцим. Вырабатываемые клетками слизистой оболочки желудка **пищеварительные ферменты** и **соляная кислота** также обладают выраженным микробоцидным действием, а в просвете тонкого кишечника к защитному эффекту выделяемых здесь ферментов присоединяется **бактерицидный эффект компонентов желчи**, основанный преимущественно на том, что эта сложная по составу смесь различных органических молекул является сильнодействующим поверхностно-активным веществом (ПАВ).

В последние годы интенсивно накапливаются сведения о специализированных микробоцидных веществах, представляющих собой короткие (35–40 аминокислотных остатков) пептиды. Наиболее изученными антимикробными пептидами млекопитающих (включая человека) являются **дефензины** (от англ. defense – защита). Они обладают общими структурными свойствами: включают много остатков аргинина и не менее шести остатков цистеина, что обуславливает формирование трех внутримолекулярных дисульфидных мостиков. Формирующаяся при этом третичная структура придает молекуле амфипатические свойства, что позволяет дефензинам легко присоединяться к биологическим мембранам и, внедряясь в них, образовывать поры, а при массированном воздействии вызывать и полную деградацию клеточной мембраны. Основное место образования дефензинов – фаголизосомы нейтрофилов, однако и другие клетки, в частности эпителиальные клетки слизистых оболочек, способны синтезировать и экскретировать эти молекулы, что придает слизи дополнительную микробоцидную активность. В слизистой оболочке нижних отделов тонкого кишечника и в толстой кишке человека имеются специализированные для образования дефензинов клетки, получившие название **клетки Панета** (Paneth cells) в честь своего первооткрывателя – австрийского врача Джозефа Панета (Paneth, 1857–1890). Эти клетки, описанные еще в XIX в., в настоящее время рассматриваются как элементы защитной системы пищеварительного тракта, поскольку показана их способность секретировать лизоцим и ряд дефензинов. По структуре дефензины делят на α-, β- и θ-дефензины, но клетки человека образуют только дефензины первых двух классов. Пока для человека описано 10 дефензинов (табл. 2), которые различаются по месту их образования, цидным свойствам и характеру секреции.

Таблица 2

Дефензины человека

Класс	Название	Клетки-продуценты	Присутствие в секретах слизистых оболочек и желез	Характер синтеза
α	HNP1	Преимущественно нейтрофилы, в меньших количествах моноциты, макрофаги, NK-клетки, B-лимфоциты и некоторые T-лимфоциты	Кишечника, плаценты, шейки матки	Конститутивный
α	HNP2			
α	HNP3			
α	HNP4	Нейтрофилы	Неизвестно	Конститутивный
α	HD5	Преимущественно клетки Панета, в меньших количествах клетки эпителия влагалища	Слюнных желез, эпителия пищеварительного тракта, эпителия глаз, эпителия женского полового тракта, млечных желез	Конститутивный, но индуцируется возбудителями инфекций, передающихся половым путем
α	HD6	Клетки Панета	Слюнных желез, эпителия пищеварительного тракта, эпителия глаз, млечных желез	
β	HBD1	Преимущественно эпителиальные клетки, в меньших количествах моноциты, макрофаги, дендритные клетки и кератиноциты	Пищеварительного тракта, дыхательного тракта, мочеполового тракта, глаз, слюнных желез, почек, обнаруживаются в плазме крови	Конститутивный, но индуцируется при инфекционных заболеваниях
β	HBD2			
β	HBD3			
β	HBD4	Эпителиальные клетки	Эпителия антрального отдела желудка и яичек	

Примечание. HNP – **h**uman **n**eutrophil **p**eptide; HBD – **h**uman **b**eta-**d**efensin; HD – **h**uman **d**efensin.

Помимо дефензинов у человека обнаружены еще два семейства антимикробных эндогенных пептидов: **кателицидины** и **гистатины**. Примером кателицидинов человека является катионный антимикробный белок hCAP18, причем установлено, что при секреции его клетками эпителия и лейкоцитами происходит протеолитическое расщепление молекулы, в результате чего от белка отделяется С-концевая часть молекулы, называемая LL37. Именно она и обладает цидным действием по отношению к бактериям, грибам и имеющим мембранную оболочку вирусам. Пептид LL37 обнаруживается в секретах ряда слизистых оболочек, а также в семенной жидкости человека и на поверхности сперматозоидов. Считается, что он, прикрепляясь к поверхности половых клеток, защищает их от воздействия микроорганизмов.

Гистатины продуцируются клетками слюнных желез человека и представляют собой молекулы с массой 3–5 кДа, в составе которых имеется большое количество остатков гистидина. Установлено, что у пациентов с выраженным поражением слизистых оболочек ротовой полости грибами из рода кандида, как правило, наблюдаются пониженные концентрации гистатина в слюне, что позволяет относить этот антимикробный пептид к группе фунгицидных.

В настоящее время к бактерицидным веществам причисляют также присутствующие преимущественно в секретах эпителия дыхательных путей **сурфактанты**. Это поверхностно-активные вещества липидной или белковой природы, которые тонкой пленкой покрывают граничащую с воздухом поверхность альвеол легких и препятствуют тем самым их иссушению и спаданию при колебаниях давления воздуха. Установлено, что, помимо своей основной функции, некоторые сурфактанты играют существенную роль в защите от микробной инвазии. В частности, два сурфактантных белка, SP-A и SP-D, способны эффективно связываться с компонентами поверхностных структур бактериальных клеток, причем SP-A преимущественно взаимодействует с полисахаридными веществами капсул бактериальных клеток, а SP-D обладает сродством к липополисахаридам клеточных стенок бактерий. Это позволяет рассматривать такие вещества как коллектины и в определенной степени как опсонины, т. е. вещества, способствующие фагоцитированию микроорганизмов лейкоцитами. Экспериментально установлено, что сочетанное действие SP-A и SP-D существенно подавляет активность как капсулированных, так и некапсулированных вариантов *Klebsiella pneumoniae* – одного из возбудителей легочных заболеваний. Специальными исследованиями показано наличие обоих этих сурфактантов не только в слизи дыхательной системы, но и в секретах слизистых оболочек других органов, что еще раз подтверждает их значимость как антимикробных веществ.

В мочеиспускательном канале удалению чужеродных агентов с поверхности слизистой оболочки способствуют периодическое смывание удаляемой мочой и лизоцим, который входит в состав секретов слизистых оболочек половой системы. Кроме того, в секретах собственно половых желез также присутствуют бактерицидные агенты, например **спермин** в семенной жидкости.

Однако, несмотря на наличие в секретах бактерицидных агентов, определенные участки слизистых оболочек достаточно плотно заселены микроорганизмами, приспособившимися в ходе совместной с млекопитающими эволюции противостоять вышеописанным защитным воздействиям. Так называемая **нормальная микробиота** (применявшийся многие годы термин **«нормальная микрофлора»** в настоящее время считается неверным, но многие медики, иммунологи и микробиологи с трудом воспринимают данное нововведение и продолжают использовать старое название, что следует учитывать при чтении литературы) формируется в первые месяцы после рождения и присутствует здесь на протяжении всей жизни. Наиболее часто на покровах человека встречаются: в носу и носоглотке – стафилококки, коринеморфные бактерии (так называемые дифтероиды), нейссерии, хемофиллюсы; в ротовой полости – стафилококки, стрептококки, хемофиллюсы, актиномицеты, дрожжи, спирохеты, иногда бактерии кишечной группы; в глотке и гортани – стафилококки, стрептококки, нейссерии, хемофиллюсы; на коже – стафилококки, стрептококки, коринебактерии, дифтероиды, пропионобактерии,

дрожжи, иногда бактерии кишечной группы; на слизистой оболочке половых органов – лактобациллы, стрептококки, стафилококки, бактероиды, клостридии, бифидобактерии, дифтероиды, энтерококки, бактерии кишечной группы, дрожжи и трихомонады. Видовой состав микробиоты половых органов близок к таковому микробиоты промежности (поверхности кожи между анальным отверстием и половыми органами) и частично совпадает с самым многочисленным по количеству видов составом микробиоты толстого кишечника. Общее количество видов микроорганизмов, постоянно обитающих в толстом кишечнике, колеблется в норме от 60 до 70, и к уже перечисленным выше представителям можно добавить микрококки, эшерихии, псевдомонады, клостридии, фекальные стрептококки, актиномицеты, дрожжи из рода кандида, мицеллярные грибы и гетеротрофные одноклеточные эукариоты.

Следует отметить, что видовой состав нормальной микробиоты конкретного человека, так же как и численность популяций каждого из входящих в нее видов, индивидуален и может в течение жизни меняться под влиянием как внешних, так и внутренних факторов. Исходя из того, что существенные нарушения видового состава нормальной микробиоты **(дисбактериозы)** четко коррелируют с резким возрастанием инфекционной заболеваемости у переживающих их людей, можно сделать вывод о защитной роли этой совокупности постоянно проживающих на поверхностях тела человека микроорганизмов. Антагонистические отношения между попадающими извне и аборигенными микроорганизмами, как правило, приводят к удалению первых, поскольку аборигенные виды гораздо лучше приспособлены к таким условиям и, кроме того, эффективно воздействуют на случайно попадающие сюда микроорганизмы специально выделяемыми антибиотиками и бактериоцинами. Наиболее ярко в этом плане проявляет себя микробиота толстого кишечника, но установлен и экспериментально подтвержден и защитный эффект микробиоты мочеполовых путей и дыхательных органов.

Тем не менее необходимо учитывать, что подобного рода защитный эффект выражен только при нормальном физиологическом состоянии человека, так как микроорганизмы нормальной микробиоты, условно говоря, не являются абсолютно безвредными, и их воздействие постоянно сдерживается защитными механизмами организма. При каких-либо нарушениях в функционировании этих механизмов часть представителей нормальной микробиоты (медицинские микробиологи называют их условными или оппортунистическими патогенами) могут преодолевать защитные барьеры и вызывать заболевания, относимые медиками к аутоинфекциям.

В связи с этим следует помнить, что длительное воздействие на организм человека определенных химических веществ, неблагоприятно сказывающихся на физиологическом состоянии, почти всегда приводит к дисбактериозам и, как следствие, к повышению уровня инфекционной заболеваемости. Как правило, это наблюдается у имеющих алкогольную или наркотическую зависимость пациентов, поскольку у них пропадает обеспечиваемая нормальной микробиотой защита от облигатных патогенов человека, и одновременно гораздо чаще проявляют себя оппортунистические патогены. Небезопасным в этом плане может стать и избыточное употребление лекарственных препаратов (преимущественно антибиоти-

ков) при осуществлении лечения без надлежащих консультаций с медиками (при так называемом самолечении).

В настоящее время защитные эффекты слизистых оболочек связывают не только с собственно строением слизистых и составом их секретов, но и с функционированием элементов иммунной системы, располагающихся в непосредственной близости или даже в самих слизистых оболочках. **Ассоциированная со слизистыми оболочками лимфоидная ткань** в переводимой с английского языка литературе сокращенно может обозначаться **MALT** (**m**ucosa-**a**ssociated **l**ymphoid **t**issue), а в искон-

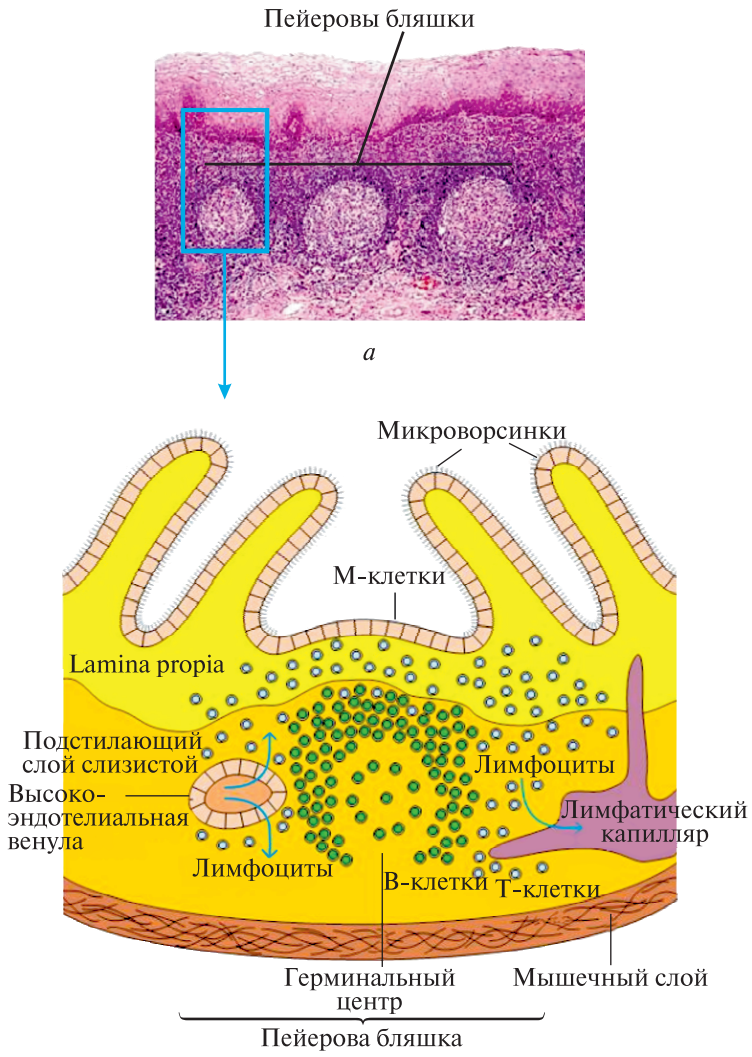


Рис. 1. ИСС желудочно-кишечного тракта (GALT):
а – микрофотография среза стенки кишечника;
б – схематичное изображение имеющихся в ней элементов
(по 2013-KUBY Immunology)

но русскоязычной – **ИСС** (**и**ммунная **с**истема **с**лизистых). Здесь различают **BALT** (**b**ronchus-**a**ssociated **l**ymphoid **t**issue), или ИСС дыхательных путей, и **GALT** (**g**ut-**a**ssociated **l**ymphoid **t**issue), или ИСС желудочно-кишечного тракта.

Существенную роль в формировании защитных свойств слизистых оболочек кишечника играют особые эпителиальные клетки, имеющие на своей поверхности множество складок и называемые микроскладчатыми, или **М-клетками**. Такие клетки своей складчатой поверхностью обращены в просвет выстилаемого слизистой органа и в слизистой оболочке кишечника фактически образуют купол **пейеровых бляшек**. В самой же пейеровой бляшке различают три слоя (или зоны): уже упомянутый купол, прилегающую к нему Т-клеточную зону и В-клеточную (фолликулярную) зону, занимающую центральную часть пейеровой бляшки (рис. 1).

По современным представлениям попадающие на поверхность слизистой оболочки чужеродные частицы захватываются М-клеткой путем эндоцитоза и транспортируются в специальных везикулах к противоположной стороне клетки. Здесь они высвобождаются в просвет пейеровой бляшки посредством экзоцитоза и становятся доступными для иммунокомпетентных клеток.

Этому способствует специфическое строение М-клеток, образующих со стороны подстилающего слизистую оболочку слоя (*lamina propria*) своеобразные карманы, в которых локализуются дендритные клетки и Т-лимфоциты. Активированные Т-клетки, в свою очередь, активируют В-лимфоциты по обычной схеме развития иммунного ответа (она будет описана в последующих разделах пособия), и уже после развития первичного иммунного ответа (обычно через 5–10 дней) в секретах слизистой оболочки можно будет обнаруживать специфические к данной частице (данному антигену) антитела, как правило относящиеся к классу IgA (рис. 2).

Таким образом, благодаря ИСС индуцибельные защитные механизмы могут быть активированы даже при поверхностном контакте с чужеродным антигеном, что усиливает проявление конститутивных защитных барьеров.

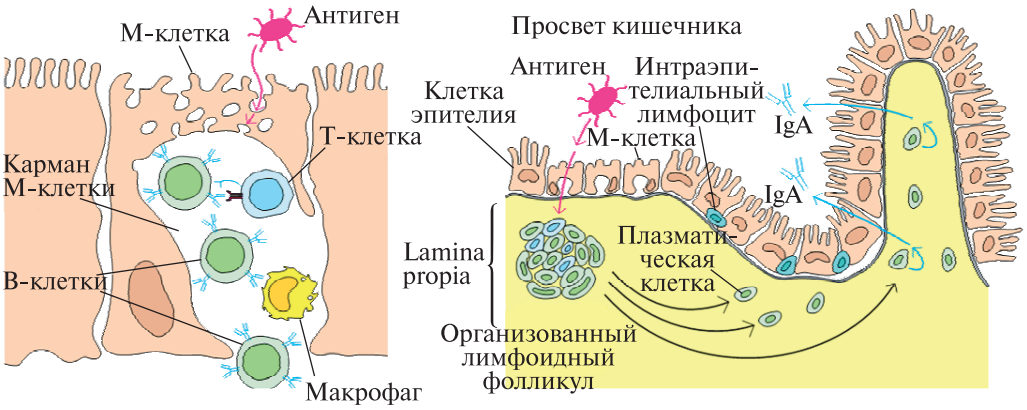


Рис. 2. Схема:
а – переноса чужеродной частицы (антигена) в карман М-клетки;
б – результата иммунного ответа на данный антиген, осуществляемого в пейеровых бляшках (по 2013-KUBY Immunology)

При нарушениях целостности наружных покровов или неполной выраженности их защитных эффектов чужеродные агенты все же могут проникать в нижележащие ткани. В этом случае проявляет себя конститутивная защитная реакция, называемая **воспаление**.

1.1.2. Воспаление

Хотя воспалительная реакция и индуцируется проникновением чужеродного агента, ее не относят к индуцибельным защитным механизмам, поскольку такого рода ответ не обладает выраженной специфичностью, т. е. проходит в целом одинаково при различных воздействиях. Например, воспаление, развивающееся как следствие термического или химического ожога, будет не столь уж значительно отличаться от воспалительного процесса, вызванного проникновением микроорганизмов.

Воспаление как многокомпонентная местная сосудисто-тканевая реакция развивается поэтапно. **Первым этапом (или фазой) воспалительной реакции** является появление в тканевой жидкости веществ, называемых **медиаторами воспаления** (табл. 3).

Таблица 3

Основные медиаторы воспаления

Медиатор	Основной источник	Функция
Гистамин*	Тучные клетки, базофилы	Расширение сосудов, повышение проницаемости стенок капилляров, сокращение гладкой мускулатуры
Кинины (главным образом брадикинин)	Плазма крови	Расширение сосудов, повышение проницаемости стенок капилляров, сокращение гладкой мускулатуры, индукция болевых ощущений
Простагландины	Нейтрофилы, эозинофилы, моноциты, тромбоциты	Расширение сосудов, повышение проницаемости стенок капилляров, индукция болевых ощущений
Лейкотриены	Нейтрофилы, тучные клетки, базофилы	Расширение сосудов, повышение проницаемости стенок капилляров, сокращение гладкой мускулатуры, индукция клеточного прикрепления и хемотаксиса
Компоненты комплемента (главным образом C3a и C5a)	Плазма крови	Способствуют выделению медиаторов воспаления тучными клетками, C5a является хемотаксическим фактором, повышает проницаемость стенок капилляров
Плазмин	Плазма крови	Разрушение фибрина, образование кинина
Цитокины	Лимфоциты, макрофаги	Являются хемотаксическими факторами, колонийстимулирующими факторами, активируют макрофаги и другие иммунокомпетентные клетки

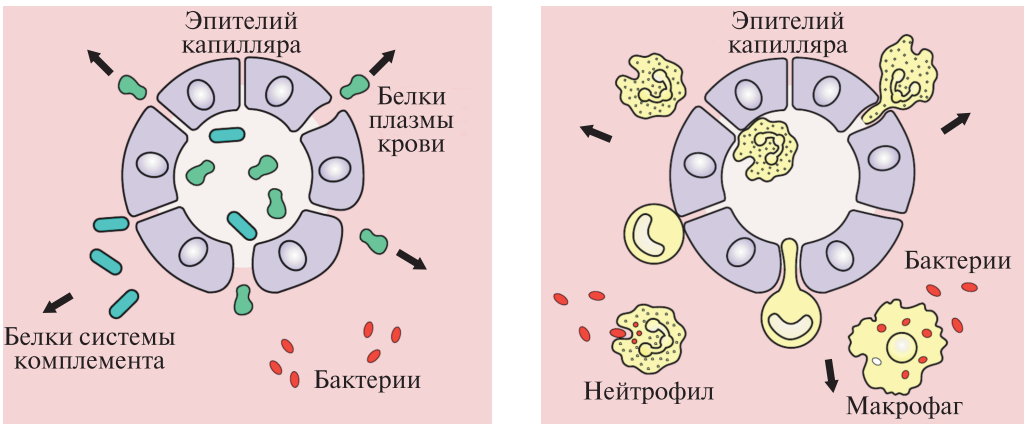
Примечание. У грызунов в тучных клетках и базофилах синтезируется 5-гидрокситриптамин (серотонин), обладающий сходными с гистамином эффектами.

К настоящему времени к ним причисляют гистамин (5-β-имидазолилэтиламин) и серотонин (5-гидрокситриптамин), кинины (брадикинин, каллидин), эйкозаноиды (простагландины и лейкотриены), компоненты комплемента C3a и C5a, плазмин, цитокины (главным образом IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, IL-23 и ФНОα – фактор некроза опухолей альфа), относимые к специальной группе провоспалительных, и интерфероны (преимущественно α-интерфероны и в меньшей степени интерферон γ).

Тучные клетки являются главными продуцентами основных медиаторов воспаления, и именно поэтому их можно обнаружить практически в любой ткани. В значительной мере локализацию тучных клеток определяет близость покровов организма, взаимодействующих с окружающей средой. Наибольшее их количество располагается в подстилающих слизистые оболочки слоях.

Время появления и характер воздействия медиаторов воспаления на кровеносные сосуды и клетки различаются, но в совокупности их действие заключается в следующем. В кровеносной системе в районе формирующегося очага воспаления изменяется просвет кровеносных сосудов, что увеличивает количество притекающей к месту воспаления крови. В то же время проницаемость стенок капилляров изменяется таким образом, что из кровотока в тканевую жидкость проникает гораздо больше, чем в норме, воды, ионов солей и белков плазмы крови. Такие изменения в кровеносных сосудах лежат в основе проявления видимых симптомов воспаления – покраснения и отечности, что характерно для **второй фазы (этапа) воспаления – сосудистой реакции**.

Поскольку некоторые из медиаторов воспаления являются хемоаттрактантами для лейкоцитов, через стенки капилляров в очаг воспаления активно мигрируют фагоцитирующие клетки, главным образом нейтрофилы и моноциты (рис. 3). Миграция осуществляется в первые же минуты воспаления, и по мере увеличения их числа в тканях возрастает и количество выделяемых уже этими клетками медиаторов воспаления в ответ на контакт с вызвавшим воспаление фактором, т. е. имеет место лавинообразное усиление воспалительной реакции.



а *б*

Рис. 3. Проникновение (пенетрация) в очаг воспаления:
а – белков плазмы крови; *б* – фагоцитирующих клеток (по P. Parham, 2015)

Переходящие в очаг воспаления нейтрофилы и моноциты практически сразу проявляют свои фагоцитирующие свойства, что со временем приводит к **уменьшению количества кислорода (гипоксии) и сдвигу pH в кислую сторону (ацидозу)** в воспаленной ткани. Такие изменения в тканевой жидкости совместно с активно осуществляемым фагоцитозом должны приводить к элиминации вызвавшего воспаление агента.

Попавшие в очаг воспаления белки плазмы крови также обеспечивают защитный эффект. В частности, белки системы комплемента и иммуноглобулины оказывают прямое характерное для них воздействие на чужеродный агент и стимулируют, проявляя себя в качестве опсонинов, фагоцитоз. Как упоминалось выше, переходящие из плазмы крови плазмин и кинины усиливают и поддерживают на максимальном уровне воспалительную реакцию, определяя такие ее симптомы, как повышение температуры и болевые ощущения.

Играют свою роль в очаге воспаления и **белки острой фазы воспаления**. Название этой группы белков, выделяемых в плазму крови клетками печени, связано с резким (иногда 1000-кратным) увеличением их продукции в острой фазе инфекционного процесса (т. е. в период разгара инфекционной болезни) или во время наиболее полного выражения вызванных другими причинами воспалительных реакций (при остром воспалении). Показано, что продуцирование гепатоцитами белков острой фазы является ответом на действие интерлейкина-6, интерлейкина-1 и фактора некроза опухолей альфа. Действие этих белков принято относить к конститутивным гуморальным защитным механизмам, поскольку увеличение их концентраций и действие не имеет выраженной специфичности – они одинаково проявляют себя при различных инфекциях или травматических повреждениях. Основными в этой группе выступают сывороточный амилоидный протеин, маннозосвязывающий белок и С-реактивный протеин.

С-реактивный протеин (С-реактивный белок, или сокращенно СРБ), получивший свое название из-за того, что в эксперименте вызвать его появление можно введением С-полисахарида из клеточных стенок некоторых патогенных бактерий, имеет массу около 115 кДа и состоит из 5 имеющих форму дисков субъединиц. Сходной пространственной структурой обладает и **сывороточный амилоидный протеин**, из-за чего оба эти белка относят к суперсемейству пентраксинов. Структурная особенность пентраксинов – наличие на С-конце специализированного, характерного только для белков этого семейства домена, состоящего из 200 аминокислотных остатков. Остальная часть белка может существенно различаться, поэтому пентраксины условно делят на длинные и короткие.

Сывороточный амилоидный протеин и С-реактивный белок относятся к коротким пентраксинам и образуются гепатоцитами печени. Примером длинных пентраксинов является белок PTX3, который синтезируется преимущественно лейкоцитарными клетками (макрофагами, дендритными клетками спинного мозга, нейтрофилами), но может продуцироваться и клетками других тканей. В регуляции конститутивных защитных реакций организма PTX3 играет двоякую роль. Присоединяясь N-концом к поверхности патогенов, он своим общим для всех пентраксинов С-концевым доменом связывает белок C1q из системы комплемента и тем самым фактически запускает (подобно тому, как это

делают иммуноглобулины) классический путь активации системы комплемента даже в отсутствие специфических для патогена антител. В то же время свободный PTX3, присоединяя к себе все тот же C1q, снижает эффективность действия комплемента.

Отличительная черта обоих вариантов пентраксинов – их способность связываться с фосфорилхолином в оболочке грамположительных бактерий таким образом, чтобы определенные ранее недоступные участки фосфорилхолина стали доступными для взаимодействия с белком C3b системы комплемента, что увеличивает вероятность запуска альтернативного пути активации этой системы. Кроме того, СРБ распознается специфическими рецепторами фагоцитирующих клеток, и показано экспериментально, что он проявляет себя как хемоаттрактант для нейтрофилов и опсонин. Установлено также, что мономеры пентраксинов активируют макрофаги и стимулируют их на продукцию цитокинов.

Защитное действие относящегося к группе коллектинов **маннозосвязывающего белка** связывают с его четвертичной структурой, сходной, несмотря на различия в аминокислотных последовательностях полипептидных цепей, с таковой ключевого белка классического пути активации системы комлемента C1q (подробно эта система будет рассмотрена в нашем пособии позже). Благодаря такому сходству маннозосвязывающий белок после его присоединения к остаткам маннозы, фукозы или глюкозамина в полисахаридах клеточных стенок бактерий приобретает активность сериновой протеиназы (эстеразы), действующей так же, как возникающий в классическом пути активации системы комплемента комплекс $C1q(C1r)_2(C1s)_2$, и фактически запускает этот путь активации. Исходя из сродства маннозосвязывающего белка к полисахаридам бактерий, его считают С-лектином, поэтому некоторые авторы опосредованный этим белком путь активации комплемента рассматривают как третий, отличающийся от классического и альтернативного путей, и называют его **лектиновым путем активации системы комплемента**.

Повышение общего количества белков в составе тканевой жидкости во время воспаления приводит к осаждению их (преимущественно по краям воспаленного участка), что в целом ограничивает отток лимфы и распространение вызвавшего воспаление агента по организму. Считается, что один из симптомов воспаления – припухлость (отечность) пораженного участка – частично зависит и от ограничения оттока лимфы из-за описанного выше осаждения белков.

Таким образом, воспаление, будучи само по себе защитной реакцией, создает условия для максимального проявления других защитных механизмов. Их совокупное действие и приводит к устранению причин, вызвавших воспаление, после чего происходит **третья фаза воспаления** – постепенное **исчезновение симптомов воспаления и восстановление нарушенных воспалением функций** подвергшегося атаке органа или ткани.

Реализующиеся в ходе воспаления защитные конститутивные механизмы могут проявлять себя и вне рамок воспалительной реакции и рассматриваются как отдельные. Условно их можно разделять на клеточные и гуморальные. Один из наиболее ярко проявляющихся клеточных защитных механизмов – **фагоцитоз**.

1.1.3. Фагоцитоз

Основные фагоцитирующие клетки организма млекопитающих еще со времен их открытия разделены на **микро-** и **макрофаги**. Эти клетки развиваются из стволовых кроветворных клеток красного костного мозга (гемапоэтических стволовых клеток), дающих при делении стволовую миелоидную клетку (рис. 4).

Стволовая миелоидная клетка (на рис. 4 обозначена как миелоидный предшественник) является предшественником всех не относящихся к лимфоцитам клеток крови и в зависимости от воздействующих на нее гуморальных факторов (цитокинов) в дальнейшем способна развиваться в **гранулоцитарно-моноцитарную клетку** (предшественник гранулоцитов и моноцитов). Последняя имеет два потенциальных пути развития – либо в **монобласт (моноцитарную клетку)**, являющую-

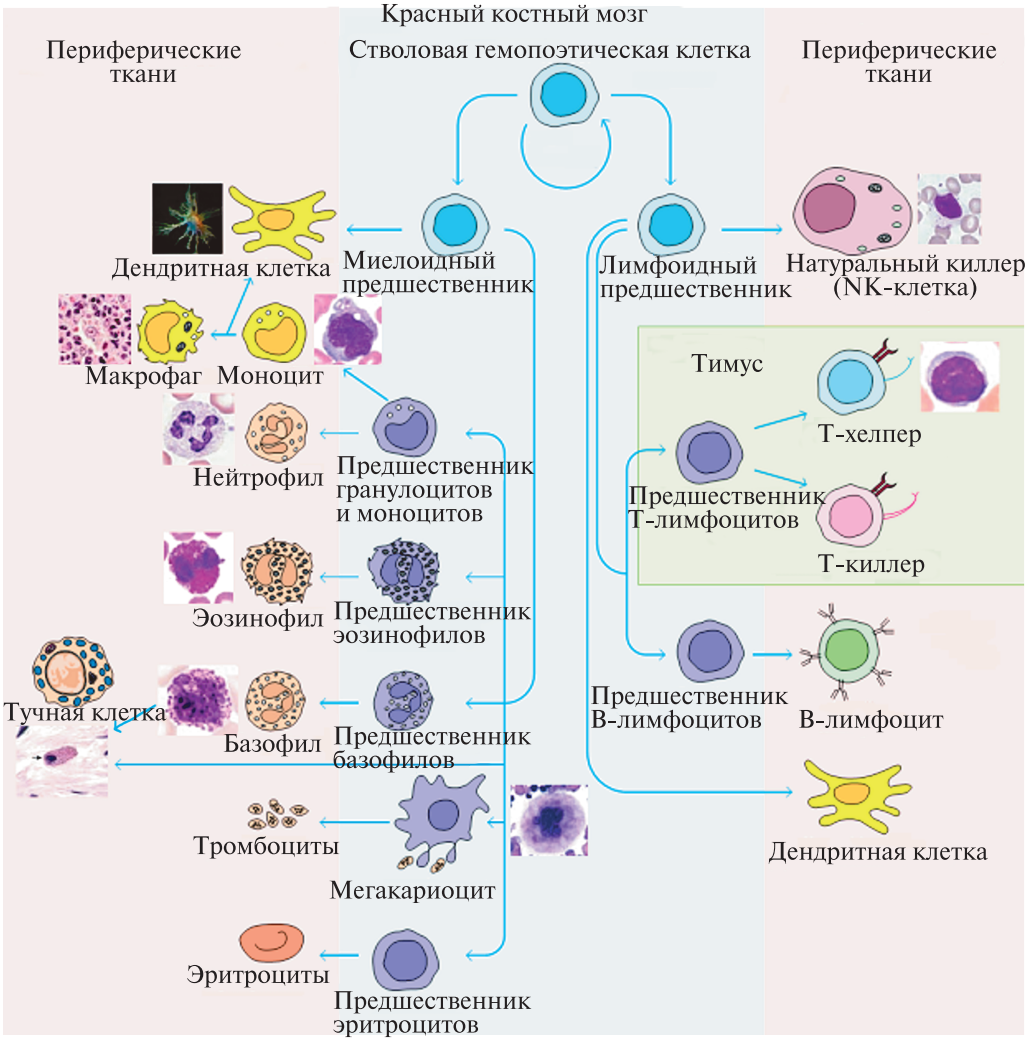


Рис. 4. Общая схема развития клеток крови (по 2013-KUBY Immunology)

ся предшественником моноцитов, либо в **миелобласт (гранулоцитарную клетку)** – прародительницу нейтрофилов.

Монобласты при воздействии таких гуморальных факторов, как моноцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (М-КСФ) и частично интерлейкин-6 (IL-6), превращаются в промоноциты, а те – в **моноциты**. Этот этап развития имеет среднюю продолжительность 50–60 ч, но в кровоток моноциты попадают еще через 13–26 ч, которые уходят на окончательное формирование всех поверхностных молекул, необходимых для транспортировки по кровеносным сосудам и последующего проникновения в ткани. Количество моноцитов в кровотоке из расчета на 1 мм^3 крови колеблется от $1 \cdot 10^2$ до $4{,}4 \cdot 10^2$, что составляет от 1 до 6 % от общего числа лейкоцитов.

Считается, что моноциты непосредственно в крови находятся не более четырех суток, и большинство из них уже на вторые сутки проходит через стенки капилляров, превращаясь в **тканевые макрофаги**. Продолжительность жизни макрофагов, локализующихся в разных тканях, отличается, но в большинстве случаев они существуют около 40 дней. Процесс их образования ускоряется или замедляется в зависимости от состояния организма, в среднем же общая численность макрофагов у здорового взрослого человека определена как $2 \cdot 10^{11}$, и их количество варьирует в пределах 1–10 % от общего числа лейкоцитов. Большая часть этих клеток за время своего существования не делится – только 2–3 % сохраняют способность к пролиферации.

В настоящее время установлено, что относимые ранее к тканевым макрофагам **дендритные клетки миелоидного происхождения** (рис. 5) могут возникать двумя путями (см. рис. 4). Часть из них развивается непосредственно из стволовых миелоидных клеток, а часть из моноцитов крови. Предполагается, что последний путь развития реализуется при массированном попадании в организм чужеродных антигенов (инфицировании) и позволяет быстро увеличить количество дендритных клеток в экстремальной ситуации. В отличие от макрофагов дендритные клетки в гораздо большей степени, чем обычные макрофаги, специализированы не для полного уничтожения захватываемых чужеродных антигенов, а для их процессирования и представления отдельных антигенных детерминант наивным Т-лимфоцитам, т. е. фактически для запуска индуцибельных защитных реакций организма. Именно поэтому их считают связующим звеном между конститутивными защитными механизмами (первой линией защиты), действующими локально, и собственно иммунным ответом на антиген (второй линией за-

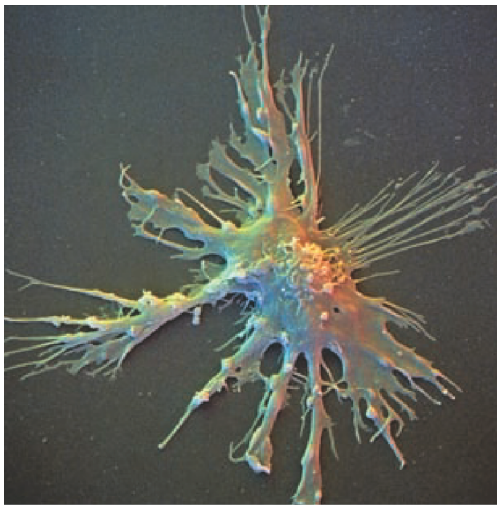


Рис. 5. Изображение дендритной клетки, полученное с помощью сканирующего электронного микроскопа (по 2013-KUBY Immunology)

щиты), который позволяет через 5–7 дней создать эффективную защиту от данного антигена во всем организме, а не только в месте его проникновения. Причем для активации Т-клеток (запуска иммунного ответа) в большинстве случаев таким дендритным клеткам приходится перемещаться из мест захвата антигена во вторичные лимфоидные органы (например, лимфоузлы), где созданы оптимальные условия для взаимодействия клеток первой и второй линий защиты. Информация о том, как именно осуществляется запуск и развитие иммунных ответов, будет изложена в последующих разделах пособия.

Дендритные клетки отличаются от тканевых макрофагов не только функционально, но и морфологически. Название они получили из-за наличия у них множества тонких ветвящихся отростков, визуально сходных с дендритами нейронов (см. рис. 5). Причем эти отростки постоянно изменяются по длине и форме, т. е. представляют собой динамические структуры. Предполагается, что такая морфология обеспечивает дендритным клеткам, с одной стороны, максимальные возможности для контактов с другими клетками иммунной системы, а с другой – способствует наиболее эффективному захвату чужеродных антигенов.

Установлено, что дендритные клетки могут поглощать чужеродные антигены тремя способами: просто фагоцитированием, путем рецептор-опосредованного фагоцитоза и путем пиноцитоза – поглощения содержащих чужеродные частицы жидкостей. Прямыми исследованиями показано, что дендритная клетка способна пиноцитировать от 1000 до 1500 мкм^3 жидкости, что фактически соответствует объему жидкого содержимого самой клетки. Существенно, что пиноцитоз позволяет поглощать практически любые антигены, даже те, которые тем или иным путем избегают контакта с фагоцитирующими клетками.

Естественно, что, выполняя свою основную роль – запуск иммунного ответа, дендритные клетки вносят непосредственный вклад в борьбу с чужеродными антигенами и в рамках первой линии защиты, поскольку поглощенный такими клетками антиген деструктируется и утрачивает патогенные свойства.

Зрелые макрофаги отличаются наличием на своей поверхности специфических молекул, необходимых для проявления свойственных макрофагам функций. Поскольку одной из основных их функций является фагоцитоз, макрофаги обладают связывающими бактериальные липополисахариды рецепторами, среди которых преобладает молекула CD14. Кроме этого, в закреплении на поверхности макрофагов подлежащих фагоцитированию частиц играют существенную роль рецепторы для Fc-частей иммуноглобулинов класса G (Fcγ-рецепторы) – CD64, CD32, CD16 и рецепторы для компонентов комплемента, главными из которых выступают CD35 и CD21, распознающие фрагменты молекулы C3. Крайне важную роль играют также рецепторы для интерлейкинов и молекулы, участвующие в процессах взаимодействия с другими клетками, часть из которых будет рассмотрена в других разделах пособия.

Отличительной чертой макрофагов и дендритных клеток, несмотря на наличие множества отростков, является их способность к активному движению, что обусловлено особыми свойствами их цитоскелета и наличием на их поверхности еще одной группы специализированных молекул – рецепторов для хемокинов (хемокинами называют различные вещества, способные побудить фагоцитирующую клетку к движению в определенном направлении).

Главные фагоцитирующие клетки среди **микрофагов** – **нейтрофилы**. Они, как и другие гранулоциты, развиваются в красном костном мозге из миелобластов. В течение 106–116 ч миелобласты постепенно проходят стадии промиелоцита, миелоцита, палочкоядерного нейтрофила. Развитие этих клеток считается законченным, когда их ядро приобретает характерную именно для нейтрофилов сегментированность (сегментированное подковообразное ядро – наиболее характерная отличительная особенность морфологии нейтрофилов), но при стимуляции миелопоэза они могут покидать красный костный мозг и на стадии палочкоядерной клетки.

Нейтрофилы – самая многочисленная группа из всех лейкоцитов. У здорового взрослого человека их количество составляет около 70 % от общего числа белых кровяных телец. Продолжительность жизни нейтрофилов невелика – 2–3 дня, причем после выхода из красного костного мозга они только 8–10 ч пребывают в кровотоке, а затем перемещаются в ткани, где погибают либо в процессе борьбы с чужеродными агентами, либо по механизму апоптоза. Считается, что зрелые нейтрофилы не способны к пролиферации, и каждые сутки в организме здорового взрослого человека образуется $1 \cdot 10^{11}$ таких клеток.

На поверхности нейтрофилов также присутствуют рецепторы для бактериальных липополисахаридов (CD14), Fcγ-рецепторы (CD32 и CD16), рецепторы для хемокинов и интерлейкинов. Нейтрофилы эффективнее всех других клеток отвечают на хемотаксические стимулы, и, вероятно, поэтому их количество в месте запуска воспалительной реакции увеличивается в 100 раз уже через 2 мин после введения активного чужеродного агента, например бактериальных клеток.

Эозинофилов в организме значительно меньше – от 0,5 до 3 % от общего числа лейкоцитов. Развиваются они аналогично нейтрофилам, но их развитие наиболее чувствительно к IL-5, известному как фактор роста и дифференцировки эозинофилов. Считается, что именно под влиянием IL-5 миелоциты начинают формировать не азурофильные, как у нейтрофилов, гранулы, а эозинофильные, содержащие так называемый главный щелочной белок в кристаллической форме и перекиси (крупные гранулы), и кислую фосфатазу, арилсульфатазу и ряд других гидролитических ферментов с бактерицидным действием (мелкие гранулы). После выхода из красного костного мозга они находятся в кровотоке около получаса и перемещаются в ткани, где существуют максимально до 25 дней (время полужизни – 12 суток).

На поверхности зрелых эозинофилов находятся Fcγ-рецептор CD32 и низкоаффинный Fcε-рецептор CD23 (по сравнению с Fcε-рецепторами базофилов и тучных клеток он гораздо хуже связывает иммуноглобулины класса IgE), рецептор для компонентов комплемента (CD35) и специфический маркер CD9, по наличию которого эти клетки при необходимости можно отличать от нейтрофилов.

Фагоцитарная активность выражена у эозинофилов значительно слабее, чем у нейтрофилов и макрофагов, но они способны осуществлять так называемый внеклеточный цитолиз, выделяя из своих гранул переведенный при определенной активации в жидкое состояние щелочной белок. Благодаря такой активности реализуется борьба с теми паразитами, которых невозможно фагоцитировать сразу (например, с паразитическими червями).

При инфицировании организма в ходе развития инфекционного процесса количество основных фагоцитирующих клеток, прежде всего нейтрофилов, существенно возрастает за счет стимулирования образования новых клеток гранулоцитов в красном костном мозге. Это позволяет медикам на основании общего анализа крови судить о наличии инфекционного заболевания, контролировать эффективность терапии в ходе инфекции и оценивать степень выздоровления пациентов.

Базофилы представляют собой самую малочисленную группу гранулоцитов – их количество у млекопитающих оценивают как 0,2–0,5 % от общего числа лейкоцитов. Это сильно гранулированные клетки, имеющие окрашивающиеся основными красителями гранулы с различным содержимым. В основном в гранулах базофилов выявляются хондроитинсульфаты А и С, гепарин и кислые глюкозоаминогликаны, а также серотонин (у грызунов) или гистамин, совместное действие которых на стенки кровеносных сосудов наиболее ярко проявляется при повышении их концентрации в ходе развития воспалительной реакции. Кроме этого, в гранулах базофилов присутствуют пероксидаза, рибонуклеаза, гистидинкарбоксилаза, различные дегидрогеназы и протеиназы, близкие по действию к пищеварительным ферментам. Это указывает на их способность к фагоцитозу, однако роль их как фагоцитирующих клеток считается незначительной.

Развитие базофилов происходит по общей для всех гранулоцитов схеме, но в период окончательного созревания они обязательно приобретают специфические поверхностные молекулы, позволяющие им, в отличие от многих других клеток, очень эффективно связывать иммуноглобулины класса Е. Fcε-рецепторы базофилов принято делить на две группы – FcεRI и FcεRII, причем первые обладают значительно более высокой, чем вторые, способностью присоединять и удерживать IgE. Именно с их наличием связывают уникальную способность базофилов и сходных с ними тучных клеток выбрасывать содержимое своих гранул при воздействии на эти клетки антигенов, комплементарных 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, как указывалось выше, определяют развитие воспаления как защитной реакции.

Ранее считалось, что все тучные клетки возникают как результат изменений базофилов вследствие проникновения их из кровотока ткани. В настоящее время многие исследователи склонны предполагать, что базофилы и тучные клетки ведут свое происхождение от общего предшественника, из которого при дозревании в селезенке мышей могут образовываться предшественники базофилов и предшественники собственно тучных клеток. Именно последние и становятся тучными клетками, проникая через стенки капилляров в ткани. Однако некоторые авторы не исключают возможности превращения в тучные клетки зрелых базофилов, поэтому вопрос о происхождении тучных клеток пока остается дискуссионным.

Наибольшее количество **тучных клеток** обнаруживается в контактирующем с окружающей средой эпителии и подстилающих его слоях (слизистые оболочки пищеварительного, дыхательного и урогенитального трактов) или же в собственно коже. Значительное количество (10^4–10^6 на 1 г ткани) тучных клеток постоянно находится в серозных оболочках внутренних органов. Тучные клетки по сравнению с базофилами имеют большее количество гранул и способны к прижизненной де-

грануляции: после получения соответствующих сигналов они посредством экзоцитоза выделяют содержимое своих гранул в окружающие их тканевые жидкости. Значительная часть секретируемых таким путем веществ – заранее синтезированные медиаторы воспаления (гистамин, гепарин и др.), что и определяет основную роль тучных клеток в запуске и поддержании воспалительной реакции. После дегрануляции они могут восстанавливать характерное для них количество гранул, сохраняя тем самым способность влиять на протекание воспаления по мере развития.

Кроме того, тучные клетки способны в течение продолжительного времени синтезировать и выделять вещества, стимулирующие пролиферативную активность клеток эпителиальных и соединительных тканей, а также усиливающие продукцию этими клетками коллагена и других белков межклеточного вещества. Тем самым они влияют на рост кровеносных сосудов и нервных окончаний, способствуют восстановлению тканей после воспаления.

Сами тучные клетки, в отличие от базофилов, также могут делиться. Причем их пролиферативная способность различается в зависимости от локализации – находящиеся в серозных оболочках тучные клетки нуждаются для стимуляции деления в интерлейкине-3 (IL-3), а локализованные в слизистых – одновременно в IL-3 и IL-4. Этот факт, а также не полностью выясненная зависимость тучных клеток слизистых оболочек от тимуса (у тимэктомированных или изначально бестимусных животных эти клетки отсутствуют) позволяют некоторым авторам рассматривать тучные клетки слизистых и серозных оболочек как две функционально и морфологически различающиеся субпопуляции. Продолжительность жизни тучных клеток обеих субпопуляций оказывается значительно большей, чем у других гранулоцитов, и исчисляется месяцами, а иногда и годами. Несмотря на то что базофилы и их производные обладают фагоцитарной активностью, роль их как фагоцитирующих клеток считается незначительной.

Собственно **процесс фагоцитоза** может различаться в некоторых деталях у различных групп фагоцитов, но общая схема его осуществления следующая. Условно весь процесс принято делить на несколько этапов. Первым из них считается **хемотаксическое перемещение фагоцитирующей клетки** к объекту фагоцитирования. Аттрактантами для фагоцитов могут являться как вещества, выделяемые проникшим во внутреннюю среду чужеродным агентом, так и молекулы, появившиеся в тканевой жидкости в результате воздействия чужеродного агента на клетки организма. В частности, при разрушении клеток бактерий в тканевой жидкости возникает состоящий из формилметионина, лейцина и фенилаланина (сокращенно fMLP) короткий пептид, являющийся у прокариот инициатором синтеза белка и абсолютно несвойственный эукариотическим клеткам. Среди наиболее типичных хемоаттрактантов собственного происхождения можно назвать медиаторы воспаления (лейкотриен B4, гистамин и др.), продукты активации системы комплемента (C3a и C5a), образующиеся при запуске системы свертывания крови вещества (тромбин, фибрин), выделяемые различными клетками крови цитокины (IL-8, IL-1β, IL-2 и др.). Для этих веществ на поверхности фагоцитирующих клеток имеются специфические рецепторы, присоединение к которым действующего агента вызывает изменение связанного с рецепторами белка G, что и приводит к запуску целого ряда процессов. В частности, повышается восприимчивость клеток к различного рода активирующим факторам, повышается секреторная актив-

ность фагоцитов, но главными применительно к хемотаксису являются перестройка цитоскелета и, как следствие этого, поляризация клетки. Клетка из округлой становится треугольной, в обращенной в сторону движения части цитоплазмы уменьшается количество органелл и возникает сеть состоящих из F-актина микрофиламентов, сокращение которых и определяет движение всей клетки в нужном направлении. На мембране в этой части клетки появляются в большем количестве интегрины – специфические молекулы для усиления адгезии движущейся клетки на стенках капилляров кровеносной системы, а также усиливается продукция фагоцитом катепсинов, коллагеназы и эластазы, способствующих проникновению через подстилающие эпителий базальные мембраны. Именно благодаря таким изменениям фагоцитирующие клетки и могут достаточно быстро перемещаться из крови к месту повреждения тканей, т. е. к месту потенциального проникновения чужеродных агентов.

Сам же чужеродный агент в это время, как правило, **опсонизируется**, т. е. к его поверхности прикрепляются молекулы C3b из системы комплемента и (если таковые имеются в организме) иммуноглобулины класса G, комплементарные антигенным детерминантам чужеродного агента. От того, насколько эффективно произойдет опсонизация, зависит следующий этап фагоцитоза – **связывание фагоцита** и **чужеродного объекта**. Подобного рода связывание (часто называемое **адсорбцией**, или **адгезией**) может происходить несколькими способами.

В том случае, когда чужеродный агент еще не успел опсонизироваться, его прикрепление к мембране фагоцита происходит за счет лектиноподобных молекул CD160, CD33 и родственных им рецепторов, способных распознать соединения, включающие остатки сиаловой кислоты. Кроме того, на поверхности фагоцитирующих клеток имеются рецептор для β-глюкана грибов, который называется Dectin-1, ряд лектинов C-типа (MICL, Dectin-2, Mincle и DNGR-1) и несколько разновидностей рецепторов, способных присоединять к себе как апоптотические остатки собственных клеток организма, так и лиганды чужеродного происхождения (примерами таких рецепторов общего действия могут быть SR-A, SR-B, MARCO и CD36). Предполагается, что сила связывания лигандов такими рецепторами невысока, для перехода к следующему этапу фагоцитоза (формированию фагосомы) необходимо одновременное соединение нескольких таких рецепторов с лигандами.

Лучше всего адгезируются опсонизированные чужеродные частицы, что объясняется наличием на поверхности фагоцитирующих клеток специализированных рецепторов для молекулы C3b (CD35, CD21, CD11b/CD18 и CD11c/CD18), а также рецепторов FcγRII и FcγRIII (CD32 и CD16 соответственно), обладающих высоким сродством к определенным участкам Fc-частей иммуноглобулинов класса G. Прикрепление за счет этих рецепторов, во-первых, оказывается в несколько раз прочнее описанного в предыдущем абзаце, а во-вторых, и это наиболее существенно, благодаря опсонизации любые частицы, несмотря на различия в их поверхностях, могут одинаково эффективно прикрепляться и, следовательно, в конечном итоге лучше уничтожаться фагоцитирующими клетками.

Следующий этап фагоцитоза – **формирование фагосомы**. Надо отметить, что взаимодействие специфических поверхностных структур фагоцита со специфическим для них субстратом служит одним из сигналов для его активации. Процесс начинается с отсоединения связанного с рецепторами внутриклеточного белка G,

который, находясь в свободном состоянии, активирует фосфолипазу С, катализирующую распад фосфоинозитидов до диацилглицерина и инозитол-3-фосфата. Под влиянием последнего осуществляется мобилизация из внутриклеточных депо ионов Ca^{2+}, а диацилглицерин в присутствии ионов кальция активирует протеинкиназу С. Под ее воздействием происходит перемещение белков цитоскелета к рецепторам, связанным с адгезированной частицей, и в данном месте клетки возникают псевдоподии, охватывающие частицу. Внутри псевдоподии низкомолекулярный G-актин полимеризуется в нитевидный F-актин, из которого формируются цитофиламенты псевдоподии. Вследствие сокращения этих филаментов и изменения вязкости цитоплазмы за счет их сшивания специальным белком актиногелином (этот белок перекрестно связывает нити F-актина и переводит тем самым цитоплазму в данном участке в состояние геля) возникает зона повышенной жесткости цитоплазмы, что обеспечивает ее локальное вдавливание в области контакта с фагоцитируемой частицей. При этом частица полностью охватывается мембраной фагоцита и наблюдается замыкание ее по принципу застежки «молния».

Далее происходит **превращение фагосомы в фаголизосому** благодаря объединению с ней имеющихся в цитоплазме фагоцитирующей клетки лизосом. Условно лизосомы (гранулы) нейтрофилов делят на три группы. Названия групп связаны как с порядком присоединения лизосом к фагосоме (а в последующем – к фаголизосоме), так и с особенностями их содержимого. Различают гранулы трех типов: первичные, вторичные и третичные.

Первичные (присоединяющиеся к фагосоме первыми) гранулы называют также азурофильными, поскольку они наиболее интенсивно окрашиваются красителем азуром при использовании классического метода окраски лейкоцитов по Романовскому – Гимзе. Предложенный Густавом Гимзой усовершенствованный вариант красителя Романовского (Д. Л. Романовский – русский врач, предложивший метод окраски лейкоцитов) содержит три красителя – метиленовый синий, окрашивающий цитоплазму в голубой цвет, эозин, окрашивающий ядро в темно-красный (фиолетовый) цвет, и азур, окрашивающий в зависимости от pH содержимое гранул лейкоцитов в цвета от темно-красных до синих. Отличительным маркером содержимого таких гранул является фермент миелопероксидаза.

Вторичные гранулы, называемые также специфическими, содержат бактерицидные факторы, действующие без участия кислорода. Их отличительным признаком считается наличие в них лактоферрина. Третичные (или желатиназные) гранулы содержат гидролитические ферменты, действующие на последнем этапе фагоцитоза.

Следует отметить, что начавшаяся при адгезивном контакте чужеродной частицы и фагоцита активация выражается не только в описанных процессах поглощения частицы, но и в подготовке к развитию так называемого **кислородного (дыхательного) взрыва**. Под этим понимают происходящее с обязательным участием молекулярного кислорода и осуществляющееся в течение нескольких секунд после поглощения частицы образование химических продуктов с сильно выраженными окислительными свойствами. Благодаря высокой реакционной способности такие продукты являются сильнейшими бактерицидными веществами, и именно их действие определяет **кислородзависимую инактивацию фагоцитированных микроорганизмов** (табл. 4).

Таблица 4

Кислородзависимые механизмы инактивации микроорганизмов в фаголизосомах

Участники реакции	Ферменты	Продукты реакции
Глюкоза + НАДФ$^+$	Гексозомонофосфатный шунт	Пентозофосфат + НАДФ·Н
НАДФ·Н + O_2	Фаголизосомная НАДФ-оксидаза	НАДФ$^+$ + O_2^-
$2O_2^-$ + $2H^+$	Без участия ферментов	H_2O_2 + O
O_2^- + H_2O_2	Без участия ферментов	OH* + OH^- + O
H_2O_2 + Cl^-	Миелопероксидаза	OCl^- + H_2O
OCl^- + H_2O	Без участия ферментов	O + Cl^- + H_2O
Аргинин + O_2	Индуцибельная форма синтетазы оксида азота	NO + цитруллин
NO + O_2^-	Без участия ферментов	$ONOO^-$
$2O_2^-$ + $2H^+$	Супероксиддисмутаза (надпероксиддисмутаза)	O_2 + H_2O
$2H_2O_2$	Каталаза (пероксидаза)	$2H_2O$ + O_2

Примечания: 1. Красным цветом обозначены бактерицидные агенты.
2. OH* – гидроксил-радикал.

В основе кислородного взрыва лежит ряд последовательно происходящих реакций, начинающийся с накопления в первичных лизосомах значительных количеств восстановленного НАДФ в реакциях метаболизма глюкозы, описанных как гексозомонофосфатный шунт. Присутствующий в мембране первичных лизосом неактивный фермент НАДФН-оксидаза сразу же после слияния лизосомы с фагосомой активируется и катализирует превращение молекулярного кислорода в **супероксид-анион (надпероксидный анион)**, при участии которого образуются еще несколько обладающих бактерицидной активностью агентов: **перекись водорода**, **синглетный (атомарный) кислород** и **гидроксил-радикал (**OH*) (см. табл. 4).

Считается, что после слияния фагосомы с лизосомами в сформировавшейся фаголизосоме появляются миелопероксидаза, супероксиддисмутаза и каталаза. Под влиянием первой образуются дополнительные бактерицидные радикалы **гипохлорит-анион** и **гипоиодит-анион**, а каталаза и супероксиддисмутаза обеспечивают удаление избыточных количеств перекиси и супероксид-аниона, поскольку они опасны и для самой фагоцитирующей клетки.

Подобного рода кислородзависимый механизм инактивации характерен как для нейтрофилов, так и для макрофагов, но в характере его развития и протекания имеются не совсем идентифицированные различия. В частности, генерация кислородного взрыва у макрофагов нуждается, как установлено в экспериментах с применением ингибитора синтеза белка циклогексимида, в синтезе дополнительных белков.

Кроме того, для макрофагов мышей описан еще один инактивирующий микобактерии цикл реакций с участием кислорода – **образование оксида азота и его производных**, формирующихся в результате взаимодействия NO с активными производными O_2 (см. табл. 4).

Этот механизм инициируется при воздействии на фагоцитирующую клетку цитокинов – интерферона γ и фактора некроза опухолей α, под влиянием которых активируется индуцибельная форма синтетазы оксида азота. Этот фермент в присутствии ионов Ca^{2+}, лейкотриена В4 и НАДФ катализирует присоединение кислорода к атомам азота в гуанидиновой группе в составе L-аргинина, что приводит при обязательном участии тетрагидробиоптерина к образованию NO и цитруллина. Образовавшийся **оксид азота** токсичен для некоторых видов болезнетворных бактерий, а также описано его губительное действие на злокачественно измененные клетки млекопитающих. Возникающие при взаимодействии NO с активными формами кислорода **пероксинитриты** обладают бактерицидными свойствами.

Подобного рода процессы, происходящие в активно фагоцитирующих клетках, вызывают усиление поглощения фагоцитами кислорода. Вот почему в очагах воспаления, несмотря на значительно повышенный приток крови к ним, обычно развивается нехватка кислорода – гипоксия.

Значимость кислородзависимых процессов инактивации в защите от патогенов подтверждается молекулярно-генетическими исследованиями пациентов с хронической гранулематозной болезнью. При данном наследственном заболевании проявляется сверхчувствительность к инфицированию бактериями и грибами, при этом вызванные ими инфекционные процессы протекают в гораздо более тяжелой форме. Причиной такого иммунодефицита являются мутации в генах, кодирующих компоненты фаголизосомной НАДФ-оксидазы, которые приводят к невозможности генерации кислородного взрыва. Прямое подтверждение этому получено также на генетически модифицированных белых мышах, у которых были «нокаутированы» кодирующие НАДФ-оксидазу гены.

Кроме описанных механизмов инактивации в фагоцитирующих клетках реализуются и **кислороднезависимые**. Они начинают проявлять себя после образования фаголизосомы, поскольку осуществляющие бактерицидное или бактериостатическое действие молекулы первоначально накапливаются в лизосомах различного типа.

Одной из групп подобным образом действующих соединений выступает группа **катионных белков**, включающая низкомолекулярные пептиды **дефензины** (подробно описаны в разделе «Непроницаемость покровов» и табл. 2) и имеющие большие молекулярные массы катепсин G, азуроцидин, белки p25, p37, p57 и BPI. Дефензины обнаружены в лизосомах макрофагов кроликов и нейтрофилов человека и представляют собой состоящие из 30–33 аминокислотных остатков молекулы, которые при контакте с мембранами микробных клеток образуют в них ионные каналы, приводя тем самым микроорганизм к гибели. Считается, что действие дефензинов проявляется сразу же после реализации кислородзависимых защитных механизмов, когда среда в фаголизосоме еще имеет щелочные значения pH. Установлено, что щелочная среда сохраняется в фаголизосоме около 15 мин, а затем за счет поглощения фаголизосомой ионов водорода pH сдвигается до значений 4,5. Это создает благоприятные условия для проявления активности близких по действию к пищеварительным **гидролитических ферментов**, попадающих в фаголизосому из слившихся с ней на данном этапе специализированных лизосом, и одновременно ограничивает поступление в микробную клетку питательных веществ. Присутствующий здесь же **лактоферрин**, связывающий ионы железа таким

образом, чтобы бактерии не могли его использовать, также считается бактерицидным фактором. Способствует снижению жизнеспособности фагоцитированных бактерий и прямое действие на их клеточную стенку **лизоцима**, накапливаемого в специализированных лизосомах фагоцитов.

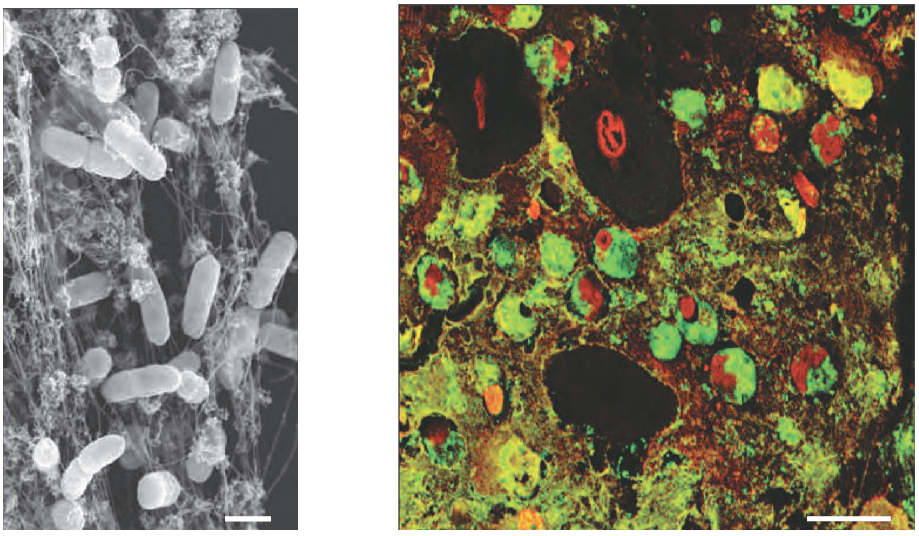
Как правило, сочетанное и последовательное действие описанных защитных механизмов приводит микроорганизм к гибели, а затем уже неспособные защищаться и репарировать себя клетки полностью разрушаются до низкомолекулярных веществ под влиянием ферментов – протеаз, липаз, нуклеаз и углеводдеструктирующих ферментов, которых в лизосомах фагоцитов выявлено более 60 разновидностей. В этом случае фагоцитоз считается завершенным, поскольку осуществлен последний этап – **полная деструкция фагоцитированного объекта**.

Однако некоторые патогенные микроорганизмы приобрели в ходе совместной с хозяином эволюции способность противостоять инактивирующему воздействию фагоцитов и сохранять жизнеспособность, находясь в фаголизосомах. Медики называют такое явление **незавершенным фагоцитозом** и считают его одной из причин, способствующих переходу ряда болезней из острых состояний в хронические. Механизмы, обеспечивающие такое выживание, не одинаковы у разных видов патогенов и, вероятно, не все еще изучены, но точно показано, что некоторые бактерии продуцируют каталазу, снижая тем самым бактерицидный эффект кислородзависимых путей инактивации. Представители рода *Mycobacterium* имеют в составе своих клеточных стенок содержащий фенолы гликолипид, эффективно связывающий свободные радикалы и препятствующий тем самым их действию на жизненно важные молекулы. Считается, что капсулированные формы некоторых бактерий сходным образом защищаются от свободных радикалов, но в данном случае инактиваторами активных форм кислорода и их производных служат вещества капсулы, которую при ее повреждении клетки патогена успевают восстанавливать. Микобактерии и лейшмании способны препятствовать слиянию лизосом с фагосомой и подавлять действие сдвигающего pH в сторону кислых значений протонного «насоса», продуцируя содержащие ионы аммония вещества. Для локализующихся внутри фагосом микобактерий показана также продукция особого вещества – липоарабиноманнана, которое препятствует активирующему действию γ-интерферона на фагоцит. Некоторые из патогенов даже способны размножаться либо находясь в фаголизосоме, либо, как это описано для микобактерий, разрушать мембрану фагосомы и репродуцироваться в цитоплазме фагоцита.

В настоящее время установлено, что практически все фагоцитирующие клетки воздействуют и на нефагоцитированные чужеродные агенты. Подобно осуществляющим внеклеточный цитолиз эозинофилам нейтрофилы и тканевые макрофаги могут секретировать содержимое своих специализированных гранул в тканевые жидкости. В какой-то мере присутствие дефензинов, катионных белков, лактоферрина в плазме крови и секретах некоторых экзокринных желез можно связывать именно с такой активностью лейкоцитов.

В 2004 г. группа немецких исследователей открыла еще одну антимикробную активность нейтрофилов, механизм реализации которой был описан в 2007 г. Установлено, что при определенных воздействиях со стороны болезнетворных бактерий (в частности, действии их липополисахаридов) в присутствии IL-8 нейтрофилы погибают по необычной схеме, отличной от некроза и апоптоза. При этом

в тканевых жидкостях формируются специальные сети, состоящие из фрагментов двуспиральной ДНК, небольшого количества гистонов и факторов с бактерицидной активностью, которые обычно накапливаются во вторичных лизосомах. Эти сети способны задерживать патогенные микроорганизмы в силу своей пространственной структуры (попросту говоря, бактерии запутываются в них) и убивать их с использованием фактически внутриклеточных бактерицидных факторов. Такие структуры получили название **Neutrophil extracellular traps** (сокращенно **NETs**), что можно перевести как **нейтрофильные внеклеточные ловушки** (рис. 6).



а *б*

Рис. 6. Бактерии *Salmonella typhimurium* в нейтрофильных внеклеточных ловушках (сканирующая электронная микроскопия, белая полоска внизу соответствует 1 мкм) (*а*); нейтрофилы на различных этапах нетозиса в участке кожи, пораженной поксвирусом (*б*). Красным окрашен хроматин, зеленым – белки. Белая полоска соответствует 20 мкм (по P. Parham, 2015)

Схема такого специфического умирания нейтрофилов следующая. В ядре клетки проходят процессы, в результате которых исчезает разница между эухроматином и гетерохроматином, т. е. деспирализованные хромосомы теряют обычно присущую им гетерогенность. При этом нити ДНК сохраняют относительную целостность. Затем происходит растворение ядерной мембраны, мембран лизосом и эндоплазматической сети. Это приводит к объединению содержимого специализированных вторичных и третичных лизосом и измененного хроматина. После этого разрушается наружная цитоплазматическая мембрана, и на месте умершей клетки формируется NETs. Некоторые авторы в последние годы используют для такого отличного от обычных путей способа гибели клеток по аналогии с некрозом и апоптозом название «нетоз» (netosis).

То, что процесс нетоза и формирования NETs является не случайным, подтверждается его зависимостью от осуществляемого нейтрофилами кислородного взрыва. Четко показано, что при отсутствии в нейтрофилах НАДФ-оксидазы или

ее дефектности (у пациентов с хронической грануломатозной болезнью) формирования компонентов NETs не происходит. В экспериментах на выделенных из организма суспензиях нейтрофилов, в которых образование NETs индуцировали массированным воздействием *Staphylococcus aureus*, продемонстрировано отсутствие формирования ловушек при действии ингибиторов активности фаголизосомной НАДФ-оксидазы. Это позволяет относить формирование NETs к кислородзависимым способам борьбы с патогенами, но в данном случае такую борьбу нейтрофилы, в отличие от кислородного взрыва, осуществляют, если можно так выразиться, посмертно.

За последующие годы накоплена значительная информация об эффективности нейтрофильных внеклеточных ловушек. Их образование в очагах воспаления зафиксировано как при обследовании пациентов с различными инфекционными заболеваниями, так и в экспериментальных моделях инфекционных процессов на лабораторных животных. Показано, что NETs улавливают и убивают многие виды бактерий, грибов и вирусов. Установлено также, что некоторые патогенные бактерии (например, стрептококки) способны противостоять такому воздействию со стороны хозяина, секретируя ДНКазы (у стрептококков она называется «стрептодорназа»).

Следует отметить, что сохранившие жизнеспособность внутри фагоцитирующих клеток патогены клеточного строения укрываются таким образом от других защитных реакций организма-хозяина: на них не могут подействовать белки системы комплемента, иммуноглобулины и иные гуморальные факторы, они фактически не могут быть обнаружены другими фагоцитирующими клетками и для уничтожения такого патогена организму приходится убивать собственные фагоцитирующие клетки, используя цитотоксические Т-лимфоциты и иммунный ответ с участием Т-хелперов подтипа 1 ($Т_Н1$) уже в рамках индуцибельных защитных реакций, развитие которых будет рассмотрено в следующих разделах пособия.

Но, как известно, инфицировать организм могут и патогены неклеточного строения – вирусы. Они проникают в клетки организма за счет своих вирулентных свойств и размножаются в цитоплазме, уходя тем самым от губительного действия характерной для фагоцитоза кислородзависимой и кислороднезависимой инактивации. Для борьбы с ними в рамках реализации конститутивных защитных механизмов (механизмов врожденного иммунитета или первой линии защиты) организм млекопитающих использует специализированные клетки не миелоидного, а лимфоцитарного ряда. Это так называемые **естественные киллеры**, или **NK-клетки** (от англ. natural killers).

1.1.4. Естественные киллеры (NK-клетки)

Для их образования (см. рис. 5) часть стволовых лимфоцитарных клеток (предшественников лимфоцитов) в красном костном мозге развивается по особой схеме. Зрелые NK-клетки морфологически отличаются от функционирующих во второй линии защиты Т- и В-лимфоцитов большими размерами и наличием цитоплазматических гранул, из-за чего их называют большими гранулярными лимфоцитами. В отличие от малых лимфоцитов, которые вступают в непосредственную борьбу с патогеном через 5–7 суток, естественные киллеры изначально готовы

для активных действий и циркулируют по организму по своей особой схеме. При появлении в организме вирусов или раковых клеток они немедленно вступают в борьбу с ними, поэтому рассматриваются как компоненты конститутивных факторов защиты, т. е. являются представителями клеток, обеспечивающих врожденный иммунитет.

Участие NK-клеток в антивирусной защите реализуется по двум основным направлениям. Во-первых, они убивают инфицированные вирусом клетки, ограничивая тем самым размножение вирусов, а во-вторых, запускают и эффективно поддерживают воспалительную реакцию в местах обнаружения инфицированных вирусом клеток. Для этого NK-клетки активно продуцируют провоспалительные цитокины, которые действуют на местные тканевые макрофаги, активируя их на продукцию новых медиаторов воспаления и стимулируя захват ими пораженных вирусами клеток. По этой способности активировать макрофаги на борьбу с вирусной инфекцией естественные киллеры близки к работающим во второй линии защиты Т-хелперам. В то же время по своей основной, давшей им название, функции они схожи с действующими во второй линии защиты цитотоксическими лимфоцитами приобретенного иммунитета – Т-киллерами. Как известно, сходные функции базируются на сходстве морфологическом, поэтому по поверхностным молекулам NK-клетки трудно отличимы от других лимфоцитов: они имеют почти все общие поверхностные маркеры Т-лимфоцитов (за исключением комплекса TCR-CD3) и одну молекулу, характерную только для них и отсутствующую у других лимфоидных клеток, – CD56. Именно на этой основе при проточной клеточной флуориметрии удается отделять естественные киллеры от остальных лимфоцитов.

Насколько важен вклад NK-клеток в борьбу с вирусными инфекциями, можно проследить на историях болезней некоторых пациентов. В частности, люди с иммунодефицитами, при которых отсутствуют естественные киллеры, постоянно страдают от герпесвирусных заболеваний и вынуждены медикаментозно лечить герпес, хотя адаптивный иммунитет у таких пациентов развивается на уровне человека без иммунодефицита.

О значимости связанного с NK-клетками механизма защиты говорит и их численное представительство: среди лимфоцитов периферической крови их не менее 5 %, а при определенных обстоятельствах этот показатель может повышаться до 25 %. Помимо кровотока клетки этой группы постоянно (даже без инфекции) обнаруживаются во многих тканях. Сравнение тканевых NK-клеток и NK-клеток крови показало их различие: у первых на поверхности значительно больше молекул CD56, что коррелирует с повышенной киллерной способностью. Предполагается, что выход NK-клеток из кровотока способствует их морфологическим и функциональным перестройкам, подготавливающим к более вероятной, чем в кровотоке, встрече с патогенами. Тканевые NK-клетки не остаются в тканях при нормальном состоянии организма, а постоянно циркулируют по схеме ткань – лимфа – вторичные лимфоидные органы – кровоток – ткань, сохраняя при этом уже сформировавшиеся у них особенности тканевых естественных киллеров. Среднее количество циркулирующих в теле здорового взрослого человека NK-клеток – около 100 млн. При отсутствии инфекции единственной функцией их является обнаружение и уничтожение собственных клеток организма, перерождающихся в опухолевые, т. е. злокачественно измененные. Именно поэтому

NK-клетки раньше и рассматривали как специализированные клетки иммунологического противоракового надзора. Однако в настоящее время, начиная с конца 1990-х гг., все больше данных появляется в пользу их первоначального предназначения для борьбы с инфекционным началом на первой линии защиты.

При наличии вирусов в организме первые же инфицированные вирусом клетки начинают секретировать интерфероны первого типа, а именно IFNα и IFNβ. При связывании этих интерферонов со специальными рецепторами на NK-клетках в последних запускаются пролиферативные процессы и ограничивается миграция. При действии указанных интерферонов на возникающих при делении потомков исходной киллерной клетки происходит активация их способности вступать в контакт с клетками ткани, в которой они находятся. При этом взаимодействие со здоровой, не инфицированной вирусом клеткой не приводит к активации киллерных свойств, и время контакта оказывается минимальным. Если же клетка заражена вирусом, осуществляется жесткое закрепление NK-клетки на клетке-мишени за счет специализированных молекул адгезии CR3 и LFA-1. Причем в местах непосредственного соприкосновения мембран киллера и клетки-мишени скапливается значительное количество таких адгезивных молекул, и возникает так называемый иммунологический синапс, обеспечивающий как прочность удержания клеток в контакте, так и возможность более быстрого обмена информацией. При этом киллерная клетка получает как ингибирующие ее активность сигналы, обычно характерные для здоровой клетки, так и сигналы, стимулирующие киллерную активность. Только при преобладании последних NK-клетка приступает к работе. Внутри ее начинается перестройка мембранных образований, и к месту иммунологического синапса направляются элементы комплекса Гольджи, заполненные необходимыми для киллерного воздействия веществами. Слияние этих мембранных везикул с наружной цитоплазматической мембраной происходит только в пределах иммунологического синапса, что определяет направленность киллерного действия только на мембрану клетки-мишени и одновременно высокую степень воздействия на нее из-за высокой концентрации действующих агентов.

Такими агентами являются **гранулизины**, **перфорин** и **гранзимы** – белковые молекулы, заранее накапливаемые в азурофильных гранулах натуральных киллеров и способные при воздействии на эукариотическую клетку вызвать в ней процессы программируемой гибели (апоптоза). Гранулизины и перфорин (структурно схожий с белком С9 из системы комплемента) при секреции их в районе иммунологического цитотоксического синапса, объединяясь в кольцеподобные структуры, встраиваются в мембрану клетки-мишени, а гранзимы проникают через сформированные ими поры в цитоплазму. Из нескольких гранзимов (сериновых протеаз), секретируемых NK-клетками, наиболее эффективным индуктором апоптоза выступает гранзим В. Кроме белков из азурофильных гранул выделяются катехоламины (адреналин и норадреналин), гистамин, серотонин, гепарин, хондроитинсульфат. Все эти вещества в той или иной степени способствуют гибели инфицированной клетки. После этого киллер отделяется от мишени и может в дальнейшем повторить свои действия на новой зараженной вирусом клетке, а получившиеся в результате апоптоза останки клетки-мишени уничтожаются тканевыми макрофагами.

Важно, что в ходе таких контактов NK-клетки получают сигналы на выработку интерферонов первого типа – IFNα и IFNβ. Происходит это за счет имеющихся у них рецепторов TLR3, TLR7 и TLR8. Структура самих рецепторов и особенности передачи генерируемых ими внутриклеточных сигналов будет рассмотрена далее, здесь же отметим, что рецептор TLR3 специфически связывается с двунитевой вирусной РНК, рецепторы TLR7 и TLR8 – с однонитевыми вирусными ДНК.

Вырабатываемые NK-клетками интерфероны α и β способствуют активации как потомков ранее активированных киллеров, так и прибывающих из кровотока новых. Причем активирование первой линии защиты в месте вирусной инвазии поддерживается всеми возможными способами. Тканевые макрофаги, участвующие, как указывалось выше, в развитии воспалительной реакции, взаимодействуют и с естественными киллерами. Выработанные NK-клетками интерфероны активируют тканевые макрофаги, а те, в свою очередь, активируют NK-клетки. Один из вырабатываемых макрофагами провоспалительных цитокинов – IL-12 – даже получил специальное название – «NK-стимулирующий фактор». Он действует на вновь поступающие из кровотока NK-клетки, причем наиболее эффективно активация осуществляется при непосредственном контакте макрофага и киллера. При этом формируется сходный с описанным выше иммунологический синапс, возникающий при контакте с клеткой-мишенью, но его наличие здесь необходимо для локального воздействия выделяемого макрофагом интерлейкина именно на киллер. Локально возникающая высокая концентрация IL-12 стимулирует через соответствующие рецепторы и связанные с ними внутриклеточные молекулы продукцию киллером γ-интерферона. Этот интерферон второго типа является интерлейкином широкого спектра действия, но в данном случае он в первую очередь действует на находящиеся в непосредственной близости макрофаги, активируя их в конечном итоге на более эффективное уничтожение инфицированных вирусом клеток. Таким образом, имеет место взаимное усиление противовирусной деятельности двух различных клеточных факторов врожденного иммунитета – имеющих миелоидное происхождение макрофагов и NK-клеток, принадлежащих к лимфоидной группе лейкоцитов.

1.1.5. Система комплемента

Описанные выше процессы являются основными клеточными факторами конститутивной защиты, но еще на заре развития иммунологии было установлено, что лишенная клеток кровь (сыворотка) также обладает бактерицидными свойствами. Причем помимо открытых Эмилем фон Берингом и Шибасабуро Китасато относительно термоустойчивых белковых молекул, называемых антителами, в реализации бактерицидности сыворотки существенную роль играют термолабильные (теряющие активность при 56 °С) белки, названные Паулем Эрлихом комплементом, т. е. «дополнительными» белками. Дальнейшее их изучение, проведенное Жюлем Борде и его сотрудниками, показало, что эта фракция белков плазмы крови является как раз не дополнительной, а основной в разрушении чужеродных клеток и что антитела лишь стимулируют деятельность таких белковых молекул. С раз-

витием в XX в. методов выделения и очистки белков удалось показать, что комплемент представляет собой совокупность последовательно взаимодействующих при определенных условиях специфических протеинов, присутствующих в плазме крови млекопитающих изначально и постоянно, и что действие этих белков на любые чужеродные клетки практически одинаково, исходя из чего **систему комплемента** и рассматривают как отдельный конститутивный фактор защиты организма.

В настоящее время в систему комплемента включают 19 основных белков, условно разделяемых на группы в связи с их функциями (табл. 5). Это белки классического пути активации, белки альтернативного пути активации, белки атакующего мембрану комплекса и регуляторные белки системы комплемента.

Таблица 5

Белки системы комплемента

Белок	Группа	Масса, кДа	Количество, мкг/мл	Количество цепей
C1q	БЕЛКИ КЛАССИЧЕСКОГО ПУТИ	410	70	6 × 3
C1r		190	34	2
C1s		174	31	2
C2		117	25	1
C4		206	600	3
C3		195	1200	2 (α, β)
Фактор B	БЕЛКИ АЛЬТЕРНАТИВНОГО ПУТИ	93	225	1
Фактор D		23	1	1
Фактор P (пропердин)		220	25	4
C3b		85	Образуется из C3	2 (α', β)
C5	БЕЛКИ АТАКУЮЩЕГО МЕМБРАНУ КОМПЛЕКСА	180	85	2
C6		128	60	1
C7		120	55	1
C8		150	55	3
C9		79	60	1
C1EI	РЕГУЛЯТОРНЫЕ БЕЛКИ	105	180	1
C4bp		560	250	8
Фактор H (β1H)		150	500	1
Фактор I		90	34	2
Белок S		80	600	1

Все эти белки продуцируются и секретируются в плазму крови моноцитами и гепатоцитами (клетками печени), и их количества в норме постоянны для млекопитающих конкретных видов. Первую группу составляют шесть белков, обо-

значаемых заглавной латинской буквой С (от лат. *complement*) с соответствующим индексом: C1q, C1r, C1s, C2, C4, C3.

Наиболее сложным по строению и наиболее важным с точки зрения инициации активации системы комплемента по классическому пути является **белок C1q** (рис. 7).

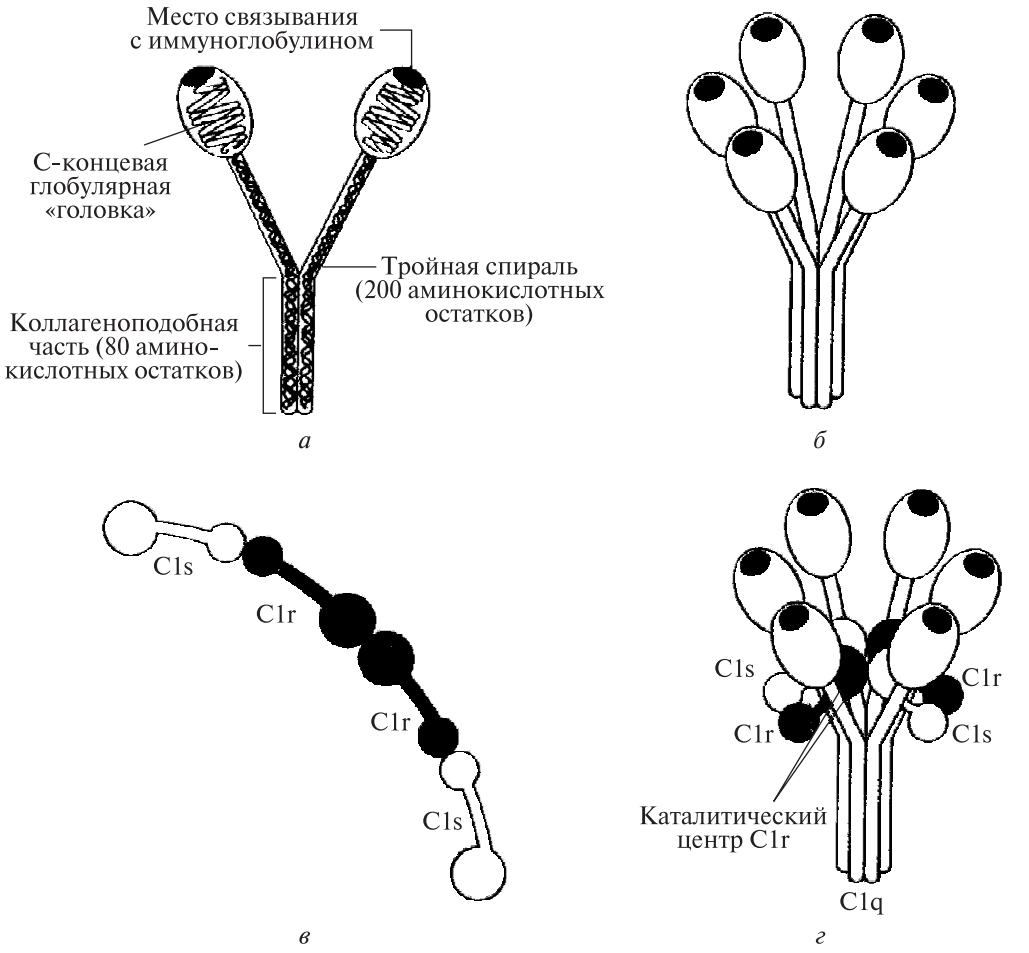


Рис. 7. Схематичное изображение структуры компонентов комплекса C1 и схема их сборки при активации:
а – субъединица C1q; *б* – интактный C1q; *в* – субъединица $(C1r)_2(C1s)_2$;
г – активированный C1 (по I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, 1989)

Его молекула представлена шестью одинаковыми субъединицами, каждая из которых состоит из трех различных (α, β, γ) белковых цепей. N-концевые участки трех цепей спирально закручиваются друг относительно друга подобно тому, как это имеет место в молекуле коллагена, а 78 аминокислотных остатков от N-конца обеспечивают объединение двух таких трехспиральных молекул с образованием парной субъединицы C1q.

Следующие 200 аминокислотных остатков представляют собой свободный «стеблеобразный» участок, заканчивающийся имеющим глобулярную структуру С-концевым доменом, в состав которого входит 103–108 аминокислот. Три такие парные субъединицы связываются друг с другом своими коллагенподобными участками, что и приводит к окончательному формированию четвертичной структуры белка C1q. Эта структура позволяет глобулярным участкам каждой из субъединиц свободно перемещаться в пространстве относительно жестко связанных N-концевых доменов, и тем самым создаются наиболее оптимальные условия для взаимодействия глобул с определенными сайтами тяжелых цепей иммуноглобулинов классов G и M.

Белок C1r состоит из двух одинаковых цепей по 95 кДа каждая, а **протеин C1s** – также из одинаковых, но имеющих массу 87 кДа цепей. Все обозначенные цифрой 1 белки в неактивном состоянии присутствуют в плазме крови по отдельности, но в ходе активации по классическому пути способны особым образом объединяться с образованием белка C1.

Хотя все остальные белки этой группы, естественно, важны, остановиться подробнее все-таки следует на **белке C3**. Он является ключевым для всех путей активации и состоит из двух полипептидных цепей – α и β, с массами 120 кДа и 75 кДа соответственно. В третичной структуре α-цепи присутствует удерживаемая дисульфидной связью петля, а не входящий в петлю домен соединяется дисульфидной связью с β-цепью. Особое значение в формировании свойств молекулы C3 имеет наличие образующейся за счет отщепления аммиака тиоэфирной связи между SH-группой и $CONH_2$-группой близко расположенных остатков цистеина и глутамина в α-цепи. При относительно незначительной молекулярной перестройке эта связь становится метастабильной, и входящая в ее состав карбонильная группа $-C^{+}=O$ в силу своего положительного заряда приобретает способность взаимодействовать с амино- и гидроксигруппами. Показано, что молекулярная перестройка, о которой идет речь, может осуществляться двояко.

При так называемой спонтанной активации C3 достаточно взаимодействия с молекулой воды, что и происходит с небольшой частью находящихся в плазме крови молекул C3. Дело в том, что упомянутая тиоэфирная связь находится внутри образованной α-цепью петли и недоступна для действия молекул растворителя, но в силу случайных структурных колебаний некоторые из молекул приобретают развернутую конформацию, и именно они переходят в активированное состояние, получая при этом наименование C3i.

Вторая возможность перехода молекулы C3 в активированное состояние заключается в ферментативном отщеплении небольшого фрагмента α-цепи, которое способны осуществлять C3-конвертазы всех трех путей активации системы комплемента. Удаление из C3-молекулы участка с массой 10 кДа, получившего название C3a, имеет такой же конечный эффект, как и описанное выше присоединение к тиоэфирной связи молекулы воды, – оставшийся фрагмент C3b также получает ярко выраженное сродство к амино- и гидроксигруппам.

Благодаря такому сродству C3i- и C3b-молекулы способны ковалентно связываться с большинством находящихся рядом белковых и углеводных молекул, т. е. фактически налипать на любые поверхности, что и происходит при попадании в плазму крови или тканевую жидкость чужеродных агентов органического проис-

хождения. Упоминавшаяся ранее опсонизация с участием C3b-молекул системы комплемента как раз и является проявлением такой способности. Следует отметить, что поверхность собственных клеток организма защищена от прикрепления своих же C3b-молекул, что позволяет избегать активации системы комплемента на их поверхности и предотвращать их опсонизацию, которая могла бы привести к разрушению собственных клеток фагоцитами. Факторы такой защиты будут охарактеризованы в разделе, описывающем регуляцию деятельности системы комплемента.

Белки альтернативного пути активации системы комплемента не обозначаются, очевидно в силу их более позднего открытия, буквой С и обычно именуются факторами – факторы B, D и P. Входящий в эту же группу белок C3b возникает, как указывалось выше, из белка C3.

Белки атакующего мембрану комплекса имеют традиционное наименование – это белки C5, C6, C7, C8 и C9. В отличие от большинства рассмотренных ранее белков других групп их участие в функционировании системы комплемента не приводит к появлению комплексов, обладающих ферментативной активностью, и сами они в ходе активации комплемента не подвергаются никакому ферментативному воздействию.

Группа **«Регуляторные белки системы комплемента»** включает в себя постоянно присутствующие в плазме крови молекулы (поэтому их называют растворимыми регуляторными белками), способные подавлять активность возникающих при активации системы комплемента комплексов. Таковыми являются: ингибитор C1-эстеразы (сокращенно C1E1, от англ. **C1 e**sterase **i**nhibitor), C4-связывающий белок (сокращенно C4bp, от англ. **C4**-**b**inding **p**rotein), фактор I (от англ. **i**nhibitor) и белок S (от англ. **s**oluble – растворимый, растворяющий), который также имеет второе название – «витронектин».

Помимо этих регуляторов системы комплемента есть мембрансвязанные регуляторные молекулы, которые собственно к системе комплемента не относятся. Характер их действия, так же как и растворимых регуляторных белков, будет рассмотрен далее после описания путей активации комплемента.

Несмотря на то что собственно система комплемента является, как упоминалось выше, конститутивным защитным механизмом и ее следует относить к факторам врожденного иммунитета, один из путей ее проявления связан с наличием у организма приобретенного иммунитета. Так называемый **классический путь активации системы комплемента** реализуется только в том случае, когда в организме уже имеются иммуноглобулины, комплементарно связывающиеся с антигенами попавших во внутреннюю среду чужеродных клеток. Объясняется это тем, что иммуноглобулины двух классов могут перевести белок C1q в активированное состояние. Для этого необходимо, чтобы как минимум две из шести глобулярных частей этого белка (см. рис. 7) специфически связались либо с C_H2-доменом иммуноглобулина G, либо с C_H3-доменом иммуноглобулина M. Причем чем большее количество иммуноглобулинсвязывающих сайтов в конкретной молекуле C1q будет задействовано, тем большей будет степень активации этой молекулы.

Следует отметить две обусловленные структурой взаимодействующих молекул особенности, важные для понимания того, почему комплемент активируется там, где это необходимо, а именно на поверхности чужеродной клетки. Во-первых, условно говоря, природа не зря сотворила C1q «шестиголовым» – это по-

зволяет запустить систему активации только при наличии в непосредственной близости друг от друга нескольких комплексов антиген – антитело, что, как правило, имеет место на поверхности чужеродной клетки. Вероятность же случайного сближения находящихся в жидкой фазе (в плазме крови или тканевой жидкости) нескольких иммунных комплексов крайне невелика, поэтому даже при высокой концентрации свободно движущихся комплексов антиген – антитело активации комплемента не происходит. Во-вторых, участки для связывания с белком C1q на молекуле иммуноглобулинов располагаются таким образом, чтобы оно могло осуществиться только после того, как иммуноглобулин провзаимодействует с комплементарным ему антигеном. Тем самым исключается активация системы комплемента свободными антителами.

Связывание двух и более глобулярных участков молекулы C1q придает ей активность сериновой протеиназы (эстеразы), субстратом для которой являются молекулы C1r. Катализируемая такой эстеразой реакция приводит к проявлению каталитических свойств у до этого момента неактивной молекулы C1r, причем активируются как минимум две молекулы. Две активные молекулы C1r соединяются и совместно с активной молекулой C1q осуществляют также активирование двух молекул C1s, которые объединяются между собой, затем с двумя молекулами C1r, и все вместе с молекулой C1q образуют новую сериновую протеиназу – активированный C1 (см. рис. 7). Для эффективного слияния всех перечисленных компонентов необходимо присутствие ионов Ca^{2+}.

Образовавшийся ферментный комплекс $C1q(C1r)_2(C1s)_2$ обычно называют **C1-эстеразой**, или **активированным C1**, и субстратом для него являются две молекулы из системы комплемента – C4 и C2 (см. табл. 5). Молекула C4, подобно описанной ранее молекуле C3, имеет располагающуюся в глубине третичной структуры тиоэфирную связь. Если такой белок оказывается рядом с поверхностью, на которой закреплен активированный C1, то он расщепляется последним на два фрагмента, в результате чего тиоэфирная связь обнажается. Меньший по размерам фрагмент, обозначаемый C4a, остается свободным, а больший, C4b, присоединяется к мембране клетки благодаря открывшейся тиоэфирной группе. Присоединение происходит крайне быстро, в течение нескольких миллисекунд, поэтому C4b оказывается в непосредственной близости от активированного C1 и, будучи рецептором для молекулы C2 из системы комплемента, обеспечивает связывание последней. Активированный C1 расщепляет связанную молекулу C2 также на два фрагмента, причем меньший из них, обозначаемый в данном случае C2b, отсоединяется и в дальнейшем в активации комплемента не участвует, а больший, C2a, остается связанным с молекулой C4b. Возникший комплекс C4bC2a представляет собой фермент, субстратом которого является молекула C3, поэтому его обычно называют **C3-конвертазой классического пути активации**.

Действие C3-конвертазы на молекулу C3 приводит к появлению небольшого фрагмента C3a, далее в активации комплемента не участвующего, и обладающего активной тиоэфирной группой фрагмента C3b, за счет которой этот фрагмент присоединяется к мембране рядом с уже существующим комплексом. В результате присоединения C3b субстратная специфичность комплекса изменяется, он приобретает способность расщеплять молекулу C5 и, соответственно, называется **C5-конвертазой классического пути**.

Поскольку иммобилизованный C3b обладает максимально высоким сродством к C5-белку, C5-конвертаза присоединяет к себе молекулу C5 и расщепляет ее на C5a и C5b. Меньший фрагмент, C5a, отсоединяется, а больший, C5b, остается в составе комплекса. Фактически с этого момента заканчиваются связанные с проявлением ферментативной активности этапы активации комплемента, и начинается завершающий этап – **формирование атакующего мембрану комплекса** (рис. 8).

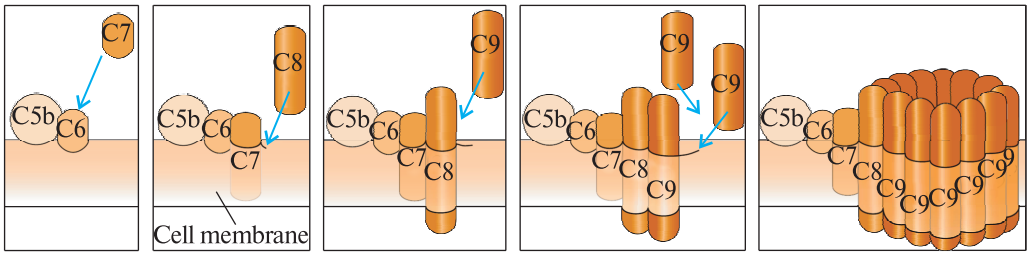


Рис. 8. Формирование атакующего мембрану комплекса (МАС) при активации комплемента (по 2013-KUBY Immunology)

Образовавшаяся молекула C5b обладает ярко выраженным сродством к следующей молекуле системы комплемента – белку C6, благодаря чему он также присоединяется к мембране. Сочетание C5bC6 представляет собой рецептор для молекулы C7, которая имеет в своем составе гидрофобный участок.

Благодаря его наличию присоединившаяся молекула C7 прочно закрепляет комплекс на поверхности мембраны и, кроме того, делает возможным присоединение к нему белка C8. Этот белок имеет еще более протяженный, чем у C7, гидрофобный домен, что позволяет ему насквозь пронизывать мембрану чужеродной клетки, и уже на этом этапе возможно образование в мембране узких, диаметром до 3 нм, пор, через которые в клетку начинают нерегулируемо проникать низкомолекулярные соединения и ионы. Наличие в составе комплекса белка C8 обеспечивает присоединение нескольких молекул C9 (в зависимости от вида млекопитающих количество присоединяющихся молекул колеблется от 6 до 20), которые формируют более широкую, 8–12 нм в диаметре, пору. Фактически из молекул C9 собираются полые цилиндры, прочно удерживающиеся в мембране из-за гидрофобности своей наружной поверхности и обеспечивающие направленный внутрь клетки мощный поток молекул воды и растворенных в ней ионов благодаря гидрофильности внутренней поверхности цилиндра. Показано, что даже наличие одного такого цилиндра в мембране клетки приводит к быстрому и необратимому возрастанию давления внутри клетки и наступающему вследствие этого разрыву мембраны. В этом и заключается **механизм литического действия системы комплемента**.

Активация этой системы может осуществляться и по другому пути. Первые сведения о наличии независимого от антител пути активации были получены в 1954 г. в лаборатории Луиса Пиллемера (Pillemer, 1908–1957). В проводимых им и его сотрудниками экспериментах было обнаружено, что обработка сыворотки крови млекопитающих зимозаном, препаратом, представляющим собой нерастворимую в воде фракцию клеточных стенок дрожжей, приводит к исчезновению из соста-

ва сыворотки белка С3 при сохранении исходных количеств белков С1, С2 и С4. Это позволило Пиллемеру и соавторам предположить наличие иного, независимого от присутствия антител, пути активации. Однако в 1957 г. появились сведения, что у некоторых видов млекопитающих в плазме крови присутствуют имеющиеся от рождения (так называемые нормальные) антитела к зимозану, и эксперименты Пиллемера посчитали лишь подтверждением уже описанного пути активации. Но в 1964 г. были обнаружены морские свинки, у которых вследствие генетического дефекта отсутствует белок С4, и тем не менее в сыворотке их крови чужеродные клетки лизируются под воздействием комплемента. Это стимулировало интерес исследователей, и в течение 1970-х гг. были выявлены ранее неизвестные белки системы комплемента и описан новый путь активации, получивший название альтернативного, а открытый ранее путь стали именовать классическим.

Ключевым соединением **альтернативного пути активации** оказался уже хорошо к тому времени изученный белок С3. Как упоминалось выше, небольшая часть его молекул в силу случайных конформационных перестроек может переходить в активное состояние С3i за счет взаимодействия с молекулами воды. Если молекула С3i оказывается рядом с фактором В и здесь же присутствуют ионы Mg^{2+}, то молекулы объединяются ковалентно благодаря наличию в С3i активной тиоэфирной группы. Возникшее сочетание является субстратом для еще одного соединения альтернативного пути активации – фактора D. Эта протеиназа отщепляет небольшой фрагмент Ba от фактора B, придавая тем самым возникшему комплексу C3iBb ферментативную активность. Субстратом для такого первоначально образующегося фермента является нативный белок С3, поэтому он и получил название жидкофазной С3-конвертазы альтернативного пути активации. Под действием этого фермента, работающего так же, как и С3-конвертаза классического пути, появляются молекулы С3a и С3b. Благодаря этому в плазме крови постоянно образуется небольшое количество обладающих сродством к чужеродным поверхностям С3b-молекул. Большая часть находящихся в жидкой фазе таких молекул тут же гидролизуется и тем самым инактивируется. Но если рядом есть чужеродная поверхность, то С3b-молекулы успевают провзаимодействовать с ней, и тем самым запускается собственно активация по альтернативному пути.

Фиксированные на поверхности чужеродной клетки молекулы С3b присоединяют фактор В, тот, будучи фиксированным, подвергается атаке фактора D, и так появляется твердофазная С3-конвертаза альтернативного пути – C3bBb. Подобно С3-конвертазе классического пути эта С3-конвертаза может легко превратится в С5-конвертазу, для чего достаточно присоединения к ней еще одной молекулы С3b. Образовавшийся комплекс $(C3b)_2Bb$ обладает С5-конвертазной активностью, однако является нестабильным и легко диссоциирует. Стабилизирует его присоединение еще одного белка альтернативного пути активации – фактора Р, известного как пропердин. Сформировавшийся комплекс $(C3b)_2BbP$ действует на белок С5, и все дальнейшие события (образование атакующего мембрану комплекса и лизис чужеродной клетки) происходят в той же последовательности, что и после активации по классическому пути.

Следует отметить, что часть образующихся при действии С3-конвертазы молекул С3b может взаимодействовать с фактором В и тем самым вызывать каскадное нарастание активации по альтернативному пути (подобного рода эффект некоторые

авторы называют петлей усиления), а если в организме одновременно реализуются оба пути активации, то усиливать и классический путь, способствуя формированию характерной уже для него С5-конвертазы. Дальнейшие события фактически ничем не отличаются от уже описанных для классического пути, что позволяет изобразить активацию комплемента по обоим вышеописанным путям одной схемой (рис. 9).

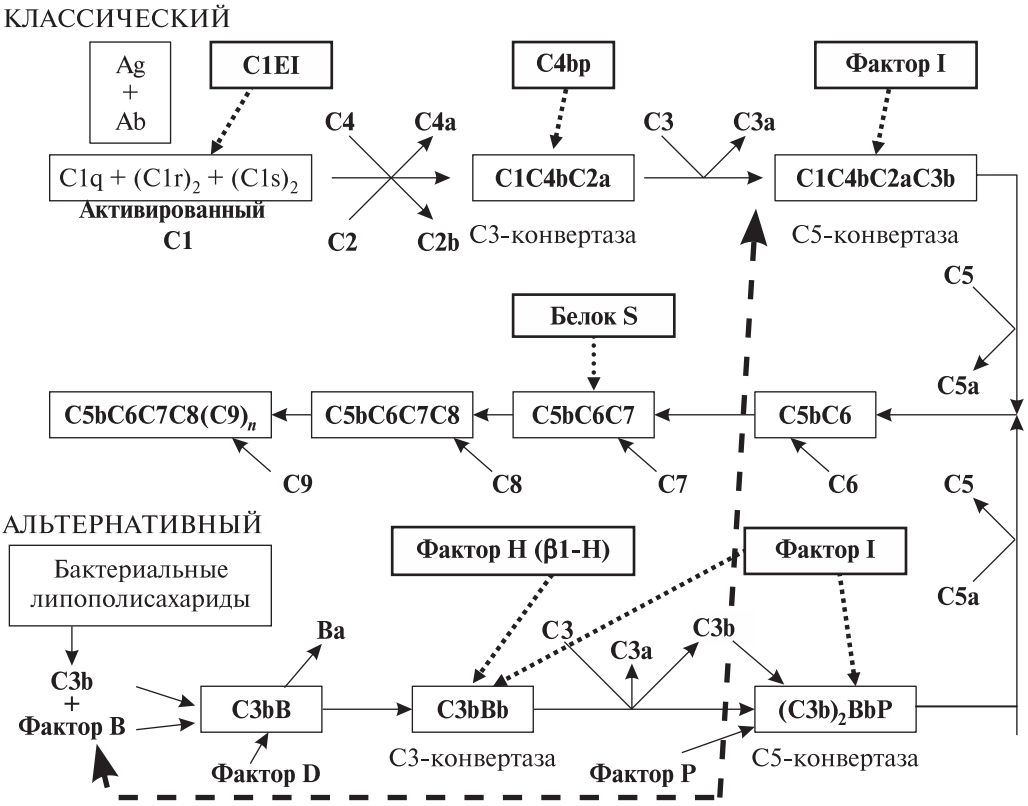


Рис. 9. Схема основных путей активации системы комплемента

Сравнение двух основных путей активации системы комплемента показывает, что общая схема не имеет существенных отличий, а участвующие в активации на сходных этапах белки близки по аминокислотному составу. Из наиболее выраженных отличий можно подчеркнуть зависимость первых этапов классического пути от присутствия ионов Ca^{2+}, тогда как для реализации начальных этапов альтернативного пути более существенными оказываются ионы Mg^{2+}.

Большинство авторов склонны считать, что открытый позже альтернативный путь активации имеет более раннее эволюционное происхождение, поскольку является чисто конститутивным, врожденным фактором защиты внутренней среды организмов от проникновения чужеродных клеток. Классический же путь, вероятно, появился как результат эволюционного развития приобретенного иммунитета и отличается от альтернативного в большей степени выраженной направленностью на чужеродные объекты, так как определяется связыванием антигенов с антителами, которое гораздо более специфично, чем сорбция молекул С3b.

Каким образом шло формирование этого более точного по воздействию пути активации, пока неясно, но открытый в конце XX в. **лектиновый путь активации комплемента** можно в какой-то мере рассматривать как один из этапов такого формирования.

Как сейчас установлено, белок C1q по своей аминокислотной последовательности относится к семейству кальцийзависимых лектинов, называемых коллагеновыми лектинами, или коллектинами. Представителем этого семейства является также маннозосвязывающий белок (МСБ), присутствующий в небольших количествах в плазме крови и в более значительных – при воспалении (см. раздел «Воспаление»). Показано, что он может связываться с маннозными группами в липополисахаридных молекулах наружной мембраны некоторых бактерий и при этом так изменять свою конформацию, что она становится пригодной для взаимодействий с двумя лектин-ассоциированными сериновыми протеиназами, близкими по аминокислотному составу белкам C1r и C1s. Объединение этих двух протеиназ и МСБ приводит к появлению комплекса, аналогичного по действию активированному C1, и все дальнейшие события проходят по описанному для классического пути механизму.

Понимание того, каким именно путем комплемент оказывает воздействие на клетку, неминуемо ставит вопрос о регуляции этого процесса. Поскольку все пути активации обязательно включают связанные с ферментативным воздействием этапы, длительное сохранение активности формирующихся при активации ферментов было бы явно нежелательно для организма, так как приводило бы к нерациональному, избыточному расходованию компонентов системы. И действительно, каждый из ферментативных этапов активации подвержен контролю, для чего в плазме крови присутствуют специализированные молекулы. На рис. 9 они схематично изображены в прямоугольных рамках над этапами, на которые они действуют.

Первый этап активации системы комплемента по классическому пути контролируется белком C1EI – ингибитором C1-эстеразы, или серпином. Этот сывороточный белок способен связывать и инактивировать субъединицы C1, а именно C1r и C1s, не допуская тем самым образования избыточных количеств активированного C1.

Следующий этап – формирование C3-конвертазы – и в классическом, и в альтернативном путях также находится под контролем сывороточных белков. Появлению избыточных количеств C3-конвертазы классического пути препятствует C4-связывающий белок (сокращенно C4bp, от англ. **C4 b**inding **p**rotein), конкурирующий с C1-эстеразой в плане присоединения C4 и способный, кроме того, вытеснять C2a из уже сложившихся комплексов C4bC2a. Помимо этого белок C4bp может играть роль кофактора для ингибитора C5-конвертаз обоих путей активации – фактора I.

Хотя основной точкой приложения для фактора I являются комплексы C4bC2aC3b и $(C3b)_2Bb$ (т. е. C5-конвертазы обоих путей), при наличии кофакторов C4bp и фактора H он способен вызывать диссоциацию и обладающих C3-конвертазной активностью комплексов. Собственно действие фактора I заключается в расщеплении иммобилизованного C3b, которое он осуществляет в трех участках молекулы.

Кроме описанных выше сывороточных ингибиторов обнаружены специфические мембранные молекулы, препятствующие активации комплемента на поверхности собственных клеток организма. Таковыми являются:

1) фактор, ускоряющий диссоциацию (сокращенно ФУД, или в англ. аббревиатуре DAF от **d**ecay-**a**ctivating **f**actor), по современной номенклатуре поверхностных белков обозначаемый как CD55;

2) рецептор комплемента первого типа CR1 (он же CD35);

3) мембранный кофакторный белок (сокращенно МКБ, или в англ. аббревиатуре MCP от **m**embrane **c**ofactor **p**rotein), он же CD46.

Показано, что DAF и CR1 препятствуют связыванию C2 с C4b и способны вытеснять C2a из уже существующих комплексов C4bC2a, а CR1 и MCP проявляют себя как кофакторы для инактивирующего действия фактора I. Аналогично действуют эти мембранные регуляторы и при образовании C3-конвертазы в альтернативном пути активации. О значении регуляторных белков можно судить по описанным медиками патологическим состояниям, связанным с наследственными дефицитами регуляторных белков. При отсутствии у человека белка C1EI проявляется ангионевротический отек, вызываемый избыточными количествами C4a и C3a, но при этом не происходит истощения сыворотки по основным белкам комплемента, поскольку срабатывает регуляция на следующих этапах. При отсутствии же фактора I наблюдается полное истощение сыворотки крови по белку C3, так как он при запуске активации системы комплемента весь превращается в белок C3b благодаря упоминавшейся ранее петле усиления.

Следует отметить и механизмы защиты от уже начавших формироваться атакующих мембрану комплексов, поскольку при активации комплемента возможно осаждение гидрофобных сочетаний C5bC6C7 на поверхности собственных клеток организма. Сывороточным регулятором этого этапа является белок S, или витронектин, присоединение которого лишает комплекс способности удерживаться на мембране.

Известны также два мембранных регулятора: молекула CD59 **(протектин)** и фактор гомологичной рестрикции (сокращенно ФГР, или в англ. аббревиатуре HRF от **h**omologous **r**estriction **f**actor). Белок CD59 связывается с почти готовым мембранатакующим комплексомC5bC6C7C8, присоединяясь к белку C8 и блокируя тем самым внедрение молекул C9 в мембрану. ФГР с меньшей эффективностью, чем CD59, ограничивает внедрение в мембрану C9-белка.

Два названных мембранных регулятора были описаны при изучении действия системы комплемента на лишенные ядер клетки (эритроциты), которые синтезируют эти белки предварительно, еще до контакта с атакующими мембрану комплексами. При анализе же действия комплемента на имеющие ядра клетки выявлена непосредственная реакция на формирующиеся на поверхности комплексы C5bC6C7C8, проявляющаяся в активном удалении подвергающихся воздействию участков мембраны либо путем эндоцитоза, либо путем экзоцитоза, но подробности такого рода защиты пока не исследованы.

Несмотря на то что комплемент исследуется уже более 100 лет, полное значение этой конститутивной защитной системы, вероятно, еще не установлено. По мере изучения других иммунологических реакций выяснялась причастность

комплемента к целому ряду событий, что позволяет говорить о его более широком биологическом действии, чем просто об уничтожении имеющих клеточное строение патогенов (рис. 10).

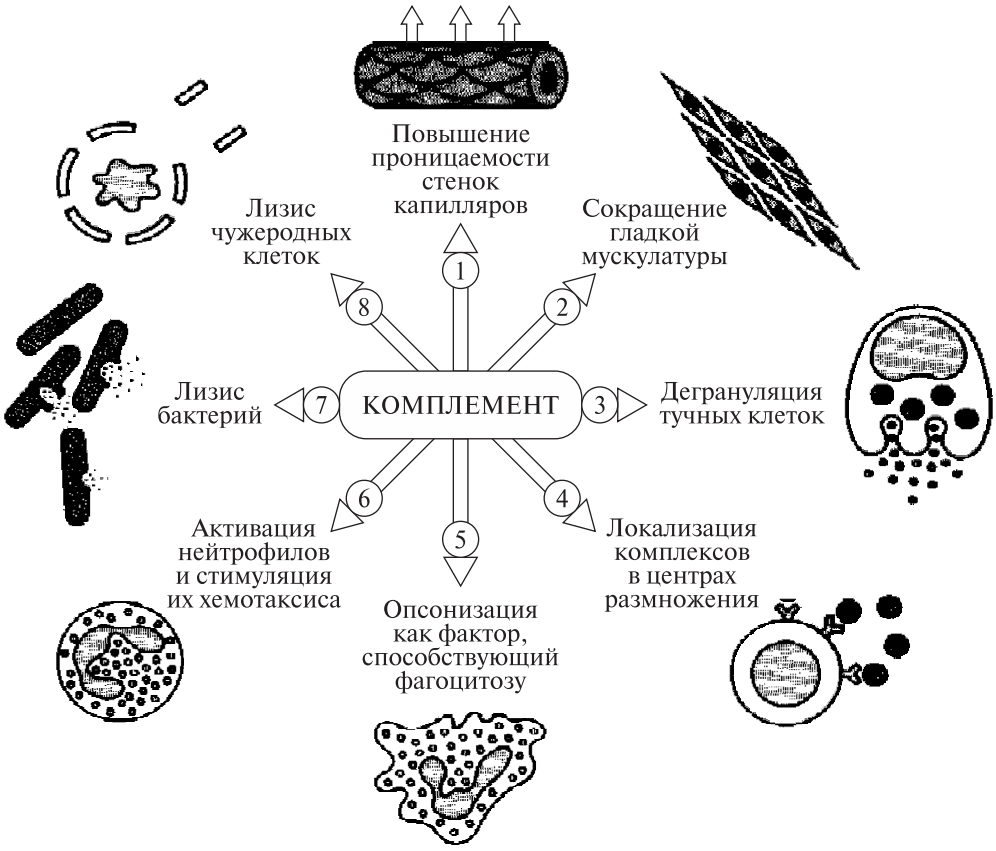


Рис. 10. Основные активности системы комплемента (по I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, 1989)

Имеются четкие доказательства влияния комплемента на другие конститутивные защитные факторы, в частности на фагоцитоз. О значении молекул C3b как опсонинов упоминалось выше, но следует подчеркнуть, что наличие у фагоцитирующих клеток специфических рецепторов для образующихся в ходе активации фрагментов C4a, C3a и C5a является основой для хемотаксического обнаружения фагоцитами чужеродных клеток. Повышение концентрации этих хемоаттрактантов служит сигналом для направленного перемещения нейтрофилов и макрофагов к местам локализации чужеродных агентов и, кроме того, активирует эти и другие фагоцитирующие клетки, стимулируя реакции кислородного взрыва и процессы дегрануляции.

Присоединение молекул C4a, C3a и C5a к рецепторам базофилов и тучных клеток также способствует дегрануляции последних, что существенно ускоряет развитие воспалительной реакции в местах внедрения чужеродных объектов. По-

мимо такого опосредованного тучными клетками усиления воспалительной реакции проявляется и прямое действие молекул C5a как медиатора воспаления – под влиянием названного белка происходят изменения в сокращении клеток гладкой мышечной ткани в стенках кровеносных сосудов и повышается проницаемость стенок капилляров для клеток и молекул. Именно благодаря этим эффектам такие соединения комплемента получили название **анафилатоксинов**, т. е. веществ, усиливающих воспалительную и анафилактическую реакции. Последняя является индуцибельной защитной реакцией (проявлением гиперчувствительности немедленного типа), и тем самым наглядно проявляется еще одна связь комплемента как фактора врожденного иммунитета с факторами приобретенного иммунитета (другая из таких связей уже упоминалась выше и заключается в участии иммуноглобулинов в активации комплемента по классическому пути).

Влияет комплемент и на развитие одной из главных реакций приобретенного иммунитета – иммунного ответа на тимусзависимые антигены. Показано, что соединения комплемента облегчают прикрепление антигенов к поверхности В-лимфоцитов и антигенпредставляющих клеток (на их поверхностях также имеются рецепторы для белков комплемента) и, кроме того, способствуют локализации иммунных комплексов в герменативных центрах лимфатических узлов, что важно для развития В-клеток иммунологической памяти.

Описанные в предыдущих разделах процессы конститутивной защиты организма (врожденного иммунитета) длительное время рассматривались иммунологами как явления, не обладающие высокой степенью специфичности в отношении действующего на организм фактора. Однако, благодаря успехам молекулярной биологии, в конце XX – начале XIX в. такой взгляд на врожденный иммунитет пришлось существенно изменить. К настоящему времени установлено, что и первая линия защиты внутренней среды от вторжения чужеродных агентов базируется на тесном взаимодействии специализированных клеток иммунной системы, основанном на специфическом узнавании определенных сигналов. В связи с этим даже в коротком курсе иммунологии нельзя не остановиться на рассмотрении рецепторных систем микро- и макрофагов и соответствующих им внутриклеточных путей передачи информации.

2 ВОСПРИЯТИЕ И ПЕРЕДАЧА ИНФОРМАЦИИ В ПРОЦЕССАХ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

Иммунная система возникла и развивалась в ходе эволюции многоклеточных организмов для удаления из внутренней среды дестабилизирующих ее постоянство агентов. В отличие от выполняющей сходную функцию выделительной системы, специализированной на удалении постоянно образующихся в процессах жизнедеятельности клеток своего же организма конечных продуктов метаболизма, иммунная система должна распознавать не несколько десятков молекул, а существенно большее число нарушающих гомеостаз веществ. Сформировавшееся благодаря молекулярной биологии понимание того, что любое распознавание на клеточном уровне базируется на непосредственном взаимодействии узнаваемой и узнающей молекул, поставило перед иммунологами определенную проблему. С одной стороны, накопленные во второй половине XX в. факты указывали на то, что клетки врожденного иммунитета способны активироваться в ответ на воздействие множества разнородных агентов, количество которых явно превышало даже теоретически возможное число рецепторов на поверхности одной клетки. С другой стороны, к этому времени было известно, что в системе приобретенного иммунитета эта проблема решается на основе индивидуальной специфичности клеток лимфоидной системы по набору распознающих чужеродные агенты рецепторов и создания за счет разнообразия таких клеток в организме общего распознающего чужое репертуара. Однако у клеток врожденного иммунитета такая индивидуальная специфичность не обнаруживалась. Это и привело к мысли, что лейкоциты первой линии защиты организма должны распознавать не отдельный чужеродный агент, а какие-то общие черты различных чужеродных агентов.

Основанную на таких взглядах концепцию в общем сформулировал в последней четверти XX в. американский иммунолог Чарльз Джанеуэй (Janeway, 1943–2003). Она включает два главных положения: 1) врожденный иммунитет базируется на специфическом распознавании не конкретных антигенов, а так называемых образов патогенности; 2) реакции приобретенного иммунитета (иммунный ответ) запускаются только на базе уже активированного врожденного им-

мунитета и дополняют его действие специфическим ответом только на данный конкретный антиген. К настоящему времени эти два положения подтверждены рядом полученных с помощью современных методов исследования экспериментальных доказательств, и одним из них является открытие специальных рецепторов клеток врожденного иммунитета.

Прежде всего речь идет о рецепторах, способных связываться с различными, но обладающими общими чертами строения молекулами, которые имеются у большинства патогенных микроорганизмов и отсутствуют в организмах высших животных. Такие молекулы Ч. Джанеуэй и предложил рассматривать как условные **образы патогенности** (в англ. написании **Pathogen-associated molecular patterns**, сокращенно **PAMP**), в силу чего способные с ними специфически связываться рецепторы получили название **PRRs** (сокращение от англ. **P**attern-**r**ecognizing **r**eceptors – рецепторы, распознающие образ).

Часть таких рецепторов, открытых в 1997 г. непосредственно Ч. Джанеуэем и работающим в США выпускником Московского государственного университета Русланом Меджитовым, узбеком по национальности, получили название **«толл-подобные рецепторы»** (от англ. **T**oll-**l**ike **r**eceptors, сокращенно **TLR**). Термин происходит от сходства этой группы рецепторов на лейкоцитах человека с открытыми в 1980-х гг. толл-рецепторами клеток плодовой мушки дрозофилы, от которых зависит правильное распределение клеток насекомого в период эмбрионального развития. Установленный в 1996 г. факт зависимости резистентности взрослых дрозофил к грибковым заболеваниям от нормального состояния кодирующих такие рецепторы генов, а также сходство одного из доменов этих рецепторов с определенным доменом рецептора для IL-1 стали основанием для поиска подобных генов и их продуктов у человека, что и проделали Ч. Джанеуэй и его коллеги.

В последующие годы было установлено, что у млекопитающих имеется 13 разновидностей толл-подобных рецепторов. Причем у мышей и человека рецепторы от TLR1 до TLR9 совпадают (табл. 6), рецептор TLR10 у мышей отсутствует, поскольку кодирующий его ген является псевдогеном, но есть не обнаруженные у человека TLR11, TLR12 и TLR13.

Отличительными чертами всех рецепторов этой группы являются их димерная структура и большое количество остатков лейцина во внеклеточных доменах, предназначенных для связывания с PAMP. Содержащие лейцин последовательности состоят из 24–29 аминокислотных остатков и имеют обязательный участок xxLxLxL, где L – лейцин, x – остатки любых других аминокислот. Кроме того, в пределах этой же последовательности, но уже в произвольном порядке располагаются еще 4–6 остатков лейцина. В пределах внеклеточного домена TLR такие последовательности повторяются от 19 до 25 раз, из-за чего эти домены получили название LRR-доменов (от англ. **L**eucine-**r**ich **r**epeats). Для эффективного связывания с PAMP два таких домена должны располагаться в непосредственной близости друг от друга, что и определяет димерную структуру рецептора в целом. Причем образовывать димер могут как две одинаковые молекулы (получается гомодимер), так и сочетания двух разных молекул (формируется гетеродимер).

Большинство гетеродимеров образуется с участием TLR2, и здесь возможны три сочетания – TLR2/TLR1, TLR2/TLR6 и TLR2/TLR10, но также обнаружен и гетеродимер TLR1/TLR10. Остальные толл-подобные рецепторы функционируют как гомодимеры.

Таблица 6

Характеристика толл-подобных рецептов человека

Рецептор	Форма существования	Узнаваемые рецептором PAMP	Патогены – носители данных PAMP	Клетки, обладающие данным рецептором
TLR1	Гетеродимер TLR2/TLR1	Триациллипопептиды, пептидогликан, тейхоевые кислоты, липотейхоевые кислоты, зимозан, липоарабиноманнан, порин, фосфатидилсерин	Грамположительные бактерии, грибы, микобактерии, спирохеты, трипаносомы, нейссерии, лептоспиры, цитомегаловирус, шистосомы	Моноциты, дендритные клетки, тканевые макрофаги, эозинофилы, базофилы, тучные клетки
TLR2	Гетеродимер TLR2/TLR1			
TLR3	Гомодимер	Двунитевые молекулы РНК	Вирусы	NK-клетки
TLR4	Гомодимер	Липополисахариды (эндотоксины) грамотрицательных бактерий, липотейхоевая кислота, таксол, флаволипин, F-белок респираторно-синцитиального вируса, фимбрии 1-го и P-типа	Грамотрицательные бактерии, респираторно-синцитиальный вирус (RSV), грибы	Макрофаги, дендритные клетки, эозинофилы, тучные клетки
TLR5	Гомодимер	Флагеллин	Имеющие жгутики бактерии	Клетки эпителия кишечника
TLR6	Гетеродимер TLR2/TLR6	Все, что узнает TLR2/TLR1 + диациллипопептиды	Как для TLR2/TLR1	Те же, что TLR2/TLR1
TLR7	Гомодимер	Однонитевая вирусная РНК	Вирусы	Плазмацитоидные дендритные клетки, NK-клетки, эозинофилы, B-лимфоциты
TLR8	Гомодимер	Однонитевая вирусная РНК	Вирусы	NK-клетки
TLR9	Гомодимер	ДНК, богатая неметелированными сочетаниями CpG; динуклеотиды, компоненты герпесвирусов, гемозолин	Любые бактерии, некоторые герпесвирусы, малярийный плазмодий	Плазмацитоидные дендритные клетки, эозинофилы, базофилы, B-лимфоциты
TLR10	Гетеродимер TLR1/TLR10 или TLR2/TLR10	Не известны	Не известны	Плазмацитоидные дендритные клетки, эозинофилы, базофилы, B-лимфоциты

Очень важно, что толл-подобные рецепторы располагаются как на наружной поверхности клеток, так и в мембранах лизосом фагоцитирующих клеток (рис. 11).

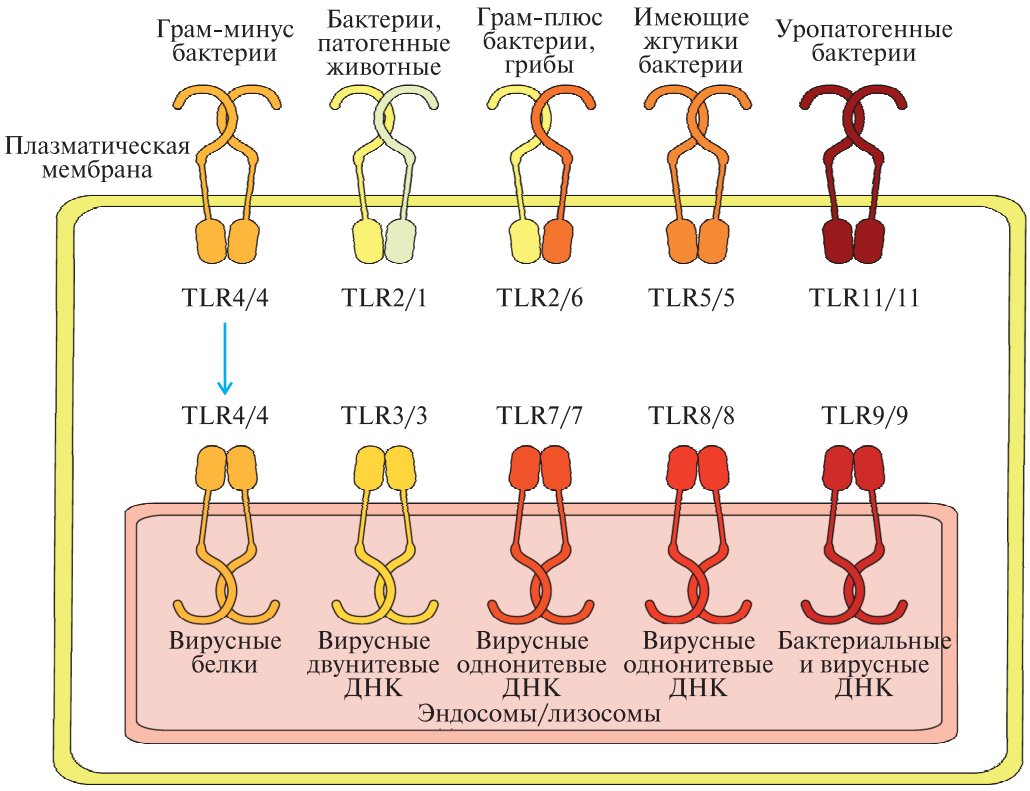


Рис. 11. Локализация толл-подобных рецепторов и узнаваемые ими патогены и образы патогенности (по 2013-KUBY Immunology)

Причем специализация рецепторов вполне логично сочетается с их расположением: рецепторы, направленные во внешнюю среду, реагируют с секретируемыми патогенами веществами или молекулами, находящимися на поверхности их клеток, а рецепторы, направленные в пространство фаголизосом, – с продуктами деградации патогенов, которые освобождаются в процессе разрушения микроорганизмов из их клеток или вирусных частиц. Следует отметить, что рецептор TLR4 обнаружен как в мембранах лизосом, так и на наружной цитоплазматической мембране.

Существенно, что распознающий репертуар толл-подобных рецепторов достаточно широк. В совокупности они позволяют клеткам иммунной системы улавливать присутствие чужеродных веществ, сочетающих в себе липидные, полисахаридные, белковые и нуклеиновые компоненты.

Сейчас известно, что толл-подобные рецепторы предназначены не только для распознавания ассоциированных с патогенами молекулярных образов. Показано, что они связывают и ряд веществ, образующихся при повреждениях и гибели клеток по пути некроза, а не апоптоза. Такие вещества в последние годы называют **аларминами** (от англ. alarm – тревога), а по аналогии с PAMP их обозначают как

DAMP (от англ. **D**anger-**a**ssociated **m**olecular **p**atterns – **ассоциированные с опасностью молекулярные образы**). Следует отметить, что еще одной встречающейся в литературе расшифровкой аббревиатуры DAMP является **D**amage-**a**ssociated **m**olecular **p**atterns (молекулярные образы, ассоциированные с повреждением), поскольку освобождение тканей от остатков разрушенных каким-либо воздействием клеток также осуществляется фагоцитирующими клетками, которые активируются за счет распознавания выделившихся при гибели клеток веществ.

В качестве одного из примеров аларминов можно рассматривать белок HMGB1 (от англ. **H**igh **m**obility **g**roup **b**px**1**). В норме в клетке он является связанным с хроматином негистоновым белком, который в период клеточного стресса может секретироваться клеткой наряду со специализированными стрессовыми белками, известными как белки теплового шока HSP (сокращение от англ. **H**eat **S**hock **P**roteins) – HSP20, HSP40, HSP60, HSP70, HSP96. Эти алармины способны улавливаться толл-подобными рецепторами клеток иммунной системы и активировать их подобно PAMP. В частности, HMGB1, HSP70, HSP96 связываются с гетеродимерами TLR2/TLR1 и TLR2/TLR6, а также с гомодимером TLR4/TLR4. Другие расположенные в мембранах фаголизосом TLR взаимодействуют с фрагментами РНК и ДНК в сочетании с хроматиновыми белками, т. е. фактически регистрируют фагоцитирование макрофагами и уничтожение ими апоптозных остатков собственных клеток как сигналы опасности. Вероятно, такое использование толл-подобных рецепторов следует рассматривать как дополнительную возможность фиксировать воздействие на организм патогенов не только напрямую, но и косвенно.

Кроме толл-подобных рецепторов к рецепторам, распознающим PAMP, относятся также **С-лектиновые рецепторы**. В широком смысле С-лектинами называют белки, способные связываться с определенными последовательностями углеводных остатков, присутствующими в различных сложных по составу молекулах. Поскольку такие углеводсодержащие вещества имеются на поверхностях практически всех патогенов клеточного строения и многих вирусов, связывание с ними расположенных на мембране клеток иммунной системы миелоидного ряда (моноцитов, макрофагов, дендритных клеток, нейтрофилов) С-лектинов резонно рассматривать как распознавание патогенов. Ранее считалось, что С-лектины фагоцитов необходимы им только для стимулирования фагоцитоза, однако в настоящее время с ними связывают также активацию клеток на продукцию цитокинов.

Для человека к 2013 г. были определены 15 С-лектиновых рецепторов, которые функционируют как PRR. Большинство из них узнают одну или несколько углеводных последовательностей. Например, рецептор дендритных клеток, называемый DC-SIGN (от англ. **D**endritic **C**ell-**S**pecific **I**ntercellular adhesion molecule-3-**G**rabbing **N**onintegrin), связывает углеводы как с остатками маннозы, так и с остатками фукозы, тогда как манозный рецептор только с остатками маннозы, Dectin-1 – только с компонентами β1,3-глюкана, а Dectin-2 – только с остатками фукозы. При этом они по определенным сигнальным путям активируют в фагоцитирующей клетке осуществление кислородного взрыва и синтез провоспалительного цитокина IL-1β.

Помимо мембрансвязанных патогенраспознающих рецепторов описаны и локализованные в цитоплазме клеток, из-за чего их называют также **растворимыми PRR**. К таковым относят **рецепторы семейства RLRs** (от англ. **R**etinoic acid-inducible

gene-I-**l**ike **r**eceptors) и **рецепторы семейства NLRs** (от англ. **n**ucleotide oligomerization domain-**l**ike **r**eceptors).

К первым относят три молекулы – RIG-I, MDA5 и LGP2. Белок RIG-I (от англ. **r**etinoic-acid-**i**nducible **g**ene 1 protein **1**), также известный как белок Ddx58, и белок MDA5 (от англ. **m**elanoma-**d**ifferentiation-**a**ssociated gene **5**, его еще называют Ifih1, или Helicard) являются CARD-содержащими РНК-хеликазами, распознающими двунитевую РНК, характерную для определенных этапов репродукции ряда вирусов, в том числе высокоопасных (вирус Сендай, вирус ньюкаслской болезни, вирус бешенства, вирус японского энцефалита, вирус везикулярного стоматита, вирус кори и др.). Показано, что RIG-I преимущественно связывает короткие фрагменты двунитевых РНК, а MDA5 – длинные.

Имеющиеся в этих ферментах домены CARD (от англ. **ca**spase **r**ecruitment **d**omain) определяют их способность запускать внутриклеточные сигнальные пути, приводящие в конечном итоге к продукции интерферонов и цитокинов. Белок LGP2 (от англ. **L**aboratory of **G**enetics and **P**hysiology 2) близок по своим свойствам к белку RIG-I, но не имеет в своем составе CARD-участков, поэтому считается, что он служит негативным регулятором активации, осуществляемой через рецепторы семейства RLRs.

Растворимые рецепторы семейства NLRs в совокупности узнают почти весь набор внутриклеточных PAMP и DAMP за счет своей многочисленности и разнообразия: в геноме человека найдено 23 гена, кодирующих белки этого семейства, а в геноме мыши – 34. NLR-белки разделены по структуре на три группы: 1) имеющие CARD; 2) имеющие BIR-домен (от англ. **b**aculovirus **i**nhibitory **r**epeat); 3) имеющие PYD (от англ. **py**rin **d**omains).

Лучше всего пока охарактеризованы представители первой группы – белки NOD1 и NOD2 (от англ. **n**ucleotide-binding **o**ligomerization **d**omain – домен, связывающий олигомеризованные нуклеотиды). Кроме давшего им название домена в этих белках содержится рецепторный участок, позволяющий присоединять мурамилдипептиды, образующиеся при распаде или синтезе муреина. В присутствии в цитоплазме клеток этих PAMP белки NOD1 и NOD2, благодаря имеющемуся у них CARD, запускают сигнальные пути, приводящие к синтезу провоспалительных цитокинов TNF-α, IL-1 и IL-6, что служит ответной реакцией на присутствие бактерий и таких простейших, как трипаносома. Воздействие на клетки вирусов, включая вирус гриппа, также детектируется белком NOD1, что приводит в конечном итоге к образованию интерферонов α и β.

Как установлено в последнее время, не все NLRs запускают стандартные сигнальные пути, ведущие к активации транскрипции генов врожденного иммунитета. Часть относимых к семейству молекул непосредственно участвуют в формировании защитных комплексов, называемых **инфламмасомами**. Их наличие было зафиксировано в 2002 г. при воздействии на фагоцитирующие клетки бактериальных липополисахаридов в ходе исследований, целью которых было выяснение путей образования провоспалительного цитокина IL-1. К этому моменту уже было известно, что при экспрессии кодирующего IL-1 гена сначала синтезируется больший по размерам белок-предшественник, который подвергается действию специфической протеазы ICE (от англ. **I**L-1 **C**onverting **E**nzyme), превращающей предшественника в зрелый интерлейкин. Именно эта протеаза теперь называет-

ся каспаза-1 и является одной из наиболее известных протеаз, задействованных в реализации защитных механизмов.

Исследования, о которых идет речь, показали, что для эффективного процессирования предшественника IL-1 (а теперь известно, что и еще одного сильного провоспалительного цитокина IL-18) необходимы мультимерные белковые комплексы, включающие в себя 10 или 14 молекул каспазы-1. Кроме каспазы-1 в такой комплекс обязательно входят молекулы из семейства NLRs: либо NLRP1, либо NLRP3, либо NLRC4, которые с помощью молекул вспомогательного белка ASC (в случае участия NLRP1 или NLRP3) или же без них (в случае формирования NLRC4-инфламмасом) связывают молекулы каспазы-1 в активно работающую систему формирования зрелых цитокинов (рис. 12).

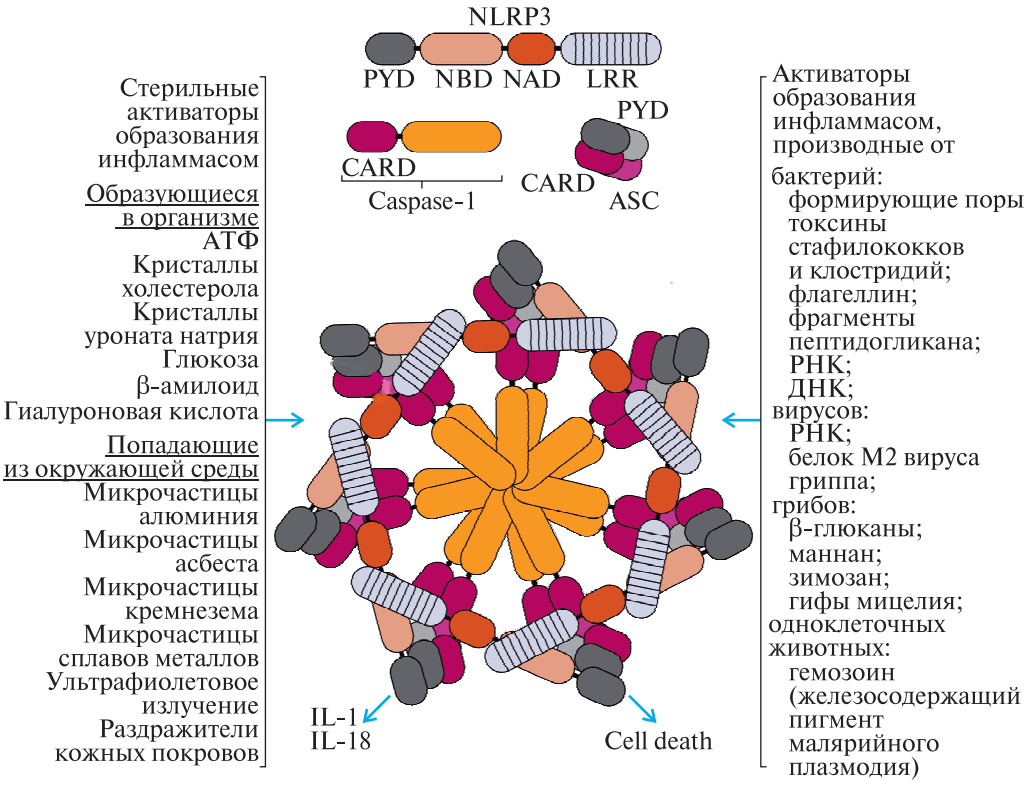


Рис. 12. Схема строения NLRP3-инфламмасомы и активирующие ее образование агенты (по 2013-KUBY Immunology)

Адаптерный белок ASC (от англ. **a**ssociated **s**peck-like protein containing a **C**ARD) может связываться как с пириновым доменом (PYD) NLRP1 или NLRP3, так и с CARD, имеющимся в молекуле каспазы-1, что и позволяет образовываться мультимерным комплексам.

Индукторами образования инфламмасом могут быть не только связываемые NLRs типичные PAMP (изображены справа на рис. 12), но и кристаллы холестерола, натриевой соли мочевой кислоты, ассоциируемый с болезнью Альцгейме-

ра β-амилоид, свободные фрагменты гиалуроновой кислоты (образующиеся при болезнях суставов, например подагре), находящиеся вне клеток молекулы АТФ и глюкозы. Кроме того, поступающие в организм извне твердые частицы очень малого размера (асбестовая или силикатная пыль, кристаллы алюмокалиевых квасцов, частицы сплавов некоторых металлов) также интенсивно индуцируют образование инфламмасом. Этот эффект пока трактуют так: твердые частицы после их фагоцитоза механически разрушают мембраны фаголизосом, что и влечет за собой быстрое появление лигандов для рецепторов семейства NLRs.

Установлено, что избыточное образование инфламмасом в клетке приводит в конечном итоге к ее гибели. Но, как показали проведенные с использованием флюоресцентно-меченых инфламмасомных белков исследования 2014 года, после смерти образовавшей инфламмасому клетки инфламмасомы не разрушаются сразу и могут стимулировать более быстрое образование инфламмасом в других клетках. Если такой механизм усиления воспалительной реакции действительно подтвердится, это открывает новые возможности для борьбы с патологическими вариантами воспаления, в частности предлагается использовать антитела, связывающие входящие в инфламмасомы белки. Предполагается, что такой подход может помочь при подагре, болезни Альцгеймера, при отторжении металлических протезов суставов, при определенных формах диабета и системного атеросклероза.

Итак, по современным представлениям клетки первой линии защиты переходят в активное состояние, улавливая с помощью специальных рецепторов сигналы опасности. Это не только активирует непосредственно их на выполнение защитных функций, например на фагоцитоз, но и обеспечивает образование этими клетками молекул **провоспалительных цитокинов**, сигнализирующих остальным клеткам об имеющейся в организме опасности. Такого рода сигналы также хорошо воспринимаются клетками первой линии защиты, поскольку у них для этого имеются специальные рецепторы. Хотя цитокины, впоследствии переименованные в **интерлейкины**, были открыты при изучении взаимодействия клеток, обеспечивающих иммунный ответ, т. е. индуцибельные реакции второй линии защиты, в настоящее время ни у кого не вызывает сомнения роль интерлейкинов в защитных реакциях конститутивного характера.

В самом широком смысле интерлейкины являются основным «средством общения» клеток иммунной системы. Благодаря им лейкоциты целенаправленно перемещаются в организме, поддерживаются в нужном количестве и состоянии, переходят в активированную форму в нужное время и в нужном месте. Именно это хотели подчеркнуть иммунологи, заменяя в 1979 г. первоначально принятый термин «цитокины» (т. е. способствующие делению) на ныне используемый. Слово «интерлейкины» происходит от двух латинских слов *inter* (‘между’) и *leukocytes* (‘бесцветные клетки’ крови), т. е. это вещества, действующие между лейкоцитами, иначе говоря, обеспечивающие их взаимодействие.

По мере того как накапливались сведения о молекулах, влияющих на жизнедеятельность и активность лейкоцитов, становилось понятным, что часть таких молекул уже открыта и они известны под определенными названиями. Например, стимулирующие противовирусную активность клеток иммунной системы интерфероны по характеру своего влияния на клетки явно попадали в группу интерлейкинов: выделяемые одними клетками, они стимулируют активность других кле-

ток, не контактировавших с вирусом. Некоторые вещества, являющиеся по своей функции прежде всего цитокинами (стимуляторами деления), получали свои названия исходя из этого. Примером таких веществ выступает гранулоцит-моноцит колонийстимулирующий фактор (ГМ-КСФ, в более часто используемой англ. аббревиатуре GM-CSF). Менять эти названия на интерлейкины с соответствующим цифровым обозначением посчитали нецелесообразным, и в списке интерлейкинов они приводятся под своими первоначальными наименованиями. Все это необходимо учитывать при чтении специализированной литературы. Кроме того, многие из интерлейкинов обладают плейотропным (множественным) действием, поэтому следует также обращать внимание на то, в каком контексте (в связи с чем) упоминается то или иное вещество. Желая подчеркнуть именно сейчас обсуждаемый эффект, авторы могут называть одну и ту же молекулу то цитокином, то интерлейкином, то хемокином, и это считается вполне допустимым.

В отношении вновь открываемых соединений с 1992 г. существуют принятые Номенклатурным комитетом Международного союза иммунологических обществ правила присвоения веществу названия «интерлейкин». Для признания вещества интерлейкином необходимо представить данные о клонировании, секвенировании и экспрессии кодирующего это вещество гена; о получении моноклональных антител, позволяющих отличить это вещество от уже известных; о продукции этого вещества именно клетками иммунной системы и его роли в регуляции иммунных процессов.

Полностью устоявшейся и всеми признанной классификации интерлейкинов пока не существует. Сведения о них пополняются в последние годы весьма интенсивно, поэтому приводимые в учебных пособиях и даже в гораздо более часто издаваемых тематических научных обзорах списки интерлейкинов успевают устареть еще до опубликования. В связи с этим в данной главе книги мы ограничимся рассмотрением интерлейкинов, преимущественно действующих на этапе проявления конститутивных защитных факторов, т. е. факторов врожденного иммунитета.

Здесь следует оговориться, поскольку по современным представлениям врожденный иммунитет – база для развития индуцибельных механизмов приобретенного (адаптивного) иммунитета, которые запускаются практически сразу после начала воздействия неблагоприятных факторов. И одним из ключевых моментом в запуске этих механизмов как раз и является действие интерлейкинов. Следовательно, разделение интерлейкинов на действующие только в первой линии защиты или во второй достаточно условно.

Исходя из того, что основное проявление врожденной конститутивной защиты – это развитие воспаления, речь пойдет прежде всего о так называемых **провоспалительных интерлейкинах**. Эти вещества синтезируются первоначально моноцитами и тканевыми макрофагами, получившими сигнал через описанные в предшествующих разделах рецепторы для PAMP или DAMP.

Наиболее известными интерлейкинами, запускающими, поддерживающими и усиливающими воспаление, являются члены **семейства IL-1**. Ранее считалось, что IL-1 – это одно выделяемое активированными макрофагами вещество, но в настоящее время установлено, что клетки иммунной системы образуют около десятка близких по строению и выполняемым функциям первоначально опи-

санному интерлейкину-1 молекул. В силу этого их относят к одному семейству и в определенной степени рассматривают их действие как совокупное.

Основными в этом семействе считаются **IL-1**α и **IL-1**β (по современной классификации – IL-1F1 и IL-1F2 соответственно), чаще всего упоминаемые в литературе как просто IL-1. При экспрессии обоих кодирующих эти интерлейкины генов синтезируются не способные к секреции предшественники, которые укорачиваются до 17,3 кДа (IL-1α) и 17,5 кДа (IL-1β). Причем основной секретируемой формой интерлейкина-1 является IL-1β (именно он образуется при действии каспазы-1 в инфламмасомах), тогда как IL-1α обнаруживается чаще всего на поверхности клеток-продуцентов в виде мембранного белка. По действию на клетки-мишени оба варианта сходны, поскольку связываются одним и тем же рецептором, но действие α-варианта рассматривают как локальное, проявляющееся только при непосредственном контакте макрофага с клеткой-мишенью.

Мишенями для IL-1 являются практически все лейкоциты, фибробласты, клетки хрящевой и костной тканей, эпителиальные клетки всех слизистых и эндотелия кровеносных сосудов и даже нервные клетки. Описано индуцирующее действие IL-1 на экспрессию более 100 различных генов, что приводит к проявлению как индивидуальных изменений в клетках, так и системных во всем организме. Из последних можно отметить усиление образования всех клеток крови, но преимущественно нейтрофилов, развитие лихорадочных состояний за счет действия на соответствующие центры головного мога, стимулирование клеток печени на выработку белков острой фазы воспаления, а при избыточном действии – разрушение или, наоборот, разрастание тканей в суставах.

Следует отметить, что такого рода действие, называемое эндокринным по аналогии с действием гормонов, не является обычным для интерлейкинов в целом. Как правило, они действуют локально, на коротких расстояниях, буквально на находящуюся рядом клетку-мишень в пределах иммунологического синапса (паракринное действие) и достаточно часто на ту же клетку, которая их вырабатывает (аутокринное действие).

О необычности действия интерлейкина-1 в какой-то мере свидетельствует и открытый недавно член этого же семейства IL-1RA (он же IL-1F3), который сходен по строению с IL-1β и связывается с теми же рецепторами на клетках-мишенях. Но этот вариант интерлейкина не способен передать в клетку-мишень сигнал, поэтому его рассматривают как интерлейкин-регулятор, сдерживающий возможное избыточное действие основного интерлейкина. В пользу такой трактовки функции IL-1RA (называемого также рецепторным антагонистом IL-1) говорит тот факт, что продуцируется он теми же клетками, которые секретируют IL-1β, и его секреция усиливается по мере усиления продукции IL-1β.

Считается, что именно IL-1β – основной усилитель сигналов опасности, воспринятых первоначально только некоторыми макрофагами. Именно благодаря этому интерлейкину и наличию рецепторов для него почти на всех клетках организм способен быстро мобилизоваться на защиту даже при локальном воздействии патогена. Причем этот же интерлейкин важен для начальных этапов развития иммунных ответов, т. е. с его участием осуществляется связь конститутивных и индуцибельных защитных реакций.

В последние годы охарактеризован еще один член этого же семейства IL-18 (по последней классификации IL-1F4), близкий к IL-1по характеру секреции (для его созревания и выделения также необходимо действие каспазы-1 и инфламмасомы) и дальнейшего воздействия на клетки и организм в целом. То, что эффекты действия IL-18 и IL-1 близки, в определенной мере подтверждается существованием специального белка, сдерживающего избыточное действие данного интерлейкина. Этот белок получил название «IL-18-связывающий белок» (сокращенно IL-18BP, от англ. **IL-18-b**inding **p**rotein) еще и потому, что работает он как регулятор по схеме, которая отличается от характерной для IL-1RA. IL-18BP после секреции из клетки-продуцента связывает в тканевой жидкости свободные молекулы интерлейкин-18, лишая их способности присоединяться к рецептору. Одним из обнаруженных пока отличий в действии IL-18 от действия IL-1 является его способность индуцировать в клетках-мишенях образование γ-интерферона.

Еще один близкий по строению член этого семейства IL-33 (он же IL-1F11), хотя и продуцируется по схожей с вышеописанными интерлейкинами схеме, по характеру действия существенно отличается. Фактически его даже не рассматривают как провоспалительный цитокин, поскольку рецепторы для него обнаружены только на Т-хелперах подтипа 2, которые действуют только во второй линии защиты. Пока установлено, что этот интерлейкин стимулирует выработку Т-лимфоцитами этой группы своих интерлейкинов (IL-4, IL-5 и IL-13), от которых зависит, в конечном итоге, протекание иммунного ответа на конкретный специфический антиген.

Еще одним важным провоспалительным интерлейкином (цитокином) является **фактор некроза опухоли** – **ФНО** (в англ. аббревиатуре **TNF** – **t**umor **n**ecrosis **f**actor). Несколько странное для интерлейкина название связано с тем, что впервые это вещество было выделено и идентифицировано (произошло это в 1975 г.) как белок сыворотки крови, появляющийся при воздействии на организм белых мышей эндотоксина бактерий (бактериального липополисахарида) и способный убивать раковые мышиные клетки. По мере изучения условий образования и активности этого противоракового вещества выяснилось, что это один из факторов инициации и поддержания воспалительной реакции.

В настоящее время идентифицированы около двух десятков молекул, сходных по строению с первоначально выделенным TNF, из-за чего образовано соответствующее суперсемейство белков под названием TNFSF. Собственно в роли медиатора реакций первой линии защиты проявляет себя TNFα (по современной классификации TNFSF2). Это связано с тем, что подавляющее большинство остальных членов суперсемейства, в том числе и TNFβ (называемый также лимфотоксином α, по современной классификации TNFSF1), крайне редко обнаруживаются в растворимой форме. В то же время TNFα, несмотря на наличие в своей структуре трансмембранного домена, достаточно быстро после синтеза и выведения на поверхность мембраны подвергается протеолизу и переходит в растворимую форму. Уже свободные молекулы объединяются друг с другом в тримеры, которые и обладают активностью провоспалительного интерлейкина.

Присоединяясь к соответствующим рецепторам на различных клетках, TNFα стимулирует происходящие в ходе воспаления изменения. В частности, в клетках эндотелия кровеносных сосудов усиливается синтез молекул адгезии, что влечет за собой более эффективный выход фагоцитирующих клеток в очаг воспаления.

В этих клетках усиливаются выработка цитокинов и интерферонов, а также процессы образования активных форм кислорода и азота для инактивации фагоцитированных микроорганизмов. Проявляется, пусть и менее выраженный, чем у IL-1, системный эффект – в клетках печени стимулируется выработка белков острой фазы воспаления. При избыточном синтезе TNFα могут наблюдаться серьезные отклонения в метаболических процессах, например нарушается синтез липидов, что приводит к развитию кахексии – сильного исхудания и истощения организма. Показано также, что возникающий при некоторых бактериальных инфекциях токсический шок (часто приводящий к смертельному исходу) в значительной мере зависит от концентрации в тканевых жидкостях именно TNFα.

Следующая группа влияющих на функционирование врожденных факторов защиты молекул – **интерфероны**. Первоначально явление интерференции – развитие устойчивости к нескольким вирусам после инфицирования организма одним из них – связывали с одним белком, но по мере изучения выяснилось, что клетки крови в ответ на воздействие вирусных нуклеиновых кислот продуцируют несколько сходных по строению веществ. К настоящему времени для млекопитающих описаны 12 белков, за которыми традиционно сохраняют общее название, и все их рассматривают не как противовирусные агенты, а как особую группу интерлейкинов (цитокинов). Интерфероны по характеру их действия на клетки разделены на три семейства (или типа), и наиболее многочисленным из них является семейство, включающее интерфероны типа I. В него входят IFNα, IFNβ, IFNδ, IFNε, IFNκ, IFNτ, IFNω, а также лимитин, имеющий второе название – IFNζ (IFN-дзета). Интерфероном типа II пока считается только один – IFNγ. Выделение этого вещества в отдельное семейство связано с особенностями его образования и функционирования – IFNγ продуцируют только лимфоциты, и его действие реализуется в ходе иммунных ответов, т. е. во второй линии защиты. Интерфероны типа III (IFNλ1, IFNλ2 и IFNλ3) были описаны относительно недавно, поэтому получили номенклатурный статус интерлейкинов – это IL-29, IL-28A и IL-28B соответственно. Интерфероны типа III сходны по характеру действия с интерферонами типа I. Они функционируют в ходе реализации конститутивных защитных механизмов, но их особенности недостаточно изучены.

Наиболее изученными интерферонами первой линии защиты являются **IFN**α и **IFN**β. Интерфероны типа I конститутивно продуцируются в небольшом количестве лишь некоторыми вариантами дендритных клеток, однако при воздействии на клетки крови (преимущественно моноциты и макрофаги) PAMP вирусного происхождения их образование многократно усиливается. Фактически один из обязательных этапов активации клеток при вирусной инфекции – это запуск экспрессии кодирующих интерфероны генов. Появление интерферонов типа I, в свою очередь, служит сигналом активации для множества клеток крови как врожденного (миелоидные дендритные клетки, макрофаги, NK-клетки), так и адаптивного (Т- и В-лимфоциты) иммунитета. Кроме этого, IFNα воздействует не только на клетки крови, но и на эпителиальные клетки практически всех слизистых оболочек, а также фибробласты соединительных тканей.

Результатом такой активации различных клеток прежде всего является развитие в них механизмов ограничения репродукции вирусов. Один их таких механизмов – индукция образования 2,5-олигонуклеотид-синтетазы. Появляющиеся

в результате действия этого фермента 2,5-олигонуклеотиды связываются с неактивной формой РНКазы L, которая, став активной, расщепляет одноцепочечную вирусную РНК.

Второй механизм связан синтезом в клетке протеинкиназы R, серинтреониновой киназы, которая активируется при взаимодействии с двунитевой вирусной РНК и фосфорилирует эукариотический фактор инициации трансляции 2α (eIF2α). Фосфорилированная форма eIF2α заранее объединяется с гуанидиндифосфатом и еще одним фактором инициации трансляции eIF1β, и получаемый при этом комплекс eIF2α-GDP-eIF1β уже не может инициировать трансляцию. Блокирование трансляции в пораженной вирусом клетке становится основной причиной ограничения репродукции вируса в инфицированной клетке.

Третий путь противовирусной защиты заключается в индукции IFNα и IFNβ образования специфических белков Mx, которые связываются с белками транскрипционных комплексов (в частности, при репродукции ортомиксовирусов с белком PB2), блокируя тем самым транскрипцию вирусных РНК.

Все эти активности связывают с действием на клетку интерферонов типов I и III, но их выражение варьирует в зависимости как от клетки, в которой осуществляется противовирусная защита, так и от условий, в которых находится клетка.

Интерфероны стимулируют в клетках проявление факторов защиты и от не имеющих вирусной природы патогенов. В фагоцитирующих клетках при воздействии IFNα усиливается продукция различных бактерицидных веществ, ускоряются процессы фагоцитоза и инактивации фагоцитированных объектов, возрастает количество синтезируемых клетками интерлейкинов. Это и позволяет рассматривать интерфероны именно как интерлейкины, а не специфические вещества противовирусной защиты.

Отдельно следует проанализировать группу интерлейкинов, преимущественно проявляющих себя в процессах конститутивной защиты как хемоаттрактанты. Хемотаксис лейкоцитов – направленное перемещение их в организме – без преувеличения можно назвать главной основой функционирования всей иммунной системы. Процессы образования и созревания всех лейкоцитов, поддержания их численности в конкретных органах и тканях в норме, их активирования и пролиферации при наличии инфекционных агентов, поиска и захвата подлежащих уничтожению объектов реализуются только благодаря своевременному появлению нужных клеток в нужном месте. Вызывать движение клеток крови могут различные вещества, но главенствующую роль в миграции и взаимодействии лейкоцитов играют специализированные молекулы, в настоящее время называемые **хемокинами**, т. е. цитокинами, вызывающими хемотаксис. Собственно типичным интерлейкином из этой группы является только **IL-8** (по хемокиновой классификации теперь это CXCL8), изучение механизма действия которого и повлекло за собой открытие новых молекул хемотаксиса, обособление их в отдельное суперсемейство и особый интерес к ним иммунологов и медиков.

В отличие от многих других интерлейкинов **хемокины**, если можно так выразиться, профессиональные инициаторы движения. Это обусловлено, с одной стороны, наличием на поверхности лейкоцитов специализированных рецепторов, способных передать вызывающий движение сигнал, и с другой – структурой самих хемокинов, которая обеспечивает им сродство именно к этим рецепторам.

В настоящее время образуемые клетками млекопитающих имеющие иммунологическое значение белковые хемоаттрактанты (хемокины) разделены на шесть классов, исходя из количества и расположения остатков цистеина в их первичной структуре (табл. 7). Такое разделение признано обоснованным, поскольку есть четкая корреляция этой особенности первичной структуры с набором клеток-мишеней, структурой рецепторов для этих хемокинов и дополнительными эффектами, определяемыми данными хемокинами.

Таблица 7

Структурные особенности хемокинов различных классов

Класс	Расположение и количество цистеиновых остатков (С) в		Входящие в класс хемокины	Количество хемокинов в классе
	N-концевой части молекулы	остальной части молекулы		
ELR CXC	...ELR.....CXC.....	.....C.....C....	CXCL1 – CXCL3, CXCL5 – CXCL8	7
CXC	.....CXC.....	.....C.....C....	CXCL4, CXCL9 – CXCL16	9
4C CC	.....CC.....	.....C.....C....	CCL2 – CCL14, CCL16 – CCL20, CCL22, CCL24 – CCL28	19
6C CC	.....CC.....	...C...C...C....C....	CCL1, CCL15, CCL21, CCL23, CCL28	5
C	.....C.....	.....C.....	XCL1, XCL2, лимфотактины α и β	2
CX_3C	.....CXXXC.....	.....C.....C....	CX_3CL1, фракталкин	1

Примечания: 1. X – любой аминокислотный остаток.
2. ELR – стоящие подряд остатки глютамина, лейцина и аргинина.
3. L в названии цитокина обозначает «лиганд».

Не все из хемокинов участвуют в реализации механизмов конститутивной защиты, значительная часть из них используется клетками в ходе их развития, перемещения к местам созревания, при поддержании гомеостатического состояния определенных клеток и их миграции в организме в норме. Но приблизительно три четверти хемокинов проявляют себя в процессе развития и поддержания воспаления, а хемокины класса ELR CXC на последнем этапе воспаления – восстановлении нормального физиологического состояния ткани после удаления вызвавшего воспаление агента – определяют ангиогенез (рост и развитие новых кровеносных сосудов, если старые капилляры были повреждены в ходе воспаления).

Следует отметить и еще одну особенность хемокинов – способность связываться не только с определенными рецепторами на клетках, но и с глюкозоаминогликанами, присутствующими на многих клетках эпителиальных и соединительных тканей, а также на межклеточном веществе последних. Такое менее специфическое, чем присоединение к рецепторам, связывание является важным

для создания в нужных местах необходимого для движущихся лейкоцитов направляющего движение градиента концентраций хемоаттрактанта.

К интерлейкинам провоспалительного действия относятся также **IL-6** и **IL-17**, но действие их в защитных реакциях врожденного иммунитета выражено в меньшей степени, чем у IL-1 или TNF. Эти интерлейкины продуцируются не только моноцитами и макрофагами в ходе реализации первой линии защиты, но и активированными уже в ходе иммунных ответов лимфоцитами, в частности Т-хелперами подтипов T_H2 и T_H17. Собственно название последнего из подтипов Т-хелперов связано именно с продукцией ими IL-17, поэтому эффектам и механизмам действия этих интерлейкинов будет уделено определенное внимание при рассмотрении индуцибельных защитных реакций.

Подводя определенный итог этой части пособия, следует отметить две особенности. Даже при кратком рассмотрении влияющих на проявление реакций врожденного иммунитета факторов можно видеть, что на клетки иммунной системы оказывают одновременное воздействие множество различных по происхождению и химическому строению веществ. При этом определенные вещества активируют те или иные функции, действуют сходным или прямо противоположным образом, проявляют себя как синергисты или антагонисты. Особенно это заметно на примере действия интерлейкинов, поэтому в настоящее время, обсуждая эффекты действия тех или иных молекул, определенные на клетках *in vitro*, всегда делают оговорку, что в условиях *in vivo* эти эффекты воспроизводятся не всегда. Учитывая это, в последние годы все чаще говорят о так называемой цитокиновой сети и даже пытаются отразить совместное действие цитокинов, рисуя соответствующие схемы (рис. 13).

Ясно, что такие схемы еще далеки от реальности, но хоть в какой-то мере отражают действующий на клетки поток информации. Естественно, возникает вопрос, как именно каждая из клеток успевает правильно воспринимать и интерпретировать с пользой для организма подобную информацию.

Один из частичных ответов на этот вопрос – рецепторный характер взаимодействия веществ с клетками. Только те клетки, у которых имеются рецепторы для определенного вещества, будут на них реагировать. Однако в зависимости от условий состояние и количество таких рецепторов изменяется, и, более того, сигнал, воспринимаемый через один и тот же рецептор, приводит иногда к прямо противоположным эффектам. По этой причине изучение путей передачи сигналов от рецепторов внутри клетки в последние десятилетия относится к одной из важнейших задач современной иммунологии.

Благодаря молекулярно-биологическим подходам эта задача постепенно решается, и за последние годы накоплено уже немало сведений об общих принципах функционирования таких путей и молекулах, в этом участвующих. Применительно к восприятию и передаче информации, необходимой для реализации конститутивных защитных реакций, в данном пособии будут рассмотрены некоторые из них.

Второй важной особенностью, которую следует подчеркнуть, является то, что под передачей сигналов внутри клетки в этом контексте понимаются процессы, приводящие к экспрессии конкретных генов, продукты которых и определяют конечный эффект воздействия того или иного фактора. В общем смысле

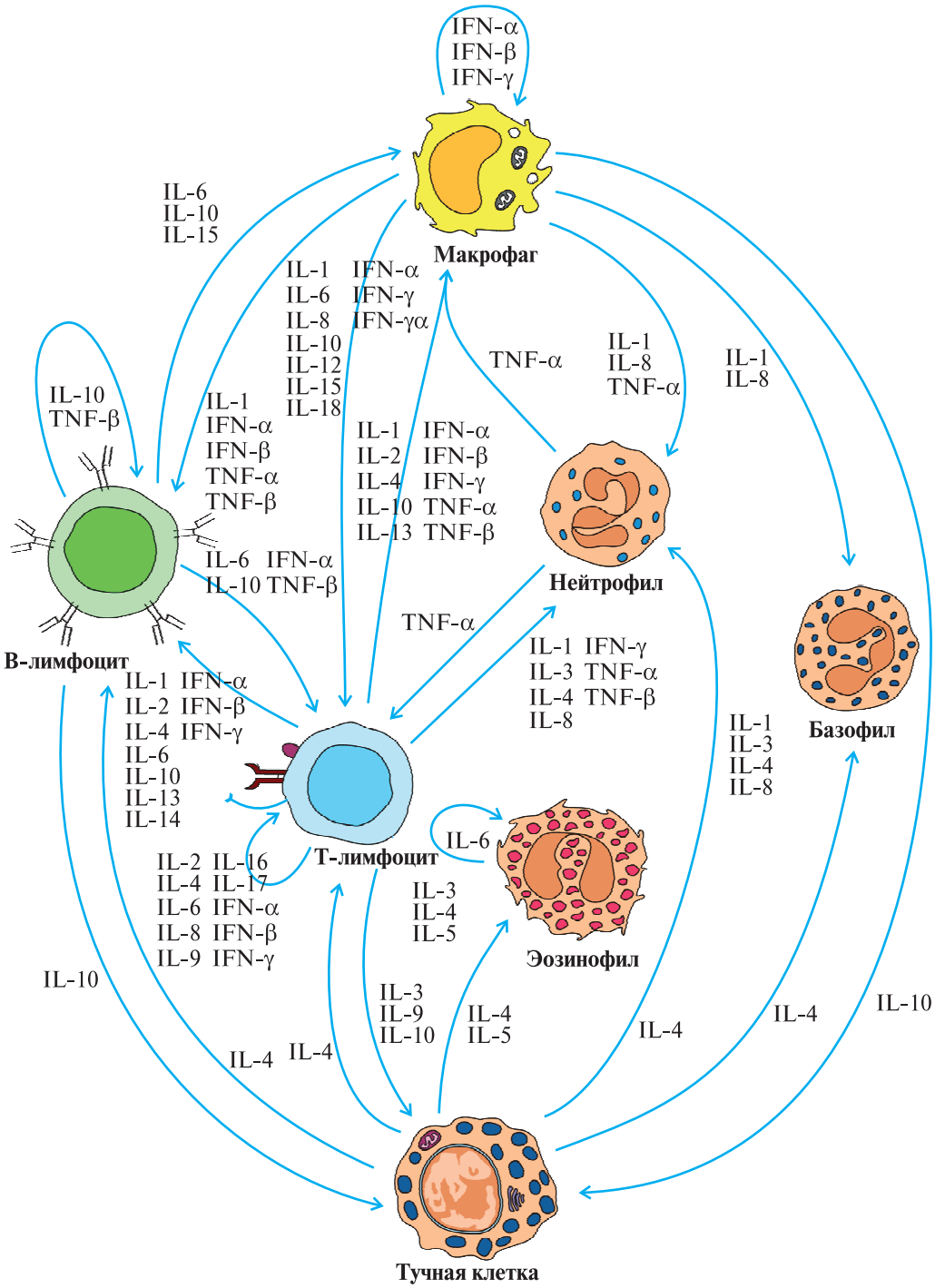


Рис. 13. Условная схема, отражающая продукцию основных цитокинов и клетки-мишени для них (по 2013-KUBY Immunology)

путь передачи подобных сигналов представляет собой цепь поэтапного взаимодействия молекул, конечный итог которого – появление белков, определяющих транскрипцию конкретных генов. Подобные пути реализуются по схеме, представленной на рис. 14.

Находящиеся на наружной поверхности клетки те или иные специфические рецепторы предназначены для взаимодействия с конкретными веществами. Часто у таких рецепторов в их цитоплазматической части имеются домены, предназначенные для активации первых участников внутриклеточных сигнальных путей. Если же рецепторный белок не имеет таких доменов, рядом с ним располагаются молекулы ассоциированных с рецепторами белков, внутриклеточные части которых могут запускать активацию. В некоторых случаях для усиления поступающего в клетку сигнала рядом с рецептором может находиться корецептор, способный запустить собственный внутриклеточный путь передачи сигнала и усилить путь, начинающийся от основного рецептора.

Достаточно часто и молекулы сложных по составу рецепторов, и молекулы ассоциируемых с рецепторами белков не находятся изначально в тесной связи друг с другом. Для их пространственного совмещения происходят локальные перестройки в мембране, в результате чего образуются богатые холестеролом и сфинголипидом, имеющие более жесткую, чем обычная биологическая мембрана, пространственную структуру и поэтому не разрушаемые простыми детергентами участки, называемые **липидными рафтами** (lipid rafts). На рис. 14 такой участок мембраны выделен красным цветом. Эти более плотные участки выступают в роли своеобразных плотов (один из переводов англ. слова «raft») или плавающих в обычном липидном бислое платформ, в которых должны находиться собственно рецепторные и ассоциированные с ними белковые молекулы для оптимального контакта. По нынешним представлениям большинство рецепторных взаимодействий между клетками или клетками и важными для них молекулами (гормонами, нейромедиаторами и т. п.) происходят именно таким образом.

Многие сигнальные пути начинаются с фосфорилирования остатков тирозина в определенных молекулах, для чего используются соответствующие ферменты, называемые **тирозинкиназами**. В роли такого фермента может выступать либо сам белок-рецептор (тогда в его цитоплазматической части должен быть соответствующий домен), либо один из адаптерных белков, закрепленных в мембране с цитоплазматической стороны. Часть таких, условно говоря, рецепторных сигнальных тирозинкиназ относятся к семейству Src, название которого происходит от слова «саркома» и читается как «сарк», поскольку типовым ферментом для этого семейства является фермент вируса саркомы Рауса (возбудителя злокачественных образований у птиц). Другие сигнальные тирозинкиназы образуют свои семейства и имеют собственные названия (они будут упоминаться в описаниях конкретных сигнальных путей), но все они нужны для перевода в активированное состояние молекул, осуществляющих следующий этап в сигнальном пути.

Помимо фосфорилирования тирозиновых остатков в белках в ходе реализации сигнальных путей используется также фосфорилирование остатков серина и треонина. Соответствующие этим реакциям ферменты называются серин-треониновыми киназами.

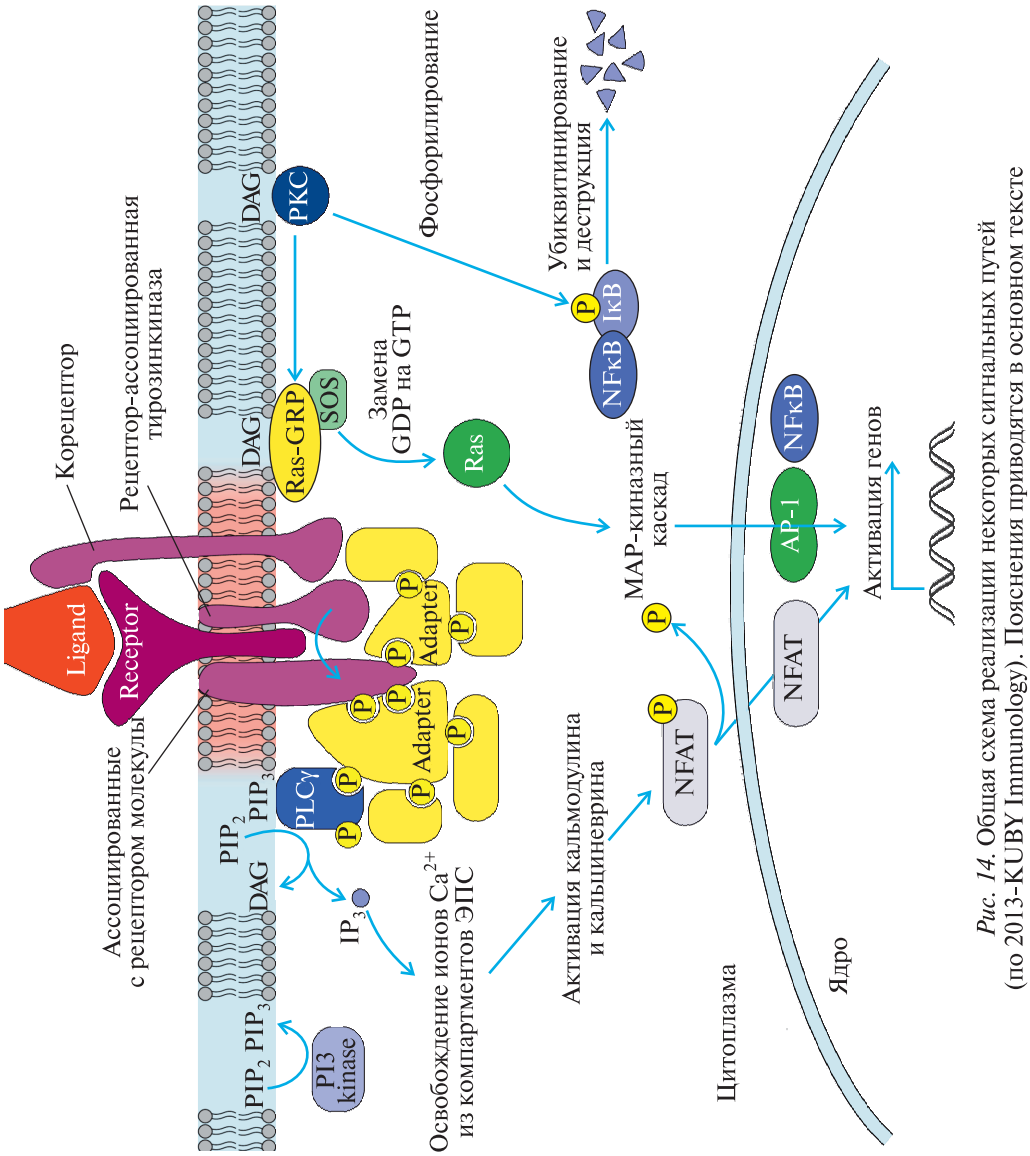


Рис. 14. Общая схема реализации некоторых сигнальных путей (по 2013-KUBY Immunology). Пояснения приводятся в основном тексте

Кроме фосфорилирования белков важным для проведения определенных сигналов является и фосфорилирование фосфолипидов. Один из основных структурных фосфолипидов мембран эукариотических клеток – фосфатидилинозитол-бифосфат (в англ. аббревиатуре PIP_2) – играет здесь важную роль. Специальный фермент фосфатидилинозитол-3-киназа (сокращенно в англ. варианте PI_3K) в ходе восприятия клеткой рецепторного сигнала может превращать PIP_2 в фосфатидилинозитол-трифосфат (PIP_3). При этом PIP_3 остается в составе мембраны и служит для прикрепления к ней с цитоплазматической стороны ряда белков, важных для дальнейшей передачи сигнала. Это обеспечивает некоторым адаптерным белкам возможность взаимодействия с изменившимися белками рецепторного комплекса и, более того, способствует переводу их в активное состояние, в том числе и за счет уже рассмотренного выше фосфорилирования.

PIP_2 определяет и еще один путь реализации сигнала. Для этого нужен фермент фосфолипаза С (англ. аббревиатура PLC). Она отщепляет от PIP_3 трифосфатинозитол (IP_3), а остающийся при этом в мембране диацилглицерол (DAG) связывает в свою очередь некоторые адаптерные белки и тем самым способствует их активации. Ряд таких белков представляют собой тирозиновые или серин-треониновые киназы, и это дает начало нескольким различным продолжениям сигнальных путей, которые будут рассмотрены в нашем пособии позже.

Свободный же трифосфатинозитол диффундирует в цитоплазму и взаимодействует со специальными рецепторами на поверхности мембран эндоплазматической сети, что приводит к выходу из этих участков ЭПС хранящихся там ионов Ca^{2+}. Эти ионы переводят в активное состояние Ca^{2+}-зависимые белки, в частности кальмодулин, который связывает и активирует различные цитоплазматические белки. При этом падает количество свободных ионов кальция в клетке, что стимулирует сборку в наружной мембране клетки кальциевых каналов. В клетку начинает поступать больше свободных ионов кальция, что способствует еще большей активации кальцийзависимых белков.

Для понимания процесса дальнейшей передачи сигналов необходимо упомянуть и о таком веществе, как убиквитин. Это небольшой (включающий 76 аминокислотных остатков) белок, использующийся клетками как специфическая метка для белков, которые уже отслужили свое в клетке и должны быть расщеплены протеазами на аминокислоты. Убиквитин присоединяется к очень разным белкам своим С-концом, где находится реакционно способный остаток глицина, который может взаимодействовать с остатками лизина в протеиновой цепи. Если на одном белке закрепляется одна или несколько молекул убиквитина, то это еще не сигнал для уничтожения. Такой моно- или диубиквитированный белок просто меняет свою изначальную активность, и такое убиквитирование является одним из вариантов посттрансляционных модификаций белка в клетках эукариот. Но если к белку присоединяется много молекул убиквитина, то убиквитин может в таком положении полимеризоваться, и тогда полиубиквитированный белок подвергается расщеплению протеазами.

Все три вышеописанных явления (фософрилирование белков киназами, освобождение ионов кальция, убиквитирование) – первые подготовительные этапы передачи сигнала дальше. В случае реализации кальцийзависимого варианта события разворачиваются следующим образом (рис. 15).

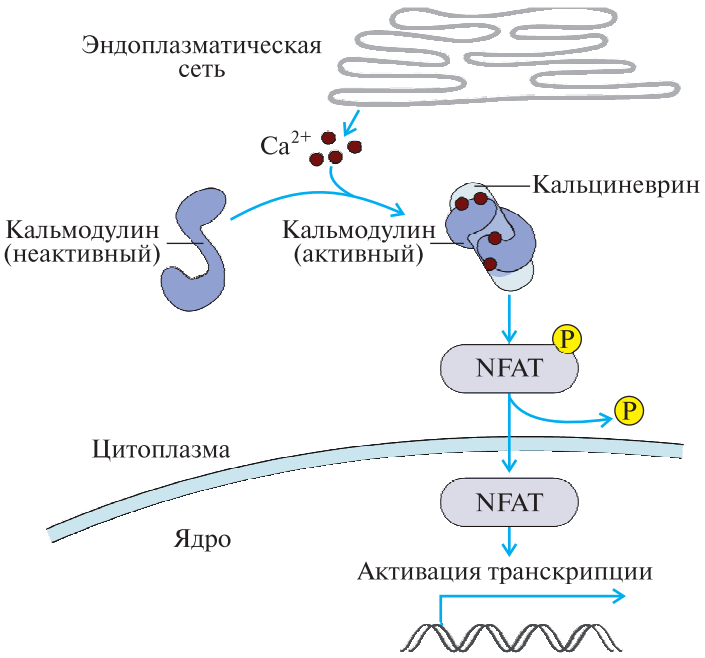


Рис. 15. Активация фактора транскрипции NFAT (по 2013-KUBY Immunology)

Кальмодулин, присоединив к себе четыре Ca^{2+}-иона, связывает белок с фосфатазной активностью кальциневрин. Эта фосфатаза в норме находится в цитоплазме в неактивном состоянии, но после связывания с кальмодулином активируется и дефосфорилирует также до этого неактивный белок NFAT (от англ. **N**uclear **f**actor of **a**ctivated **T**-cells – ядерный фактор активированных Т-клеток).

Как видно из названия, это один из транскрипционных факторов, который, самостоятельно или взаимодействуя с другими активаторами транскрипции, обеспечивает экспрессию тех или иных генов. Тем самым достигается конечная цель передачи сигнала – в клетке появляется вызванный действием сигнала белок.

Следует вспомнить, что определяющее этот путь активирование фосфолипазы С дает остающийся в мембране диацилглицерол, способствующий активации киназ. Выбранный нами для примера путь базируется на активации протеинкиназ из семейства протеинкиназы С. Ферменты из этого семейства задействованы во многих сигнальных путях, причем для активации ряда из них необходимо не только связывание с диацилглицеролом в мембране, но и взаимодействие с ионами кальция, что указывает на взаимосвязи между различными внутриклеточными путями передачи сигнала.

Примером пути, который проходит с участием протеинкиназ С, может быть так называемый Ras-путь (см. рис. 14). Он начинается с активации Ras-белка, представляющего собой гуанидинтрифосфат-связывающий белок, т. е. является одним из G-белков. Такие белки, присоединяя к себе гуанидинтрифосфат (GTP), приобретают способность активировать некоторые из серин-треониновых киназ. Однако конкретно у белка Ras эта способность не реализуется из-за его гидролаз-

ной активности – он быстро превращает GTP в GDP и поэтому не передает сигнал дальше.

Передача может происходить тогда, когда специальный адаптерный белок RasGRP (от англ. **Ras g**uanyl nucleotide **r**eleasing **p**rotein) присоединится к закрепленному в мембране диацилглицеролу и свяжет еще один адаптерный белок в этом пути, который называется «Son of Sevenless» (SOS). Именно он быстро переводит Ras-GDP в Ras-GTP, который и активирует первую из серин-треониновых киназ в сигнальном пути. Такие киназы были впервые описаны при изучении действия митогенов (веществ, стимулирующих клетки на деление) и поэтому получили название «MAP-киназы» (от англ. **M**itogen **A**ctivated **P**rotein Kinases). Приведенная на рис. 16 схема, датируемая 2012 г., отражает важность MAP-киназных сигнальных путей в жизнедеятельности клеток млекопитающих.

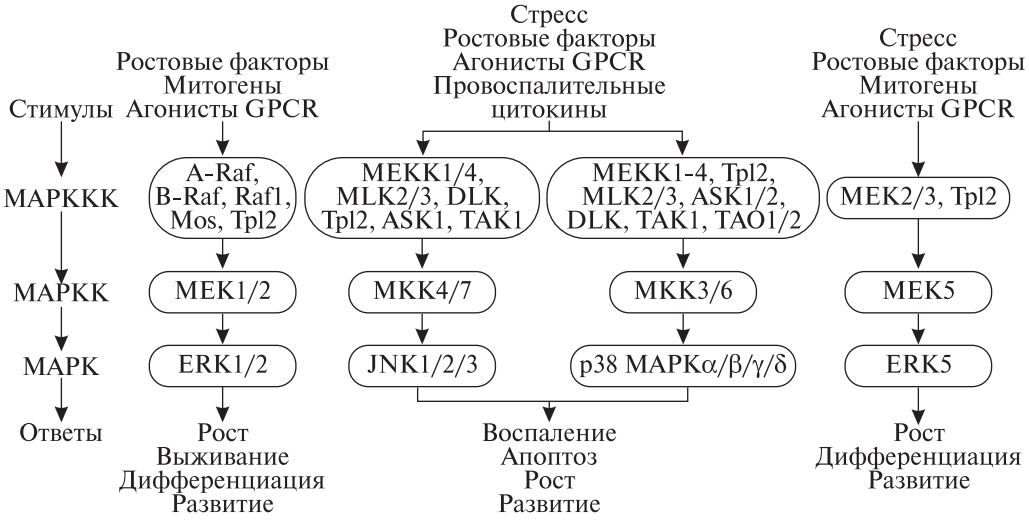


Рис. 16. MAP-киназные сигнальные пути млекопитающих (по D. K. Morrison, 2012):
GPCR – G protein-coupled receptors (связанные с G-белками рецепторы)

Рост, развитие, дифференциация и выживаемость клеток различных тканей, в том числе и имеющих отношение к деятельности иммунной системы клеток крови, во многом контролируется сигналами, передаваемыми через каскады конкретных MAP-киназ. Защитные реакции врожденного и адаптивного иммунитета, в частности воспаление и клональное размножение Т- и В-лимфоцитов в ходе развития иммунных ответов, также не обходится без их участия.

Каждый из вариантов таких путей приводит к появлению на третьем этапе MAP-каскадов активированных киназ, способных влиять на образование определенных факторов транскрипции в ядре клетки. Эти MAP-киназы условно разделены на три семейства: ERKs (**e**xtracellular-signal-**r**egulated **k**inases), JNKs (**J**un **N**-terminal kinases) и p38MAP/SAPKs (**s**tress-**a**ctivated **p**rotein **k**inases). Далее при описании передачи конкретных сигналов от тех или иных рецепторов с участием MAP-киназ будет приводиться название соответствующей киназы, как это сделано на рис. 17.

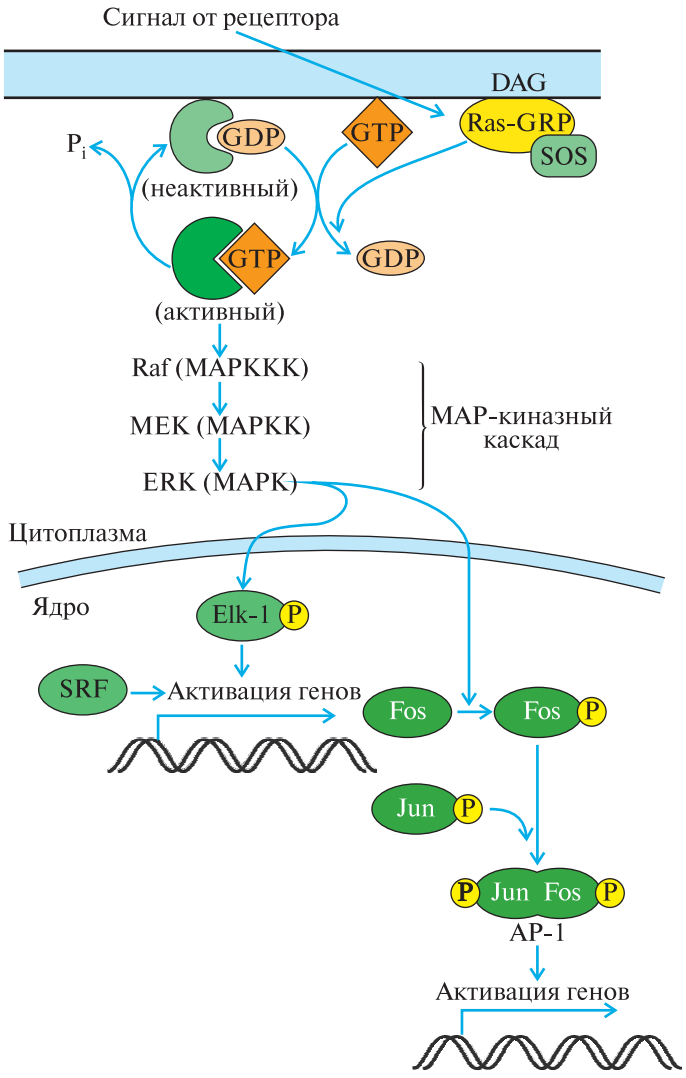


Рис. 17. Путь передачи сигнала с участием MAP-киназ (по 2013-KUBY Immunology)

Активированная протеинкиназа С фосфорилирует первую киназу из этого каскада, которая называется Raf. Став активной, киназа Raf, будучи киназой киназ (MAPKKK), фосфорилирует киназу второй ступени каскада, которая называется MEK и является MAPKK, а та, в свою очередь, фосфорилирует киназу ERK (она относится к MAPK). Таким образом сигнал доходит до ядра клетки, поскольку ERK проникает в ядро и фосфорилирует факторы транскрипции Elk-1 и Fos. Белок Fos, объединяясь с белком Jun, превращается в действующий на многие промоторы фактор транскрипции AP-1. Фактически на этом и заканчивается этот путь передачи сигнала, и начинается ответная реакция на данный сигнал.

Еще один путь активации генов при восприятии сигналов из внешней или внутренней среды должен приводить к появлению широко используемого клеткой фактора транскрипции NFκB (см. рис. 14). Этот транскрипционный фактор действует на многие промоторы, так как состоит из двух разных субъединиц, каждая из которых имеет сродство к своим промоторам. Фактор в цитоплазме клеток находится в неактивной форме, поскольку сразу после синтеза на рибосомах связывается со специальным белком, который называется IκB (от англ. **I**nhibitor of NF-κ**B**). В связи с этим конечная задача такого сигнального пути заключается в освобождении NFκB от ингибитора.

Наиболее хорошо охарактеризованный путь, приводящий к появлению в клетке активного NFκB, описан на примере активации Т-лимфоцитов в ходе реализации индуцибельной защиты (рис. 18), но по современным представлениям он

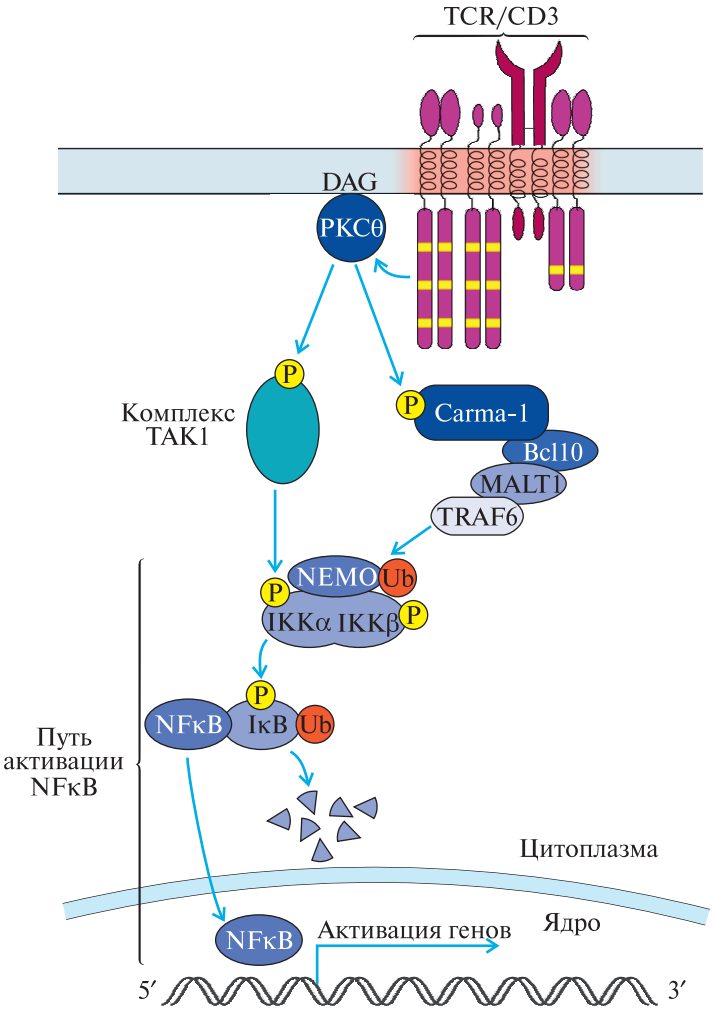


Рис. 18. Один из сигнальных путей, приводящий к образованию фактора транскрипции NFκB (по 2013-KUBY Immunology). Пояснения приводятся в основном тексте

также реализуется и при активации клеток первого эшелона защиты. В рассматриваемом варианте передачи сигнала протеинкиназа С-тэта (PKCθ) фосфорилирует адаптерный белок Carma1, который связывается с белком Bcl10, что дает возможность присоединения белка MALT1. Образовавшееся сочетание CARMA1/Bcl10/MALT1 (CBM) некоторые авторы называют сигналосомой – тельцем, специально формирующимся для дальнейшей передачи сигнала. Суть этой передачи состоит в связывании убиквитинлигазы TRAF6, которая частично активирует и полиубиквитинирует киназный комплекс IKK (от англ. **I**κB **k**inase).

Следует подчеркнуть, что в данном случае полиубиквитинирование входящих в комплекс каталитических молекул не является сигналом для протеолиза, а наоборот, создает условия для фосфорилирования двух входящих в IKK молекул – IKKα и IKKβ. Такое фосфорилирование осуществляет MAPKKK TAK1 (см. рис. 16). Сочетание фосфорилированных IKKα и IKKβ с молекулой NEMO (от англ. **N**F-κB **e**ssential **mo**dulator), которая еще называется IKKγ, может полиубиквитинировать ингибитор NFκB. В этом случае присоединение полиубиквитина служит сигналом для расщепления ингибитора протеазами, что в конечном итоге и приводит к появлению свободного NFκB, который может проникать в ядро и активировать транскрипцию.

Рассмотренный в общем плане путь образования NFκB может различаться в деталях в зависимости от того, какой рецептор принимает сигнал и какие адаптерные белки активируются. Кроме того, как правило, клетка принимает одновременно десятки разных по значению внешних и внутренних сигналов, которые, как упоминалось, могут передаваться сразу по нескольким путям. Значит, в клетке фактически возникает сеть из реализующихся одновременно сигнальных путей, взаимовлияющих друг на друга. Вероятно, этим можно объяснять случаи неодинакового реагирования клеток на одни и те же факторы, действующие, казалось бы, в одинаковых условиях.

Если на основе общих сведений о сигнальных внутриклеточных путях коснуться передачи сигналов в реакциях врожденного иммунитета, то начинать резонно с сигнальных путей, идущих от PRR, т. е. рецепторов, узнающих образы патогенности (PAMP). Входящие в группу PRR толл-подобные рецепторы (TLR) способны самостоятельно инициировать передачу сигнала, так как в цитоплазматической части каждой из субъединиц имеется домен TIR, способный связывать адаптерные белки. Этот домен получил название из-за его сходства с подобным доменом в рецепторе для IL-1, и его название в полном написании выглядит так: **T**oll/**I**L-1R homologous **r**egion. Связываться с TIR-доменом могут пять белков: MyD88, MAL, TRIF, TRAM и SARM, поскольку именно в них есть такой же домен TIR. Наиболее значимыми для передачи сигнала от TLR считаются MyD88 (**My**eloid **d**ifferentiation factor 88) и TRIF (**TIR**-domain-containing adaptor-inducing **I**FN-β **f**actor). Большинство толл-подобных рецепторов запускают так называемый MyD88-зависимый путь активации, и только TLR3 и TLR4 – TRIF-зависимый. Причем TLR4 может запускать оба пути: когда TLR4 находится на наружной цитоплазматической мембране, он связывается с MyD88, а когда TLR4 работает в фаголизосомах, реализуется TRIF-зависимый вариант (рис. 19).

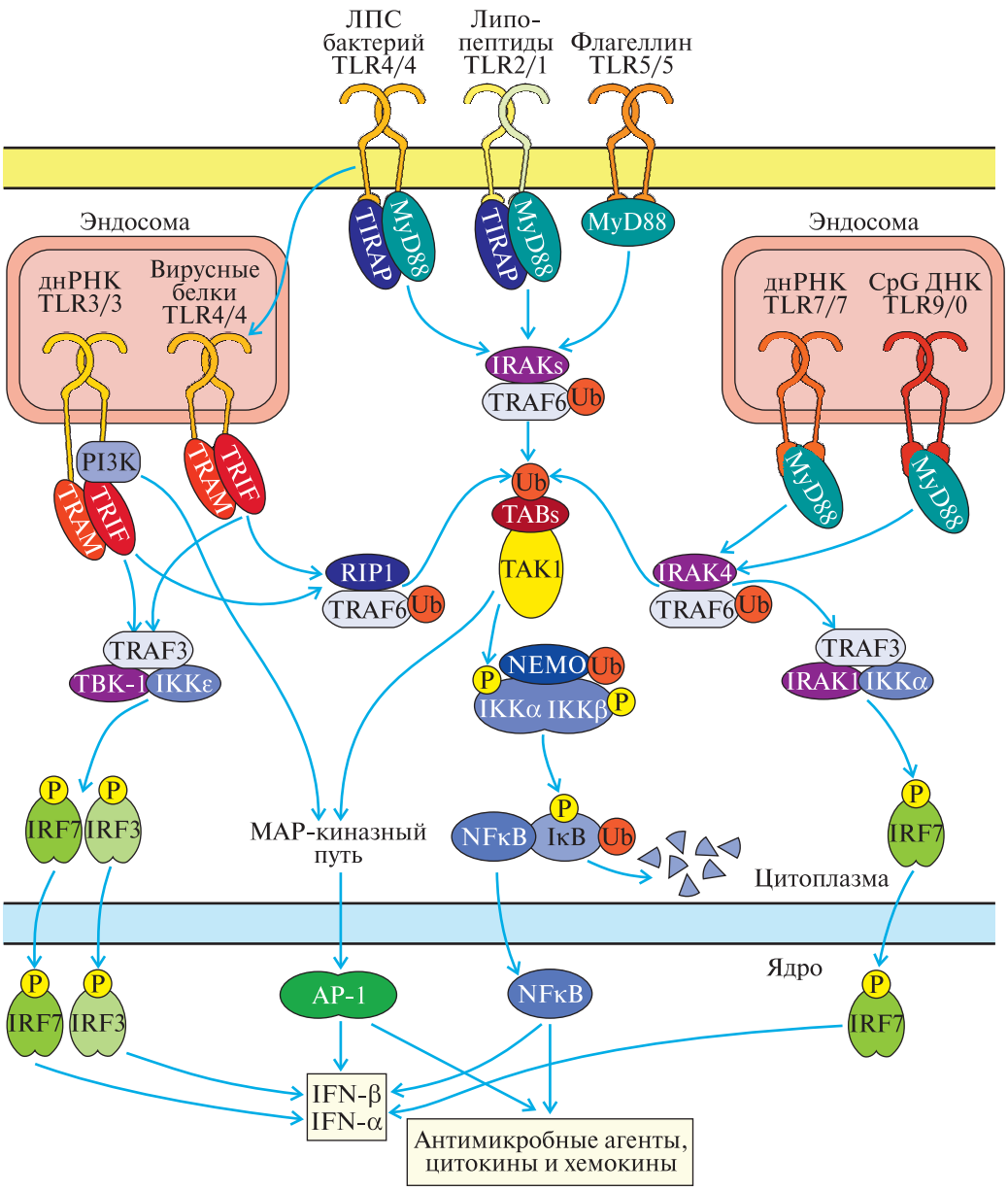


Рис. 19. Передача сигналов от толл-подобных рецепторов (по 2013-KUBY Immunology). Пояснения приводятся в основном тексте

Для реализации MyD88-пути, начинающегося от рецепторов TLR2/1, TLR2/6 (на рис. 19 он не показан) и TLR4/4, необходим дополнительный адаптерный белок TIRAP (**TIR**-domain containing **a**daptor **p**rotein), а TRAM (**TRIF**-**r**elated **a**daptor **m**olecule) помогает связывать белок TRIF рецепторам TLR3/3 и фаголизосомному варианту TLR4/4. Если сочетание MyD88 и TIRAP образовалось, MyD88 связы-

вает и активирует первую серин-треониновую киназу из задействованного в этом пути каскада киназу IRAK4 (**i**nterleukin-1 **r**eceptor-**a**ssociated **k**inase 4). IRAK4 активирует IRAK1, а та, в свою очередь, связывает и активирует убиквитинлигазу TRAF6 (**T**NF **r**eceptor **a**ssociated **f**actor).

Убиквитинлигаза TRAF6 присоединяет убиквитин к белку TAB (**T**ransforming growth factor β-**a**ctivated protein kinase 1 **b**inding protein), который в таком состоянии активирует TAK1 (**T**ransforming growth factor β-**a**ctivated protein **k**inase 1) – первую киназу из MAPK-каскада, т. е. TAK1 – одна из MAPKKK (см. рис. 16). TAK1, как и положено активированной MAPKKK, фосфорилирует MAP-киназу следующего уровня – в данном случае MKK4, которая активирует JNK1 или JNK2, что приводит в конечном итоге к образованию активатора транскрипции AP1.

Сочетание TAB-TAK1 переносит убиквитин на белок NEMO и одновременно фосфорилирует IKKα и IKKβ. Это дает возможность по известной схеме освободить от ингибитора еще один активатор транскрипции – NFκB. Таким образом, благодаря одновременному появлению двух мощных факторов транскрипции запускается экспрессия более десятка генов, продукты которых являются провоспалительными цитокинами, хемокинами или антимикробными пептидами.

При передаче сигналов от локализованных в фаголизосомах толл-подобных рецепторов реализуется весь только что рассмотренный ответ плюс дополнительно активируется продукция интерферонов (см. рис. 19). Если работают рецепторы TLR7/7, TLR8/8 (на рис. 19 он не показан) и TLR9/9, то образующийся комплекс MyD88/IRAK4/TRAF6 запускает не только уже описанные выше MyD88-зависимые пути, но и образование и активацию еще одного комплекса – TRAF3, IRAK1, IKKα, который обуславливает фосфорилирование и димеризацию субъединиц IRF7 (Interferon regulatory factor 7), находящихся в цитоплазме клетки. Активный димер IRF7 перемещается в ядро и активирует транскрипцию генов, кодирующих IFNα и IFNβ, а также нескольких генов группы ISG (IFN-stimulated genes).

При связывании рецептора TLR3/3 со своим лигандом – двунитевой ДНК – происходит присоединение к его цитоплазматической части адаптерных белков TRAM и TRIF. Белок TRIF связывает киназу RIP1 (Receptor-interacting protein 1), которая действует подобно киназе IRAK4, т. е. связывает убиквитинлигазу TRAF6. Такой комплекс фактически позволяет осуществить дальше MyD88-зависимый путь с обеими его ветвями. Этот же рецептор активирует и фосфатидилинозитолтрифосфаткиназу (PI_3K), которая по известной схеме может усиливать MAP-киназную ветвь MyD88-зависимого пути. Но для индукции синтеза интерферонов TRIF активирует TRAF3, которая связывается с белком TBK1 (от англ. TANK-Binding Kinase 1, где TANK – TRAF family member-associated NFκB activator) и киназой IKKε. Находясь в таком сочетании, IKKε действует подобно IKKα на субъединицы IRF7 и фосфорилирует неактивную форму IRF3. В результате получаются два активатора транскрипции, которые, проникая в ядро, включают транскрипцию ISG и генов, кодирующих интерфероны.

C-лектиновые рецепторы, также относимые к патогенраспознающим рецепторам (PRRs), осуществляют передачу сигнала сходным с толл-подобными рецепторами образом, но в этих путях имеются некоторые особенности (рис. 20).

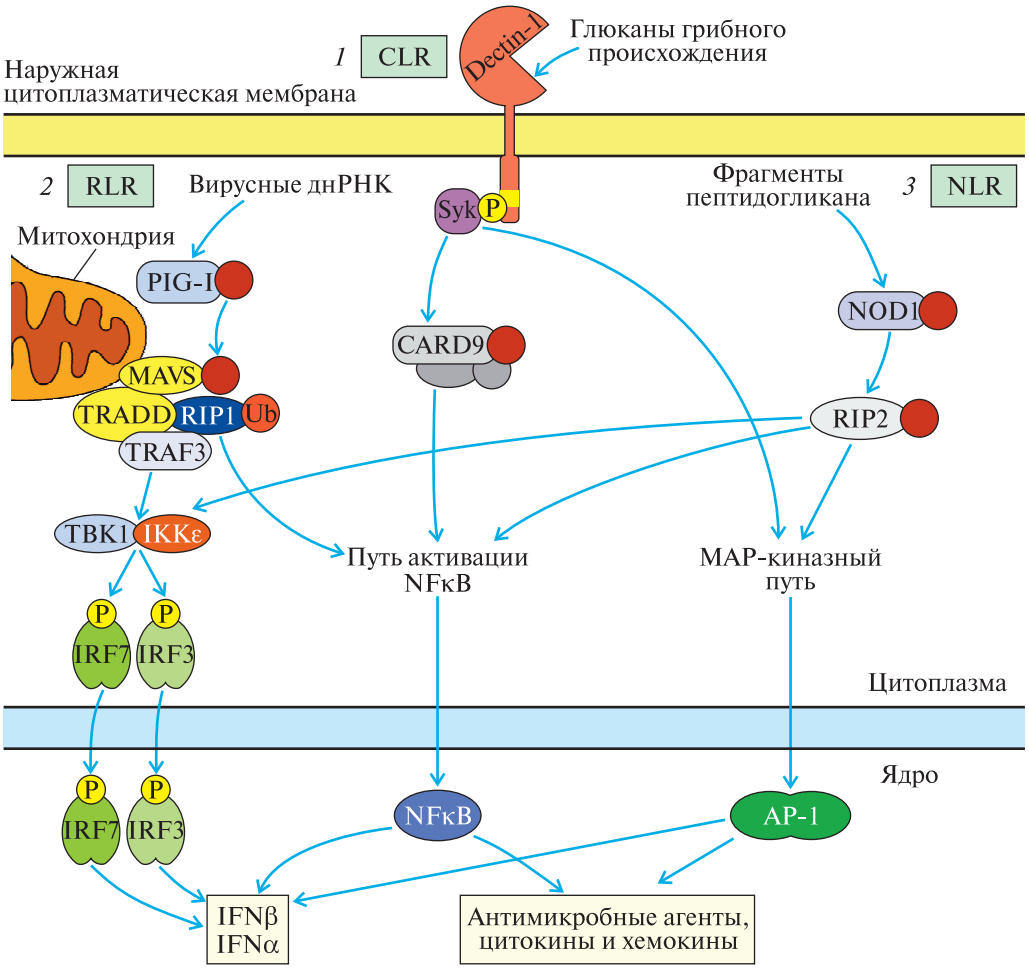


Рис. 20. Пути передачи сигналов от:
1 – мембранных С-лектиновых рецепторов; *2* – цитозольных рецепторов RLRs; *3* – NLRs (по 2013-KUBY Immunology).
Пояснения приводятся в основном тексте

В цитоплазматической части С-лектиновых рецепторов есть последовательность ITAM (от англ. **i**mmunoreceptor **t**yrosine-based **a**ctivation **m**otif), в которой при связывании рецептором лиганда соответствующими мембрансвязанными тирозинкиназами семейства Src фосфорилируются остатки тирозина, после чего с фосфорилированным ITAM связывается тирозинкиназа Syk (аббревиатура образована от англ. названия этого фермента **s**pleen tyrosine **k**inase, что переводится как «селезеночная тирозиновая киназа», но в аббревиатуре применено однобуквенное обозначение остатка тирозина – Y). Активированная таким образом Syk запускает описанный выше MAP-киназный каскад, приводящий к образованию фактора транскрипции AP-1, и одновременно другой путь, идущий через белок CARD9.

Этот белок имеет связывающий каспазы домен (CARD), который обозначен на рис. 20 окружностью коричневого цвета. CARD9 после активации киназой Syk

связывает белок Bcl-10 (**B-c**ell **l**ymphoma/leukemia 10), который также имеет CARD, т. е. связывание идет здесь за счет CARD–CARD-взаимодействия. Далее к ним присоединяется белок MALT1 (от англ. **m**ucosa **a**ssociated **l**ymphoid tissue lymphoma **t**ranslocation gene 1), и получившийся комплекс активирует IKK, освобождающую NFκB от ингибитора (на рис. 20 вспомогательные белки Bcl-10 и MALT1 не подписаны, подробности пути освобождения NFκB также опущены). Таким образом, и здесь в результате передачи сигнала запускается продукция провоспалительных цитокинов и усиливается образование хемокинов и антимикробных пептидов.

Рецепторы группы RLRs, в том числе и взятый для примера RIG-1, также используют для проведения сигнала CARD–CARD-взаимодействие. Именно за счет него RIG-1 присоединяется к находящемуся на мембране митохондрий белку MAVS (от англ. **m**itochondrial **a**nti-**v**iral **s**ignaling protein). После этого MAVS связывается с TRADD (**T**umor Necrosis Factor **R**eceptor Type 1 **A**ssociated **D**eath **D**omain Protein) и белком RIP1 (**r**eceptor-**i**nteracting **p**rotein 1). Белок RIP1 интересен тем, что структура позволяет ему участвовать в процессах убиквитинирования и деубиквитинирования, от которых зависит дальнейший ход событий. В зависимости от состояния RIP1 клетка может либо перейти на путь апоптоза, либо осуществлять продукцию провоспалительных цитокинов и интерферонов. При реализации второго пути подключается белок TRAF3 и образуются комплексы, приводящие к формированию NFκB, а также IRF7 и IRF3 по описанным выше путям.

В проведении сигналов от NLRs (в частности, NOD1) также срабатывает взаимодействие CARD–CARD. Именно за счет него связавшийся с лигандом NOD1 присоединяется к RIP2, который запускает и ведущий к образованию AP-1 MAPK-каскад, и путь освобождения NFκB, и путь образования IRF3 и IRF7.

Рассмотренные сигнальные пути описывают реакцию клеток непосредственно на образы патогенности, и, как вы уже знаете, в большинстве случаев эта реакция заключается в продукции молекул, призванных усиливать активацию участвующих в защите клеток. Эти эндогенного происхождения сигналы также воспринимаются клетками через соответствующие рецепторы, от которых начинаются свои внутриклеточные сигнальные пути.

Например, для имеющих существенное значение в реакциях врожденного иммунитета интерферонов есть целое семейство рецепторных молекул. **Интерфероновые рецепторы** представляют собой гетеродимеры, состоящие из цепей α и β. К настоящему времени описаны 12 разновидностей индивидуальных цепей интерфероновых рецепторов, которые, сочетаясь определенным образом в пары, дают не менее 27 вариантов димерных функциональных рецепторов, различающихся по специфичности. По этой причине интерфероновые рецепторы в общем плане связывают не только, условно говоря, классические интерфероны, но и определенные интерлейкины, в частности шесть интерлейкинов из семейства IL-10. Однако, несмотря на различия в специфичности связывания, все интерфероновые рецепторы реализуют передачу внутриклеточного сигнала по общей для них схеме (рис. 21).

Две субъединицы рецептора в отсутствие интерферона находятся на наружной мембране рядом, но на таких расстояниях, что передача сигнала внутрь клетки невозможна. При связывании интерферона эти субъединицы сближаются таким образом, что постоянно присоединенные к их цитоплазматическим доменам адаптерные белки семейства Jaks (от англ. **J**anus **a**ctivated **k**inases) могут перейти в активное состояние.

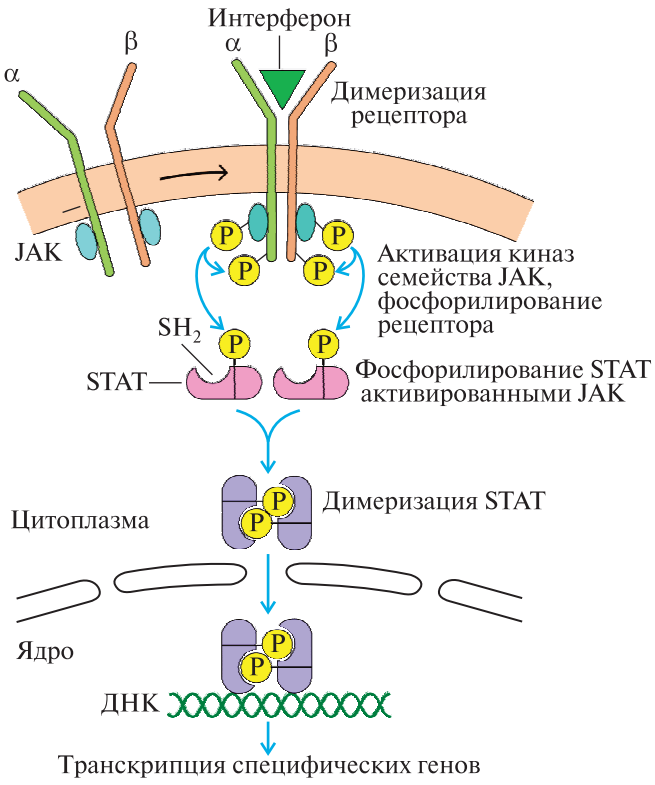


Рис. 21. Путь передачи сигнала от рецепторов для интерферонов (по 2013-KUBY Immunology). Пояснения приводятся в основном тексте

Происхождение названия этого семейства протеиновых тирозиновых киназ достаточно интересно. Первые две киназы были открыты в 1989 г. при ПЦР-анализе сделанной на основе фага M13 библиотеки генов мышиных клеток линии FDC-P1, в ходе которого вели целенаправленный поиск генов, кодирующих ферменты именно с такой активностью. В этом случае связать открытые гены и кодируемые ими белки с определенной функцией не было возможным, поэтому для их названия использовали фразу «just another kinase» (условно «еще одна какая-то другая киназа») и обозначили коротко Jak1 и Jak2, чтобы не путать. Когда же удалось выяснить структуру продуктов этих генов, то сокращения стали иметь совершенно иной смысл. Оказалось, что у ферментов этого семейства имеется два расположенных рядом домена, один из которых, собственно, и делает этот фермент тирозинкиназой, а второй, несмотря на очень близкий к первому аминокислотный состав, ингибирует киназную активность. И тогда кто-то сравнил такую киназу с древнеримским божеством Янусом двуликим (two-faced Janus), и это прижилось настолько, что теперь данные ферменты называют Янус-киназами.

В настоящее время в семейство Jaks входят пять киназ: Jak1, Jak2, Jak3, Tyk1 и Tyk2, и все они имеют отношение к сигнальным путям, получившим название Jak-STAT. В таких путях обязательно задействован один из семи STAT-белков

(от англ. **S**ignal **T**ransducer and **A**ctivator of **T**ranscription), которые находятся в цитоплазме клеток в мономерном состоянии и поэтому не могут проявить свою активность как активаторы транскрипции. Для перехода в активное состояние таким белкам необходима димеризация, причем семь членов этого семейства (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6) могут образовывать гомо- или гетеродимеры. Димеризация осуществляется после фосфорилирования тирозинкиназами Jak-семейства, которые, как указывалось выше, переходят в активное состояние только после связывания рецептора с лигандом.

Активные формы STAT проникают в ядро и либо сразу срабатывают как активаторы транскрипции, либо связываются с некоторыми ядерными белками. Например, гомодимер STAT1 передает сигнал от рецептора для γ-интерферона путем прямого связывания с последовательностью GAS (**G**amma-Interferon **A**ctivated **S**equence) в промоторных областях генов группы ISG (**I**nterferon **S**timulated **G**enes). В то же время при передаче сигнала от рецептора для IFN1 работает гетеродимер STAT1-STAT2, который в ядре объединяется с IRF9 (**I**nterferon **R**esponse **F**actor 9), в результате чего формируется ISGF3 (**I**nterferon **S**timulated **G**ene **F**actor 3). Полученный таким образом активатор транскрипции взаимодействует с последовательностью ISRE (**I**nterferon-**S**timulated **R**esponse **E**lement) в промоторных областях ISG.

Рецепторы для интерлейкинов семейства IL-1 также состоят из двух цепей. Классический рецептор, связывающий и IL-1α, и IL-1β, включает в себя цепь IL-1RI (рецептор для интерлейкина-1 типа I, т. е. первого типа) и цепь вспомогательного белка IL-1RAcP (от англ. **IL-1 R**eceptor **Ac**cessory **P**rotein). Обе цепи имеют в своих цитоплазматических участках домен TIR (рис. 22). При связывании рецептором молекулы IL-1 происходят конформационные изменения в цитоплазматических участках цепей, что дает возможность TIR-доменам активировать белок MyD88, который запускает характерный для него сигнальный путь, имеющий две ветви. Как результат, в клетке появляются два мощных активатора транскрипции, обеспечивающие экспрессию нужных генов.

Сигнальные пути для других членов семейства IL-1 реализуются сходным образом. Различия обнаружены только в составе собственно рецепторов. Так, рецептор для IL-18

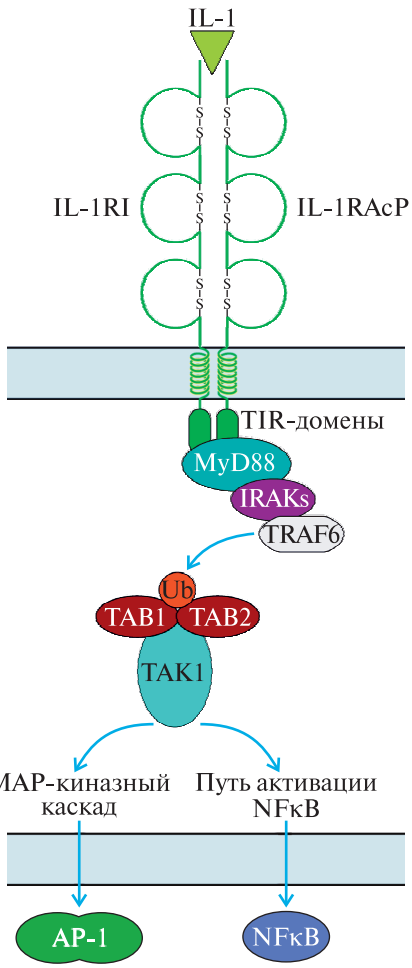


Рис. 22. Передача сигнала от рецептора для IL-1 (по 2013-KUBY Immunology). Пояснения приводятся в основном тексте

также представляет собой гетеродимер, но его составляющими являются специальные белки IL-18Rα и IL-18Rβ. Рецептор для IL-33 состоит из белка IL-1RAcP и недавно открытого белка IL-1RL1 (он же упоминается в литературе как T1/ST-2). В обоих вариантах рецепторов срабатывают TIR-домены, активирующие MyD88.

Описанный выше Jak-STAT-путь используется клетками при воздействии на них не только интерлейкинов подсемейства IL-1 и интерферонов, но и ряда других цитокинов (интерлейкинов). В определенной мере это обусловлено структурой рецепторов, способных узнавать эти интерлейкины. Фактически многие из таких рецепторов представляют собой комбинации определенных белковых цепей. Часть таких цепей являются одинаковыми (или, как иногда пишут, общими) в рецепторах для различных интерлейкинов. Специфичность рецептора к конкретному интерлейкину определяет α-цепь, а осуществление внутриклеточной передачи сигнала – вторая цепь, либо β, либо γ. Цепь β входит в состав рецепторов для IL-3, IL-5 и для гранулоцит-моноцит-колонийстимулирующего фактора (GM-CSF). Цепь γ более общая – она обнаружена в димерных рецепторах для IL-4, IL-7, IL-9 и IL-21, а также в тримерных рецепторах для IL-2 и IL-15. Именно поэтому дефекты гена, кодирующего γ-цепь, приводят к тяжелому иммунодефициту – X-сцепленной тяжелой комбинированной иммунной недостаточности. Еще одна общая для ряда рецепторов цепь обозначена как gp130 и входит в состав рецепторов для IL-6, IL-11, IL-27.

Варианты Jak-STAT сигнальных путей несколько различаются в деталях (табл. 8), но приводят к практически сходным, уже известным вам результатам – появлению активных димеров STAT-белков, обеспечивающих транскрипцию определенных генов.

Таблица 8

Компоненты Jak-STAT сигнальных путей, идущих от различных рецепторов

Рецептор для	Jak-компонент	STAT-компонент
IFN1α/β	Jak1, Tyk2	STAT1, STAT2
IFNγ	Jak1, Jak2	STAT1
IL-2	Jak1, Jak3	В большинстве случаев STAT3 и STAT5, но может быть и STAT1
IL-4	Jak1, Jak3	В большинстве случаев STAT6, но может быть и STAT5
IL-6	Jak1, Jak2	STAT3
IL-7	Jak1, Jak3	STAT5, STAT3
IL-12	Jak1, Tyk2	STAT2, STAT3, STAT4 и STAT5
IL-15	Jak1, Jak3	STAT5
IL-21	Jak1, Jak3	В большинстве случаев STAT1 и STAT3, но может быть и STAT5

В последнее время интенсивно исследуется влияние еще одного недавно открытого цитокина – IL-17. Выяснилось, что этот интерлейкин существует как ми-

нимум в восьми вариантах (шесть из них обозначаются буквами латинского алфавита от IL-17A до IL-17F), поэтому речь идет уже о семействе IL-17.

Основными продуцентами этих цитокинов являются не клетки первой линии защиты, а особая группа активированных Т-лимфоцитов, которые получили название «Т-хелперы 17» именно из-за этого свойства. Хотя, как мы увидим дальше, T_H17 появляются в ходе адаптивного иммунного ответа, выделяемый ими интерлейкин оказывает влияние и на клетки первой линии защиты.

Рецепторы для IL-17 обнаружены на NK-клетках, но, что более важно, и на тучных клетках, нейтрофилах, тканевых макрофагах, клетках эпителия желудочно-кишечного, дыхательного и мочевыделительного трактов.

У рецепторов интерлейкинов этого семейства имеются особенности как в строении, так и в сигнальных путях, от них идущих. В частности, все пока открытые рецепторы представляют собой ди- или тримеры, собираемые из пяти вариантов специальных белковых цепей. Одна из этих цепей, IL-17RA, имеет в своей цитоплазматической части три уникальных домена. Один из них называется SEF/IL-17R (**S**imilar **E**xpression to **F**ibroblast growth factor **i**nter**l**eukin **17 R**eceptor), но чаще в литературе его упоминают как SEFIR. Второй домен называется **TIR**-**l**ike **l**oop (TILL), поскольку он похож на TIR-домен толл-подобных рецепторов и рецепторов для IL-1. Третий домен – домен CBAD (полное его название **C**/EBPβ **a**ctivation **d**omain, т. е. активатор фактора транскрипции C/EBPβ). Наличие этих столь разных регуляторных доменов предполагает несколько путей передачи сигналов, берущих начало от рецепторов для IL-17.

Из уже определенных путей можно описать следующие. Наличие TIR-подобного домена в какой-то период времени изучения идущих от рецепторов для IL-17 путей служило основанием для того, чтобы предполагать активацию через них одного из главных провоспалительных факторов транскрипции NFκB. Однако выяснилось, что образование активного NFκB здесь осуществляется по несколько иной схеме. Запуск этого пути опосредован не TIR-подобным доменом, а доменом SEFIR (рис. 23). Именно с ним связывается адаптерный белок ACT1 (он же CIKS, он же TRAF3IP2, он же RAF3-interacting protein 2, он же Nuclear factor NF-kappa-B activator 1), который далее присоединяет к себе TRAF3 и TRAF6, активирует их, а те активируют комплекс TAB1, TAB2, TAK1, что и приводит к образованию свободного NFκB. Данный путь на рис. 23 обозначен цифрой 1.

Эти же TRAF-белки запускают уже известный вам MAP-киназный каскад (путь 2 на рис. 23), заканчивающийся MAP-киназой ERK1, которая здесь проявляет себя не так, как в других путях. Показано, что она не проникает в ядро, а еще в цитоплазме связывает белок тристетрапролин (аббревиатуры для него – TTP от **T**ris**t**etra**p**rolin и ZFP36 от **z**inc **f**inger **p**rotein **36** homolog), обеспечивающий доставку определенных вариантов мРНК (нетранслируемый 3′-конец которых содержит много сочетаний адениловых и урациловых нуклеотидов) в экзосомы клетки, где они разрушаются.

Дело в том, что при индукции генов хемокинов и провоспалительных цитокинов уровень соответствующих этим генам мРНК контролируется с участием тристетрапролина, и ERK1, связывая TTP, повышает в конечном итоге вызванную IL-17 продукцию нужных для развития воспаления белков.

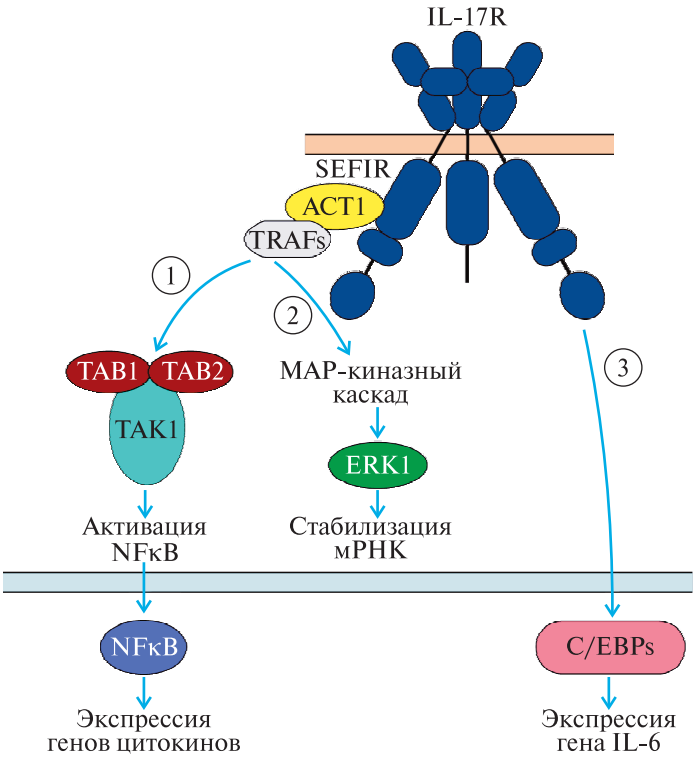


Рис. 23. Сигнальные пути, идущие от рецепторов для IL-17 (по 2013-KUBY Immunology). Пояснения приводятся в основном тексте

Третий путь – это активация C/EBPβ и C/EBPδ за счет специального домена CBAD. Эти два фактора транскрипции (C/EBP расшифровывается как **C**CAAT-**e**nhancer-**b**inding **p**rotein, т. е. связывающийся с последовательностью CCAAT в промоторах определенных генов белок) важны для экспрессии гена, кодирующего мощный провоспалительный цитокин IL-6.

Еще одна важная группа цитокинов в свое время поставила серьезную задачу перед иммунологами, работающими в области изучения сигнальных путей. Речь идет о цитокинах семейства TNF, которые уже даже по названию – «факторы **некроза** опухолей» – явно отличаются от остальных цитокинов. Все-таки большинство интерлейкинов активируют, а не убивают клетки, и открытые сначала как факторы смерти цитокины также не оказались в этом смысле исключением. Особенностью является то, что одни и те же молекулы могут как стимулировать клетки на продукцию определенных веществ, так и служить сигналом апоптоза. (По современным представлениям название цитокинов этой группы, учитывая разницу между апоптозом и некрозом, следовало бы поменять на факторы апоптоза, но, отдавая дань истории иммунологии, никто это делать не будет.) Объяснение такому двоякому действию одних и тех же молекул кроется в структуре рецепторов, с помощью которых клетки реагируют на присутствие данных веществ.

Во всех **рецепторах суперсемейства TNFR** в цитоплазматической части имеется домен, получивший название DD (от англ. **d**eath **d**omain, т. е. домен смерти). Рецептор для фактора некроза опухолей α состоит из трех цепей, которые расположены рядом, но так, чтобы домены смерти не соприкасались. Когда к рецептору снаружи клетки присоединяется TNF, цепи сближаются за счет конформационных изменений, и возникает контакт между DD (рис. 24).

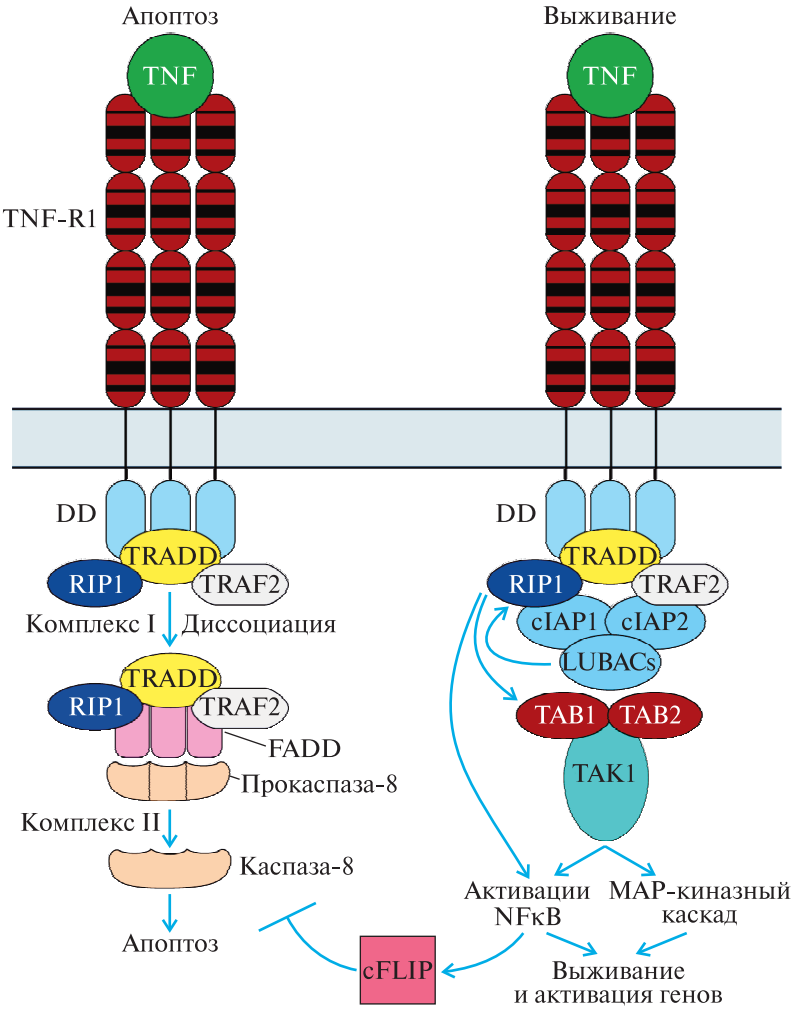


Рис. 24. Сигнальные пути, идущие от рецептора для TNF (по 2013-KUBY Immunology). Пояснения приводятся в основном тексте

Это позволяет присоединиться к рецептору адаптерному белку TRADD (от англ. **T**NF **r**eceptor 1-**a**ssociated protein, но с добавлением **DD**). Добавление сделано не зря – в этом белке тоже есть домен смерти, за счет которого и происходит связывание с тримерным доменом смерти в рецепторе. Связавшийся с рецептором TRADD присоединяет к себе белки TRAF2 (**T**NF **R**eceptor **A**ssociated **F**actor **2**)

и RIP1. Название второго белка происходит от англ. фразы «**r**eceptor-**i**nteracting **p**rotein 1», т. е. взаимодействующий с рецептором белок 1, однако некоторые авторы приводят иную расшифровку данной аббревиатуры. Чтобы подчеркнуть значимость такого протеина в развитии апоптоза, его иногда называют **R**est **I**n **P**eace («покойся в мире»), эту фразу обычно произносят на похоронах в конце молитвы. Дело в том, что приводящий к апоптозу сигнальный путь реализуется по следующей схеме (левая часть рис. 24). Если сочетание TRADD, TRAF2 и RIP1 отделяется от основания рецептора, в цитоплазме клетки появляется так называемый комплекс I. Он присоединяет к себе белок FADD (**F**as-**A**ssociated **D**eath **D**omain-containing protein), причем здесь также срабатывает взаимодействие доменов смерти, имеющихся в белках TRADD и FADD. Возникает комплекс II, присутствие в котором серин-треониновой киназы RIP1 обеспечивает превращение нескольких молекул неактивной прокаспазы-8 в активную каспазу-8. Название «каспаза» (в англ. **casp**ase) происходит от того, что в этой протеазе в активном центре есть цистеиновые остатки (в англ. **c**ysteine), которые способствуют расщеплению пептидной связи сразу за остатком аспарагина (**asp**aragine).

Получающиеся при действии комплекса II молекулы каспазы-8 расщепляют и тем самым активируют прокаспазу-3 и прокаспазу-7. Появившиеся каспазы 3 и 7 активируют эндонуклеазы, которые разрезают всю ДНК в клетке на фрагменты длиной около 240 пар оснований, запускают перестройку мембран эндоплазматической сети и ядерной мембраны, разрушают белки, сдерживающие развитие апоптоза (антиапоптотические протеины). В результате от клетки остается несколько замкнутых мембранных образований, в которых содержатся остатки ее содержимого. Эти небольшого размера мембранные везикулы легко фагоцитируются клетками иммунной системы, при этом никаких провоспалительных сигналов не возникает. Только что описанная картина и есть апоптоз, или программированная клеточная гибель, которая, в отличие от некроза, проходит без включения защитных механизмов, например воспаления.

Итак, в этом случае RIP1-TRAF2 действительно сработали как сигналы гибели. Но если эти две молекулы не отделяются от основания рецептора для TNF, то они же запускают активационные пути (правая часть на рис. 24). К ним присоединяются убиквитинлигазы cIAP1 и cIAP2 (от англ. **c**ellular **i**nhibitor of **a**poptosis 1 and 2), связывающие, в свою очередь, белки LUBAC (The **li**near **ub**iquitin chain **a**ssembly **c**omplex). Полиубиквитированный RIP1 связывает белки NEMO и TAK1, что запускает оба пути образования активного NFκB. Через TAK1 запускается и MAP-киназный каскад, дающий другие активаторы транскрипции. Так что ни о какой гибели клетки речь в этом случае не идет, тем более что работа активного NFκB в ядре приводит к появлению специального сдерживающего апоптоз белка cFLIP (от англ. **C**ellular **F**ADD-**l**ike IL-1β-converting enzyme-**i**nhibitory **p**rotein), одного из наиболее сильных антиапоптотических регуляторов.

При рассмотрении интерлейкинов уже отмечалось, что существует группа молекул, воздействие которых на подвижные клетки определяет направление их движения. Из этого следует, что должны существовать сигнальные пути, запускающие механизмы движения. В процессе поиска таких путей выяснилось, что проведение именно таких сигналов связано с особенностями структуры рецепторов для хемокинов и адаптерными белками к этим рецепторам.

Хемокиновые рецепторы отличаются от многих других используемых клетками иммунной системы наличием в одной белковой цепи семи трансмембранных участков. Внеклеточные домены такого рецептора определяют специфичность связывания с хемокином, а направленные внутрь клетки участки обладают способностью взаимодействовать с полимерными формами G-белков. В широком смысле название «G-белки» традиционно применяют к белкам, способным связываться с гуанидиновыми нуклеотидами – гуанидинтрифосфатом (ГТФ) и гуанидиндифосфатом (ГДФ). Часть таких белков существует в мономерной форме и может быть адаптерными белками в определенных сигнальных путях (например, в Ras-пути, описанном выше), но с рецепторами для хемокинов связываются тримерные формы G-белков, состоящие из субъединиц Gα, Gβ и Gγ. Когда наружная часть рецептора не соединена с хемокином, такие белки связаны с ГДФ. Однако если рецептор загружается хемокином, происходят конформационные изменения во внутриклеточных доменах, в результате чего в субъединице Gα ГДФ заменяется на ГТФ. Как и положено G-белкам при таких заменах, Gα переходит в активированное состояние и отсоединяется от двух остальных субъединиц.

Фактически такое отделение Gα-цепи превращает ее в полное подобие так называемых малых (мономерных) G-белков, которые, как известно, обладают собственной ГТФазной активностью и быстро из-за этого переходят в неактивное ГДФ-состояние. Кроме того, существуют специальные белки GAPs (от англ. **G**TPase **A**ctivating **P**roteins), которые ускоряют этот переход. Такие белки не зря имеют второе название «регуляторы G-протеинового сигналинга» (в англ. аббревиатуре RGSs от **R**egulators of **G**-protein **S**ignaling), так как от их присутствия и концентрации зависит дальнейшее развитие событий. Если Gα быстро возвращается в неактивную форму, то она вновь присоединяется к димеру Gβ-Gγ и сигнальные пути, обозначенные на рис. 25 цифрами 1, 2 и 3, не реализуются.

Сохранение же Gα в активном состоянии определяет запуск пути, который начинается с активации малого G-белка Rho и приводит в конечном итоге к перестройкам цитоскелета клетки, обеспечивающим ее хемотаксическое перемещение (путь 3 на рис. 25). Путь 2 также инициируется активной формой Gα, которая способствует активации одной из форм фосфолипазы C, а именно PLCβ. Этот фермент в активном состоянии определяет через ряд известных вам этапов появление в клетке активного фактора NFκB.

При этом остающийся в свободном состоянии димер Gβ-Gγ также служит инициатором сигнальных путей. Именно от него начинается активация белков, приводящая к осуществлению Ras/MAP-киназного пути, результатом которого выступает появление еще одного активатора транскрипции AP1 (путь 1 на рис. 25).

Повышение уровня образования NFκB и AP1 объясняет множественный эффект действия некоторых хемокинов, например IL-8, который не только способствует перемещению лейкоцитов в очаг воспаления как хемоаттрактант, но и стимулирует их фагоцитарную активность и продукцию ими цитокинов, усиливающих воспаление. Фактически под влиянием этих факторов осуществляется индуцируемая экспрессия десятков генов, продукты которых работают на усиление всего комплекса защитных реакций.

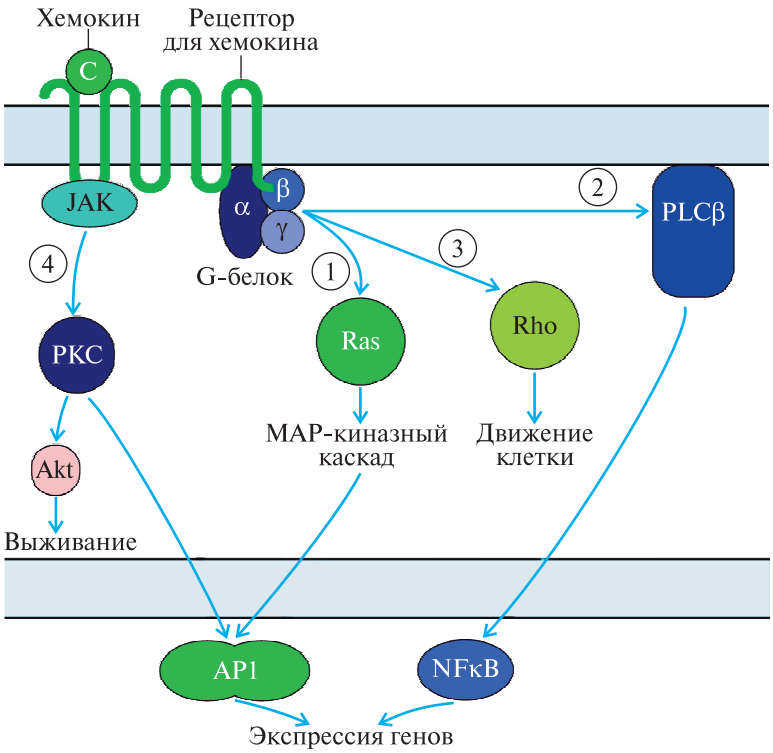


Рис. 25. Сигнальные пути от рецепторов для хемокинов (по 2013-KUBY Immunology). Пояснения приводятся в основном тексте

К настоящему времени показано, что хемокиновые рецепторы могут работать не только через ассоциированные с ними тримерные G-белки. Внутриклеточные домены таких рецепторов могут быть ассоциированы с киназами семейства Jak, которые при связывании хемокина активируются и переводят в активное состояние протеинкиназу C. Она через свой путь (на рис. 25 это путь 4) способствует появлению AP1 и образованию активной формы одной из трех протеинкиназ B, а именно PKBα (этот фермент называют также Akt1). Эта протеинкиназа – один из регуляторов процесса размножения клеток, как правило, она стимулирует деление и ограничивает развитие апоптоза.

Заканчивая рассмотрение некоторых из путей восприятия и передачи клетками сигналов в ходе реализации защитных реакций первой линии (врожденного иммунитета), хочется отметить следующее. Уже на этом этапе исследований выявлена сложная сеть сигнальных путей, которая динамично изменяется в зависимости от количества и мощности воздействующих на клетки факторов. Понятно, что нынешний уровень знаний не может пока дать полной картины функционирования и регуляции этой сети, но сведения накапливаются в данной области иммунологии в последние годы все возрастающими темпами. Часть такой информации уже служит основой для разработки практических подходов в решении проблем врожденных и приобретенных иммунодефицитов, а также для улучшения профилактических и терапевтических мер борьбы с инфекционными болезнями.

ИММУНИТЕТ К ИНФЕКЦИОННЫМ БОЛЕЗНЯМ

3

В современном понимании иммунитет к заразным болезням разделяется на **врожденный** (он же наследственный, или видовой) и **приобретенный** (или индивидуальный). Такого рода разделение базируется на следующем. Любая вызванная инфекционным началом болезнь с биологической точки зрения представляет собой случай симбиоза, т. е. продолжающегося какое-то время сожительства как минимум двух организмов, один из которых (так называемый хозяин) является средой обитания для другого. Причем, поскольку речь идет о болезни, такое сожительство для хозяина неблагоприятно, и такого рода симбиоз расценивается как паразитизм, а возбудителя болезни называют паразитом. Все случаи паразитизма, которые нам доводится наблюдать в окружающей природе, представляют результат длительной совместной эволюции когда-то вступивших в симбиотические взаимоотношения видов, и инфекционные болезни в данном случае не являются исключением.

Как упоминалось выше, большинство видов высокоорганизованных животных обладают конститутивными защитными факторами, препятствующими заселению своей внутренней среды какими-либо другими организмами. Приобретение и совершенствование этих факторов в ходе эволюционного процесса организмов-хозяев приводило к тому, что многие стремящиеся к колонизации и использованию других организмов виды утрачивали способность поражать организмы, ранее служившие им хозяевами. Однако эволюция паразитических видов, проходившая при постоянном контакте с видами-хозяевами, приводила к совершенствованию факторов патогенности и вирулентности паразитов. В связи с этим все наблюдаемые нами сочетания хозяин – паразит отличаются, во-первых, высокой степенью специфичности, а во-вторых, являются примером достигнутого в ходе эволюции равновесия между защитными факторами хозяина и факторами патогенности и вирулентности паразита. Условно говоря, если бы в длительной многовековой борьбе хозяина и паразита победил любой из противодействующих партнеров, это привело бы к исчезновению в ходе эволюции какого-либо из данных видов, и мы не имели бы возможности наблюдать такое сочетание, как инфекционное заболевание. Вероятно, именно с таких позиций можно объяснять невосприимчивость, например, человека как *Homo sapiens* ко многим

болезням, поражающим другие виды млекопитающих. Такой иммунитет и принято считать **врожденным**, или **видовым**, поскольку любая особь данного вида защищена от паразитов других видов возникшими в ходе эволюции именно данного вида особенностями.

Понятие же **приобретенного иммунитета** касается защиты от тех паразитов, которые способны преодолевать конститутивные защитные барьеры (непроницаемость покровов, фагоцитоз, комплемент, воспаление) организмов конкретного вида. Причем такого рода защита возникает только в результате контакта с инфекционным началом и у каждой особи данного вида независимо от других, поэтому его и называют **индивидуальным**. В формировании такого иммунитета основную роль играют индуцибельные защитные факторы, и именно здесь наиболее полно проявляют себя особенности специализированной системы организма, называемой иммунной.

Базируясь на данных медицины, микробиологии и иммунологии, люди получили возможность направленно вызывать приобретенный иммунитет к инфекционным заболеваниям, поэтому в настоящее время его принято делить на естественный и искусственный. **Искусственный иммунитет** можно вызвать двумя основными путями. Первый предполагает обеспечение контакта с болезнетворным началом, осуществляемого таким образом, чтобы иммунная система получила возможность специфически на него отреагировать, но при этом в организме не развились симптомы заболевания в той степени, которая характерна для возникшей естественным путем болезни. В идеале вакцины – препараты, с помощью которых создают искусственный иммунитет, – вообще не должны вызывать у вакцинированных каких-либо нежелательных реакций, однако не все из производимых в настоящее время вакцин этому требованию соответствуют.

Современные применяемые в ветеринарии и медицине для профилактики или лечения **вакцинные препараты** принято условно делить на несколько групп. Прежде всего это так называемые **живые вакцины**, содержащие жизнеспособные болезнетворные микроорганизмы, но такие их варианты, которые не способны вызвать заболевание. Из применявшихся в практике вакцинации препаратов известны гетеро- и гомологичные живые вакцины. Примерами гетерологичных вакцин являются вакцинные препараты Э. Дженнера и противотуберкулезные вакцины на основе возбудителя мышиного туберкулеза. В обоих случаях в организм прививаемых людей вводили микроорганизмы, вызывающие сходные заболевания у других млекопитающих – коров и мышей соответственно. Под гомологичными живыми вакцинами понимают штаммы микроорганизмов, относящиеся к патогенному для человека виду, но имеющие более низкую степень патогенности и вирулентности по сравнению с обычными штаммами. Получить такие аттенюированные (т. е. ослабленные по вирулентности) штаммы можно либо путем пассирования через организм маловосприимчивого хозяина, либо путем длительного культивирования на питательных средах без контакта с хозяином, либо путем отбора спонтанных или индуцированных мутантов исходных высоковирулентных форм. При этом в ходе получения пригодного для вакцинации штамма необходимо так произвести ослабление вирулентности, чтобы не произошло исчезновения или сильного ослабления иммуногенности, т. е. способности вызывать иммунный ответ. Следует отметить, что именно по способности вызывать хорошо выражен-

ный иммунный ответ живые вакцины превосходят все другие вакцинные препараты. Объяснением этому, вероятно, является сохранение живой клеткой или вирусной частицей большинства антигенов, на которые способна реагировать иммунная система, что и делает иммунный ответ наиболее широким по набору антител и клеток иммунологической памяти и, следовательно, более полноценным.

Вторую группу составляют препараты, содержащие не разрушенные, но лишенные жизнеспособности клетки или вирусные частицы возбудителя, так называемые **убитые вакцины**. Для их получения стараются применять такие способы умерщвления микроорганизмов (нагревание, обработка определенными химическими веществами), которые бы не разрушали их основные антигены. Естественно, что в каждом конкретном случае при разработке того или иного препарата приходится эмпирически подбирать условия обработки, что обусловлено особенностями строения антигенов различных возбудителей. Такие вакцины считаются более безопасными, поскольку по сравнению с вакцинами первой группы вызвать заболевание даже у лиц с ослабленным иммунным статусом они не способны. Однако и у этих препаратов имеются свои недостатки. Во-первых, возникающий после их введения иммунитет обычно менее продолжителен и является более слабым по напряженности (выраженности), чем после введения вакцин первой группы. Во-вторых, большинство таких вакцин может давать нежелательные побочные эффекты, особенно у лиц, предрасположенных к аллергическим реакциям. Для предотвращения такого рода нежелательных эффектов еще в начале XX в. было предложено химически очищать препараты убитых и разрушенных бактериальных клеток или вирусных частиц от так называемых балластных (необязательных для выработки нужного иммунного ответа) компонентов. Это привело к появлению еще двух групп вакцинных препаратов.

Прежде всего, базируясь на проведенных в конце XIX в. наблюдениях медиков и микробиологов, иммунологи пришли к выводу, что при некоторых заболеваниях основное поражение организма-хозяина возникает под действием конкретных вырабатываемых патогеном веществ – токсинов – и что для защиты организма от данной болезни достаточно выработки им антител именно против таких токсинов. Эксперименты, в которых организмам в небольших дозах вводили очищенные препараты токсина, подтвердили правильность такого направления, и дальнейшие исследования привели к созданию особой группы вакцин, так называемых **анатоксинов**. Это используемые для вакцинации препараты, содержащие особым образом обработанный очищенный токсин, причем его обработка должна проводиться так, чтобы токсин утратил свои токсические свойства (отсюда название: приставка **ана-** обозначает в данном случае отрицание, т. е. нетоксин), но обязательно сохранил иммуногенность.

Однако не во всех случаях симптомы заболевания связаны только с токсинами и для выработки полноценного иммунного ответа необходима выработка антител против конкретных антигенов бактериальных клеток или вирусных частиц. Очищая и концентрируя такие конкретные антигены, и создают вакцины четвертой группы. Поскольку при изготовлении подобных препаратов применяют методы химической очистки веществ, такие вакцины в русскоязычной литературе традиционно называют **химическими**. Хотя эти вакцины, к сожалению, дороги в производстве, безопасность и наименьшая способность вызывать нежелательные побоч-

ные эффекты делает их наиболее предпочтительными для применения. В конце XX в. благодаря развитию генетической инженерии появились новые возможности получения таких вакцин. Особенные трудности в разработке и производстве вакцинных препаратов создает обязательное обеспечение строжайших мер безопасности при работе с патогенами, поэтому возможности клонирования генов, контролирующих выработку основных антигенов болезнетворных бактерий или вирусов, и переноса их в другие организмы открывают огромные перспективы. Получение рекомбинантных (трансгенных) организмов, синтезирующих основные антигены возбудителей, значительно упростило бы и удешевило производство вакцинных препаратов.

Во многих странах интенсивно проводятся подобные исследования, среди которых можно выделить несколько основных направлений. Первое – получение трансгенных одноклеточных (бактерий и дрожжей), в клетках которых добиваются повышенной экспрессии генов болезнетворных бактерий или вирусов. Второе – получение рекомбинантных вирусов на основе вирусов растений и вирусов, вызывающих заболевания у человека или животных. Желательно, чтобы такие гибридные вирусные штаммы сохраняли способность репродуцироваться в клетках растений, но при этом не вызывали у растения серьезного заболевания и, конечно же, обеспечивали синтез антигенов вирусов, патогенных для млекопитающих. Размножение таких гибридных вирусов в растениях и последующее выделение уже из растительного материала нужных для создания вакцины антигенов открывает возможности для производства наиболее дешевых вакцинных препаратов. Третье направление предполагает создание трансгенных растений, способных синтезировать нужные антигены. Из биомассы названных растений также можно получать вакцинные препараты различного назначения или же, если антиген может вызвать иммунный ответ при пероральном (через рот) введении, такие растения можно будет употреблять в пищу не только как продукт питания, но и как вакцинный препарат.

Следует отметить, что против некоторых болезней существуют вакцинные препараты, принадлежащие к различным группам. Это связано как с исторически складывавшимися условиями и путями разработки вакцин в разных странах, так и с постоянным поиском более эффективных, дешевых и безопасных, чем уже применяющиеся, вакцин.

Поскольку широкомасштабная вакцинация населения и сельскохозяйственных животных требует значительных затрат не только на производство препаратов, но и на их применение (имеется в виду оплата труда осуществляющих введение вакцин медиков и ветеринаров), ведутся разработки **комплексных вакцин**, содержащих антигены различных болезнетворных микроорганизмов. Так называемые поливакцины (чаще всего это ди-, три- и реже тетравакцины) уже имеют применение, и проводится постоянная работа по созданию новых подобных препаратов.

Создаваемый с помощью вакцин искусственный иммунитет называют **активным**, поскольку в организме вакцинируемых в результате развившегося иммунного ответа сохраняются клетки иммунологической памяти, и при последующих контактах с таким же возбудителем организм гораздо быстрее, чем при первом контакте, отвечает размножением иммунокомпетентных клеток нужной специфичности и, как правило, выработкой защищающих его антител. Такая форма иммунитета чаще всего сохраняется в течение нескольких лет.

Вторая же форма искусственного иммунитета создается путем введения в организм уже готовых, выработанных в другом организме антител против конкретного возбудителя. Этот иммунитет сохраняет эффективность около месяца, поскольку введенные антитела постепенно разрушаются в плазме крови, а собственных антител, способных защитить от данного возбудителя, организм не вырабатывает. По этой причине создаваемый с помощью содержащих антитела препаратов (их обычно называют сыворотками) искусственный иммунитет называют **пассивным**.

Получение сывороток, пригодных для создания искусственного пассивного иммунитета, осуществляют чаще всего путем проводимой по специальной схеме длительной иммунизации животных возбудителем какого-либо заболевания человека. При этом животное не болеет, но в его организме развивается иммунный ответ, приводящий к выработке значительных количеств антител. После достижения максимальной эффективности иммунного ответа кровь животных освобождают от клеток, фибриногена и по возможности от других, не относящихся к иммуноглобулинам белков. Возможно также получение сывороток и из донорской крови высокоиммунных по отношению к конкретной болезни людей, однако такие сыворотки изготавливают значительно реже.

Для профилактики инфекционных болезней применяют обе формы искусственного иммунитета, но активный искусственный иммунитет распространен гораздо шире. Более чем столетняя история применения массовых **прививок** (так медики традиционно называют введение вакцин) наглядно показала, что иммунизация населения с помощью вакцин является наилучшим способом борьбы с болезнетворными микроорганизмами. Поскольку большинство возбудителей болезней человека – облигатные паразиты, путем создания искусственного активного иммунитета у значительной части населения можно добиться такой ситуации, когда вероятность распространения и поддержания такого вида будет ничтожно мала или же вообще невозможна. По данным эпидемиологов, угроза эпидемий исчезает по достижении иммунитета у 75 % населения, а более высокий процент иммунных людей может привести к полному исчезновению возбудителя того или иного инфекционного заболевания как вида. Примерами эффективности такого подхода может служить отсутствие в настоящее время эпидемий оспы и полиомиелита, ранее наносивших огромный урон человечеству.

С целью профилактики инфекционных болезней пассивный искусственный иммунитет создают, как правило, только у определенного контингента лиц, вынужденных по службе или в силу складывающихся обстоятельств контактировать с болезнетворным началом (врачи, обслуживающий персонал медучреждений, работники соответствующих научно-исследовательских лабораторий и производств). Могут также получать инъекции сывороток и люди, вынужденно контактировавшие с больными во время вспышки, например родственники и соседи заболевших.

Естественный иммунитет возникает без вмешательства человека и представлен двумя формами. Возникающая после перенесенного заболевания невосприимчивость к некоторым болезням, или **постинфекционный иммунитет**, имеет в своей основе развитие у болеющего иммунного ответа, приводящего к формированию и длительному (иногда на всю оставшуюся жизнь) сохранению в организме соответствующих клеток иммунологической памяти. Фактически то, чего медики пытаются достичь путем вакцинации, в данном случае происходит естествен-

ным образом, и данная форма защиты организма именуется **естественным активным иммунитетом**.

Аналогично **естественный пассивный иммунитет** может возникать как результат попадания во внутреннюю среду организма антител, продуцируемых другим организмом. Единственной ситуацией, при которой возможно естественное проникновение антител из одного организма в другой, является период внутриутробного развития у млекопитающих. Установлено, что иммуноглобулины класса G способны преодолевать плацентарный барьер и перемещаться в кровь развивающегося плода из материнского организма. Если концентрация определенных антител оказывается достаточно высокой, то после рождения, до тех пор пока еще сохраняются материнские антитела, младенец может быть невосприимчив к конкретному заболеванию. Необходимо отметить, что в медицинской литературе достаточно часто такой иммунитет называют врожденным, чего по современным представлениям делать не следует, поскольку данная форма зависит от иммунного состояния матери и проявляется не у каждого родившегося, т. е. относится не к видовому, а к индивидуальному иммунитету. Гораздо более удачным и наиболее распространенным в настоящее время вторым названием естественного пассивного иммунитета следует считать термин «**плацентарный иммунитет**».

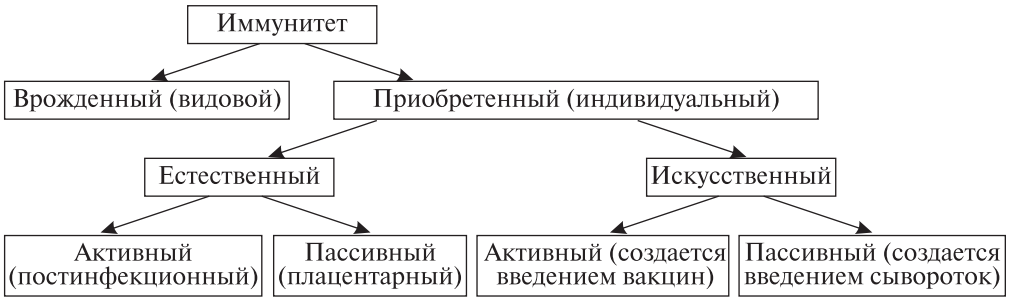


Рис. 26. Схема соотношения форм иммунитета к инфекционным заболеваниям

Изложенная в этом разделе информация приведена в представленной на рис. 26 схеме.

3.1. РАЗВИТИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ТИМУСЗАВИСИМЫЕ АНТИГЕНЫ

История изучения механизмов иммунного ответа, лежащего в основе приобретенной устойчивости к инфекционным заболеваниям, с одной стороны, наглядно демонстрирует сложность самого процесса, а с другой – показывает, что только развитие цитологии, биохимии и молекулярной биологии позволило достичь современного понимания деятельности иммунной системы.

Как упоминалось выше, сведения о том, что в организме перенесших определенное заболевание людей появляются отсутствовавшие до болезни специфические белки (антитела), были получены еще в конце XIX в. Однако информацию

о том, какие именно клетки продуцируют эти молекулы, удалось получить только во второй половине XX в.

Первые предположения о такой роли находящихся в кровотоке клеток (тогда их называли плазматическими) были высказаны в 1950 г. А. Фагреус (A. Fagreus), а клиническое подтверждение датируется 1954 г. Р. Гуд (R. Good) при исследовании больных с отсутствием или с резко сниженным количеством антител (такое состояние называют агаммаглобулинемией) обнаружил, что в большинстве случаев у них отсутствует и часть обычных клеток крови. В следующем году в работе А. Кунса (A. Coons) и соавторов при изучении клеток крови крыс *in vitro* с помощью метода иммунофлюоресценции было показано, что антитела вырабатываются не всеми клетками крови, а только лимфоцитами.

Дальнейшие опыты *in vivo*, проведенные в конце 50-х – начале 60-х гг. XX в., подтвердили роль лимфоцитов в продукции антител. В этих экспериментах животных подвергали радиоактивному облучению в таких дозах, которые приводили к гибели лимфоцитарной фракции клеток крови, а затем вводили конкретный антиген. В отличие от необлученных облученные животные не образовывали антител к применявшемуся антигену, но восстанавливали эту способность после переноса в их организм лимфоцитов, взятых от необлученных особей. Перенос же других клеток крови, не относящихся к лимфоцитам, не приводил к восстановлению продукции антител.

Развитие цитологических методов исследования в 60-х гг. XX в. позволило установить, что лимфоциты неоднородны как по своим морфологическим и антигенным свойствам, так и функционально. Выяснилось, что лимфоциты, в формировании которых участвует тимус (их называют «Т-клетки»), синтезировать антитела не способны, тогда как основной функцией В-лимоцитов как раз и является продукция иммуноглобулинов. Однако для того, чтобы В-клетки могли осуществлять такой синтез, им необходим контакт с Т-лимфоцитами. Наглядно это продемонстрировано в ряде работ конца 1960-х гг., где облученным (и следовательно, не способным к иммунному ответу) животным вводили взятые из организма интактного (необлученного) животного либо клетки из тимуса, либо клетки из красного костного мозга, либо и те и другие вместе. Продукция антител в ответ на последующее введение антигена наблюдалась только у тех животных, которые получали оба типа клеток.

Сходные результаты дали и эксперименты *in vitro*. Суспензии клеток, содержащие только Т- или В-лимфоциты, не отвечали на контакт с антигеном пролиферацией или, тем более, синтезом антител, тогда как подобные эффекты проявлялись в суспензиях, включающих Т- и В-клетки совместно. Однако подобные эксперименты не отличались хорошей воспроизводимостью, что и послужило предпосылкой для более тщательной отработки условий эксперимента. Выяснилось, что к развитию иммунного ответа, по всей видимости, имеют отношение ранее не бравшиеся в расчет клетки – макрофаги.

Одно из первых наблюдений, указывающих на роль макрофагов, было сделано в 1968 г. Дж. Оппенгеймом, Б. Левенталь и Э. Хершем (J. Oppenheim, B. Leventhal, E. Hersh). Они показали, что суспензии лимфоцитов человека в результате пропускания их через колонку со стеклянными шариками теряют способность отвечать на определенные антигены пролиферацией. К этому времени уже было известно,

что отличительной чертой макрофагов является их способность адсорбироваться на стекле, что и позволило исследователям переключить внимание на изучение роли именно этих клеток в развитии иммунного ответа. Подтверждением причастности макрофагов к развитию ответа на антиген стали эксперименты, в которых к утратившим пролиферативный ответ на антиген суспензиям Т- и В-клеток добавляли суспензию макрофагов, и это восстанавливало способность к пролиферации. При этом удалось показать, что для эффективного ответа необходим непосредственный контакт клеток: при разделении макрофагов и лимфоцитов мембраной, пропускающей молекулы и не пропускающей клетки, эффект восстановления исчезал. Более того, было выявлено, что именно макрофаги должны первыми взаимодействовать с антигеном. Схема подтверждающих это экспериментов была следующей.

Если способный вызвать пролиферацию (увеличение численности) В-клеток антиген добавляли к клеточной суспензии, состоящей из макрофагов, Т- и В-лимфоцитов, то в результате наблюдался хорошо выраженный пролиферативный ответ со стороны В-клеток. Если суспензия клеток состояла только из Т- и В-лимфоцитов, пролиферативный ответ последних не фиксировался. Если антиген добавляли к суспензии, состоящей только из макрофагов, выдерживали какое-то время, а затем, освободив суспензию от избытка антигена, смешивали ее с Т- и В-лимфоцитами, имела место четко выраженная пролиферация В-клеток.

Более детальные исследования роли макрофагов в этих процессах не только подтвердили их инициирующую роль, но и позволили описать механизм их участия в формировании иммунного ответа. Именно им стали отводить роль антигенпредставляющих клеток (сокращенно АПК, в англ. аббревиатуре APC), т. е. клеток, которые, захватывая конкретные антигены, находят среди множества различных по специфичности Т-лимфоцитов нужные для ответа на данный антиген.

Полученные таким образом сведения легли в основу ныне общепринятой **схемы трехкооперативного клеточного взаимодействия** в ходе развития иммунного ответа на тимусзависимые антигены. Согласно схеме в отвечающем на проникновение антигена организме происходит:

1) восприятие и переработка заключенной в антигене информации дендритными клетками или клетками макрофагальной системы;

2) передача этой информации клеткам лимфоцитарной системы, а именно Т-лимфоцитам-помощникам (Т-хелперам);

3) активация воспринявших информацию Т-хелперов и их пролиферация;

4) передача информации об антигене третьей группе иммунокомпетентных клеток (либо специализированным макрофагам – клеточный тип иммунного ответа, реализуемый Т-хелперами подтипа 1, либо В-лимфоцитам – тип иммунного ответа, приводящий к продукции специфических по отношению к вызвавшему иммунный ответ антигену антител и реализующийся за счет Т-хелперов подтипа 2);

5) активация воспринявших информацию клеток третьей группы и либо уничтожение активированными макрофагами измененных воздействием антигена собственных клеток (иммунный ответ клеточного типа), либо образование активированными В-лимфоцитами множества специфически взаимодействующих с вызвавшим иммунный ответ антигеном антител (иммунный ответ антителопродуцирующего типа).

Происходящие на каждом из этих этапов события и будут рассмотрены в данном разделе пособия более подробно. Прежде чем перейти к описанию взаимодействия участвующих в развитии иммунных ответов клеток, остановимся на характеристике их возникновения, развития и специфических особенностей.

3.1.1. Характеристика антигенпредставляющих клеток

В конце XX в. было установлено, что представлять чужеродные антигены иммунокомпетентным клеткам способны клетки различных тканей, однако при развитии первичного иммунного ответа (при первом попадании конкретного антигена в организм) важнейшую роль играют дендритные клетки и макрофаги.

Поскольку их генез был описан в разделе «Фагоцитоз», остановимся только на характеристике конкретных групп макрофагов. Как известно, большинство моноцитов через двое суток после выхода их в кровь покидают кровоток и начинают перемещаться в тканевой жидкости органов. В зависимости от места их локализации в тканях они разделяются на несколько групп.

Купферовские клетки (клетки Купфера, звездчатые ретикулоэндотелиоциты) попали в число представляющих антиген макрофагов исключительно по результатам экспериментов *in vitro*. Это макрофаги печени, в которые превращаются вышедшие из капилляров моноциты. Установлено, что купферовские клетки, имеющие среднюю продолжительность жизни 21 день, никуда из печени не мигрируют и практически не меняют свою первоначально полученную локализацию, из-за чего их часто называют оседлыми макрофагами. Они располагаются в пространстве между венулами печени, по которым проходит оттекающая от кишечника кровь, и практически постоянно сталкиваются с антигенами, попадающими в кровоток из кишечника. Главной задачей клеток Купфера принято считать полное уничтожение таких антигенов, и фактически барьерная функция печени в основном реализуется за счет них. Однако, как показали исследования поверхностных молекул этих клеток и эксперименты с выделенными из печени животных фагоцитами, они способны процессировать и представлять Т-хелперам чужеродные антигены. Тем не менее участие купферовских клеток в индукции иммунных ответов *in vivo* остается до сих пор недоказанным. Предполагается, что, с одной стороны, их оседлость и специфика микроокружения в тканях печени не позволяет им контактировать с Т-лимфоцитами, а с другой – в организме нет необходимости в таком запуске иммунных ответов, поскольку все доходящие до печени антигены уже были распознаны и представлены иммунокомпетентным клеткам перитонеальными макрофагами.

Перитонеальные макрофаги развиваются из моноцитов, выходящих из капилляров в стенках кишечника, и постоянно перемещаются между клетками его эпителия и подстилающих эпителий слоев. Условно говоря, они, в отличие от оседлых купферовских клеток, охотятся на антигены, активно передвигаясь, и после поглощения антигена направляются в пейеровы бляшки, где взаимодействуют с находящимися там Т-клетками. Считается, что именно благодаря перитонеальным макрофагам вероятность незаметного для организма проникновения антигенов

через значительную по площади поверхность кишечника сведена к нулю. Одним из доказательств такого предположения является возможность получения искусственного активного иммунитета при использовании ряда пероральных вакцин.

Еще большую по площади поверхность, являющуюся границей между внешней и внутренней средой, имеют респираторный тракт и легкие. Однако и здесь не фиксируемое иммунной системой проникновение чужеродных антигенов в норме невозможно благодаря деятельности еще одной группы подвижных антигенпредставляющих клеток – **альвеолярных макрофагов**.

Контактирующая с окружающей средой кожа также имеет свой, условно говоря, разведотряд, представленный несколькими типами макрофагов. Одним из представителей кожных макрофагов являются **клетки Лангерганса** (белые отростчатые эпидермоциты). По современным представлениям их относят не к типичным макрофагам, а к группе дендритных клеток. Местом первичной локализации этих эпидермоцитов является исчерченный сквамозный слой эпидермиса, куда проникают из капилляров подстилающего слоя дермы их прародители – моноциты. Живут они в эпидермисе около трех недель и в случае связывания и процессирования антигена начинают перемещение из эпидермиса в дерму. Такое движение, как правило, стимулируется гранулоцитмоноцит-колонийстимулирующим фактором (ГМ-КСФ) и фактором некроза опухолей α (ФНОα) – цитокинами, образующимися поврежденными клетками кожи и крови. В дерме дендритная клетка проникает в лимфатический капилляр и становится **вуалевой клеткой афферентной лимфы**, а после попадания с током лимфы в корковый слой лимфоузла – разновидностью макрофагов лимфоузла **(интердигитальной клеткой)**. Именно в таком состоянии она и представляет захваченный в эпидермисе антиген Т-хелперам, локализованным как раз в этом слое лимфатического узла.

Кроме таких макрофагов кожи известны еще три разновидности, которые обычно выявляются в гранулемах – локальных воспалениях небольших участков дермы, чаще всего волосяных фолликулов. Считается, что проникающие в очаг воспаления моноциты сначала превращаются в **эпителиоидные клетки**, а затем в многоядерные варианты макрофагов кожи – либо в **клетки Ланганса**, либо в **клетки типа инородного тела**. Эти варианты различаются количеством ядер и их расположением внутри клетки: первые имеют всего несколько ядер, и ядра расположены по периферии клетки, вторые – большее количество ядер, и они равномерно распределены в цитоплазме. Переход от одноядерности к многоядерности не связывают с делением ядра без деления клетки, а предполагают, что многоядерность возникает как результат слияния нескольких эпителиоидных клеток. Для всех трех типов клеток продемонстрирована их способность представлять антиген и инициировать развитие иммунного ответа.

Общей чертой всех антигенпредставляющих клеток является присущая им способность синтезировать и выносить на свою поверхность особые молекулы, необходимые для взаимодействия с Т-лимфоцитами. Прежде всего к таким молекулам относятся белки главного комплекса гистосовместимости класса II (в коротком написании – MHC II), а также молекулы CD80 и CD86. Большинство описанных выше макрофагов начинают синтезировать достаточные для успешного контакта с Т-лимфоцитами количества таких молекул только после поглощения чужеродного агента и его процессирования. Это и отличает их от присутствующих в раз-

личных тканях дендритных клеток, которые изначально подготовлены для более быстрого захвата различных антигенов и используют для этого не только фагоцитоз, но и пиноцитоз. Процессинг антигена (внутриклеточная обработка поглощенных антигенов и объединение их фрагментов с белками МНС) также происходит в более короткие сроки, а необходимые для эффективной активации Т-лимфоцитов дополнительные поверхностные молекулы имеются на дендритных клетках заранее, еще до контакта с антигеном. Исходя из этого, именно дендритным клеткам отдается приоритет в запуске первичных иммунных ответов, хотя и все остальные клетки макрофагальной системы способны осуществлять этот процесс.

Помимо описанных выше миелоидных антигенпредставляющих клеток представлять антиген Т-лимфоцитам могут также дендритные клетки лимфоидного происхождения и В-лимфоциты. Их отличает от других клеток организма изначальная способность синтезировать поверхностные молекулы МНС II и объединять с ними фрагменты антигенов без дополнительной стимуляции, что позволяет рассматривать их как постоянно действующие, или, как сейчас пишут, профессиональные, АПК. Причем В-лимфоциты, как и макрофаги, отличаются от дендритных клеток тем, что дополнительные, так называемые костимулирующие, молекулы образуют только при контакте с Т-клетками.

К непрофессиональным АПК, т. е. клеткам, способным представлять антиген только в строго определенных условиях, относятся фибробласты плотных соединительных тканей, клетки эндотелия кровеносных сосудов, микроглиальные клетки нервной ткани, а также эпителиальные клетки ряда желез внутренней секреции (тимуса, щитовидной и поджелудочной желез). В большинстве случаев причиной временного превращения перечисленных клеток в АПК является сильно выраженное воспаление, после прекращения которого способность представлять антиген Т-лимфоцитам у них исчезает.

3.2. ГЕНЕЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА Т-ЛИМФОЦИТОВ

Как указывалось выше, обязательными участниками иммунных ответов на тимусзависимые антигены являются Т-клетки, относящиеся к группе лимфоцитов. По морфологии Т-лимфоциты практически не отличаются от В-клеток, однако по характеру развития, функциям и поверхностным антигенам они представляют собой четко обособленную группу иммунокомпетентных клеток.

Предшественники Т-клеток формируются в красном костном мозге в результате деления стволовых кроветворных клеток, но затем в обязательном порядке перемещаются в кровоток и транспортируются в тимус, где и проходят основные этапы созревания. С одной стороны, именно это и обусловило название клеток данной группы, а с другой – позволило относить тимус к первичным (центральным) органам иммунной системы. Доказательством значимости тимуса, а следовательно, и формирующихся при его участии Т-клеток в обеспечении защиты внутренней среды организма от чужеродных антигенов являются ярко выраженный приобретенный иммунодефицит тимэктомированных в раннем возрасте лабора-

торных животных и врожденный иммунодефицит у наследственно бестимусных белых мышей линии nude, причем в обоих случаях иммунодефициты могут быть компенсированы пересадками тимуса от обычных молодых мышей.

Тимус – эпителиально-лимфоидный орган, расположенный в грудной клетке за грудиной в том месте, где к грудине, образуя своеобразную вилочку, присоединяются ключицы (отсюда второе название «вилочковая железа»). Согласно представлениям классической анатомии и физиологии тимус является железой внутренней секреции, но его роль в функционировании именно иммунной системы в настоящее время признается более значимой. У человека это единый двусторонне-несимметричный орган, состоящий из двух долей в своей корковой (кортикальной) части и имеющий общую мозговую (медуллярную) часть. У мышей тимус полностью разделен перегородкой из соединительной ткани на две части. Каждая доля, в свою очередь, разделяется в кортикальной части на повторяющиеся дольки более тонкими прослойками соединительной ткани, по которым проходят кровеносные сосуды.

Масса тимуса максимальна у достигшего половой зрелости человека и составляет около 30 г, объем тимуса в этот же период – 25 $см^3$. Ранее считалось, что с момента рождения и до полового созревания тимус постепенно увеличивается в размерах и усиливает свою функцию, а затем происходит инволюция тимуса, выражающаяся в постепенном замещении его эпителиальных тканей на жировую ткань. В последние годы XX в. появилось мнение, что максимальная активность тимуса как органа иммунной системы проявляется в возрасте одного года и инволюция начинается на втором году жизни. Условная скорость инволюции оценивается как утрата 3 % его первоначальной активности ежегодно, и теоретически к 120 годам его функция должна полностью исчезать. Насколько верны подобные предположения, судить трудно, поскольку достоверных исследований иммунного статуса долгожителей, можно сказать, практически не имеется, однако четко показано, что у большинства людей в возрасте 50–60 лет в той или иной степени начинает проявляться иммунодефицит Т-клеточного характера. Это еще раз подтверждает обязательное участие тимуса в формировании основных субпопуляций Т-лимфоцитов – Т-хелперов и Т-киллеров.

Характеристика тимуса как эпителиально-лимфоидной системы вытекает из наличия в каждой дольке особых эпителиальных клеток, которые ведут свое происхождение от особых выростов эктодермы и эндодермы, особым образом объединяющихся в ходе развития зародыша. Вторая же цитологическая составляющая тимуса поставляется в эмбрионе развивающейся печенью (именно она является кроветворным органом на ранних стадиях развития), а после рождения – красным костным мозгом. Причем лимфоидная составляющая в уже сформировавшемся тимусе преобладает в количественном отношении, из-за чего, как считают гистологи, собственно эпителиальные клетки уплощены и имеют узкие нитевидные отростки, между которыми располагаются созревающие предшественники Т-клеток. Кроме этого, в тимусе присутствуют и макрофаги костномозгового происхождения, также условно относимые не к эпителиальной, а к лимфоидной составляющей.

Процесс поступления клеток из красного костного мозга в тимус происходит после рождения непрерывно, причем основная группа попадающих в тимус

из кровотока клеток – предшественники Т-лимфоцитов, или пре-Т-клетки. Их главная отличительная черта – наличие особых поверхностных белковых молекул, так называемых «рецепторов хоминга», главной из которых считается CD44. Эти молекулы играют роль своеобразных проводников пре-Т-клеток через гематотимический барьер, представленный эндотелием капилляров тимуса, макрофагами периваскулярного пространства и базальной мембраной, отделяющей эпителиальные клетки тимуса от прослойки соединительной ткани, в которой находится капилляр. Роль именно этих молекул в направленном перемещении клеток подтверждается тем, что после попадания в эпителиальный компартмент пре-Т-клетки быстро утрачивают CD44 и эта молекула появляется вновь только на уже созревших Т-лимфоцитах, которые должны будут пройти тот же гематотимический барьер, но уже в обратном направлении.

Еще одним поверхностным маркером пре-Т-клеток и ранних лимфобластов является молекула c-Kit, представляющая собой рецептор для фактора роста стволовых клеток. В системе CD эта молекула имеет номер 117. По наличию CD117, а также еще одной молекулы – CD25 (это α-цепь рецептора для интерлейкина-2) – удается проследить ранние стадии развития Т-лимфоцитов в тимусе (табл. 9).

Таблица 9

Развитие Т-лимфоцитов

Локализация	Стадия развития	Поверхностные маркеры	Основная характеристика событий на данной стадии
Красный костный мозг	Стволовая кроветворная клетка	$CD117^{++}$, $CD44^{-}$, $CD25^{-}$	Клетки сохраняют способность развиваться в клетки других лимфоидных линий (дендритные лимфоидные клетки, В-лимфоциты, NK-клетки)
	Стволовая лимфоидная клетка		
Кровь	Пре-Т-клетка	$CD117^{++}$, $CD44^{+}$, $CD25^{-}$	
Субкапсулярный корковый слой тимуса	DN1	$CD117^{++}$, $CD44^{+}$, $CD25^{-}$	
	DN2	$CD117^{+}$, $CD44^{+}$, $CD25^{+}$	Клетки с TCRγδ покидают тимус в конце этого этапа развития
	DN3	$CD117^{+}$, $CD44^{-}$, $CD25^{+}$	В клетках осуществляется реаранжировка генов для β-цепей TCR
	DN4	$CD117^{+-}$, $CD44^{-}$, $CD25^{-}$	Клетки формируют α-цепь TCR и молекулы CD4 и CD8
Глубокий корковый слой тимуса	DP	TCR/$CD3^{+}$, $CD4^{+}$, $CD8^{+}$	Клетки подвергаются позитивной селекции и дифференцируются в различные линии Т-лимфоцитов-эмигрантов
Мозговой слой тимуса	SP	TCR/$CD3^{+}$, $CD4^{+}$ или TCR/$CD3^{+}$, $CD8^{+}$	Т-хелперы и Т-киллеры подвергаются отрицательной селекции
Кровь	Зрелые Т-лимфоциты	Т-хелперы, Т-киллеры, Т-хелперы 17, IEL, $T_{REG,}$ NKT	

Хотя местом проникновения пре-Т-клеток во внутреннее пространство дольки тимуса является граница коркового и мозгового слоев, эти клетки, теперь уже называющиеся лимфобластами, перемещаются в субкапсулярную часть коркового слоя, откуда и начинают свой ведущий к созреванию путь в направлении от верхних слоев коры к мозговому веществу.

Первоначально на поверхности этих клеток отсутствуют все основные поверхностные маркеры зрелых Т-лимфоцитов – молекулы **CD4**, **CD8** и **CD3** в сочетании с **Т-клеточным рецептором**, или сокращенно **TCR** (от англ. **T c**ell **r**eceptor). Именно в правильном формировании таких молекул и заключается длящееся около 20 суток созревание. Условно его можно разделить на собственно формирование этих структур (считается, что на это уходит около 5–7 суток) и длящуюся около 15 суток проверку эпителиальными клетками тимуса пригодности сформированных поверхностных комплексов.

Находящиеся в верхней части субкапсулярного коркового слоя предшественники Т-клеток называют дважды негативными, или сокращенно DN (от англ. **D**ouble-**n**egative). Этим названием подчеркивается отсутствие у них молекул CD4 и CD8. Изменения таких клеток в ходе развития соотносят с количеством имеющихся на их поверхности молекул CD117, CD44 и CD25 и исходя из этого делят эту стадию развития на четыре этапа. На этапе DN1 под влиянием микроокружения тимуса в клетках-предшественниках активируются гены, продукты которых обеспечивают пролиферацию, и ген, кодирующий образование у потомков поверхностной молекулы CD25. Собственно появление этой молекулы и является свидетельством перехода на этап развития DN2, где начинается реаранжировка генов, необходимых для синтеза входящих в Т-клеточный рецептор цепей γ, δ и β, и одновременно снижается синтез поверхностных молекул CD117 и CD44. На этом же этапе развития определяется, какой тип Т-клеточного рецептора получит каждая клетка.

У позвоночных животных формируются Т-клетки с двумя основными типами TCR – это либо TCRαβ, либо TCRγδ. У млекопитающих доминирующим типом рецептора является TCRαβ, клеток с TCRγδ у взрослых особей образуется около 0,5 % от общего числа Т-лимфоцитов. Однако в период эмбрионального развития эти клетки составляют около 75 % (данные получены на мышах) от общего числа образующихся в эмбрионе Т-клеток. После рождения их численность начинает резко снижаться, и у взрослых млекопитающих их можно обнаруживать только в количествах менее 1 %, причем локализуются они в основном в коже и слизистых оболочках. Важно то, что у Т-лимфоцитов с TCRγδ отсутствуют корецепторные молекулы CD4 и CD8 – они фактически становятся зрелыми на этапе развития DN2, не переходят на этап DN3, а мигрируют в кровеносные сосуды и покидают тимус. Достоверных сведений об особенностях реаранжировки генов для формирования цепей δ и γ, а также о формировании спектра специфичности таких рецепторов пока еще не получено. Показано, что эти клетки, в отличие от TCRαβ-клеток, могут конститутивно, без активации продуцировать ряд цитокинов, не способны взаимодействовать с антигенпредставляющими клетками и фактически работают в рамках защиты первого уровня, усиливая проявление конститутивных защитных механизмов.

В перешедших на этап DN3 клетках реаранжировка генов для β-цепей TCR продолжается, при этом постепенно уменьшается синтез CD44 и CD117, и количество молекул CD44 падает до нуля (формируется фенотип $CD44^-$). Существенно, что

DN3-пре-Т-клетки уже не могут развиваться в клетки каких-либо других лимфоидных линий, даже если изъять их из тимуса и перенести в другое микроокружение.

Происходящее на этапах DN2 и DN3 формирование цепей антигенраспознающей части TCR является, по сути, главнейшим событием в созревании Т-клеток, поэтому резонно подробнее остановиться на структуре предназначенного для распознавания чужеродных антигенов рецепторного комплекса Т-лимфоцитов. Он включает в себя собственно рецептор и необходимую для передачи сигнала внутрь клетки совокупность молекул с общим названием CD3 (рис. 27).

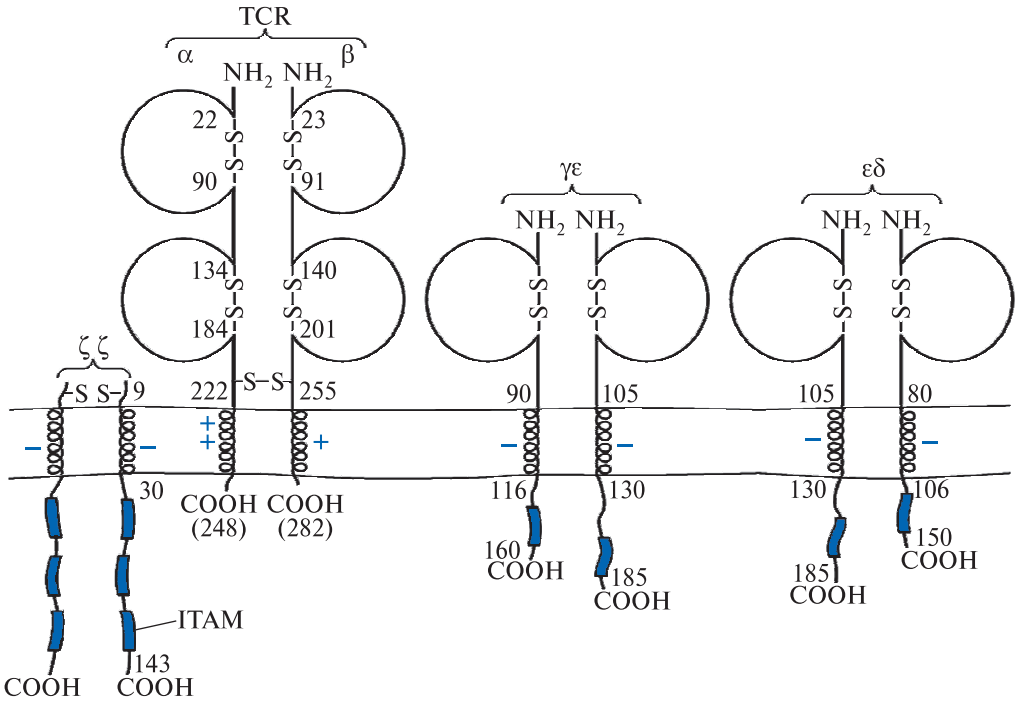


Рис. 27. Схематичное изображение белковых цепей антигенраспознающего рецепторного комплекса Т-лимфоцитов (по 2013-KUBY Immunology)

На рис. 27 приводится вариант TCRαβ, обе цепи которого построены сходным образом. Они представляют собой иммуноглобулиноподобные молекулы, имеющие два внеклеточных домена протяженностью около 100 аминокислотных остатков (вариации в пределах 87–113) и небольшой, включающий в среднем 15 аминокислотных остатков (вариации от 13 до 20), трансмембранный домен. Цитоплазматическая часть обеих цепей еще короче, она представлена 3–5 аминокислотными остатками. Внутри каждого внеклеточного домена имеется по одному дисульфидному мостику (на схеме указаны порядковые номера образующих их остатков цистеина). Дисульфидной связью, расположенной вблизи трансмембранных участков, две цепи связаны между собой. Аминокислотные остатки в трансмембранных частях несут положительные заряды (на схеме это отражено знаком «+» синего цвета), что важно для электростатических взаимодействий с отрицательно заряженными трансмембранными участками цепей, входящих в состав комплекса CD3.

Собственно комплекс CD3 собирается из шестичленного сочетания пяти разновидностей белковых цепей: γ (гамма), δ (дельта), ε (эпсилон), ζ (дзета) и η (эта). Важно не путать γ- и δ-цепи CD3 с имеющими такие же названия цепями TCRγδ, которые по своему строению напоминают α- и β-цепи TCR и совершенно не похожи на одноименные цепи CD3. Комбинируются цепи CD3 в определенном порядке: цепь γ образует димер с цепью ε, цепь δ – также с цепью ε (но это два разных гетеродимера), а цепь ζ может образовывать либо гомодимер ζζ, либо гетеродимер ζη (последний на рис. 27 не показан). Гомодимер ζζ встречается гораздо чаще – около 90 % комплексов CD3 включают именно его. Пространственное расположение всех этих димеров относительно друг друга и цепей TCR представлено на рис. 28.

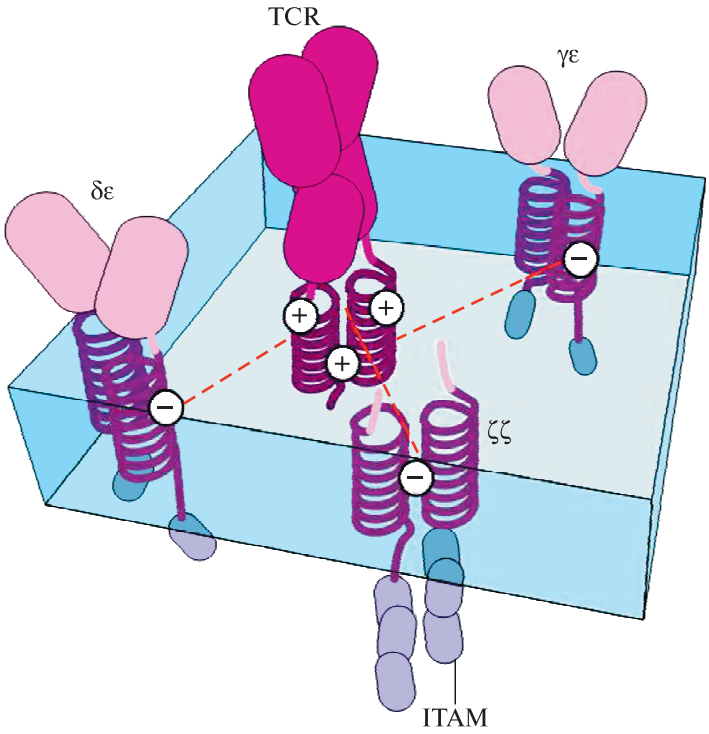


Рис. 28. Расположение димеров в антигенраспознающем комплексе TCR-CD3 (по 2013-KUBY Immunology). Пояснения приводятся в основном тексте

Все димеры из состава CD3 расположены вокруг димера TCR таким образом, чтобы их отрицательно заряженные трансмембранные участки могли электростатически взаимодействовать с положительно заряженными трансмембранными участками α- и β-цепей TCR. Именно это взаимодействие лежит в основе конформационных изменений внутриклеточных доменов цепей CD3, которые определяют передачу сигнала при связывании TCR с чужеродным антигеном. Для передачи сигнала на внутриклеточных доменах всех цепей CD3 имеются активационные последовательности ITAM (от англ. **i**mmunoreceptor **t**yrosine-based **a**ctivation **m**otif), в то время как внутриклеточные участки цепей TCR слишком коротки для самостоятельного запуска сигнальных путей. Предположительно наиболее важным

для запуска сигнальных путей является димер ζζ или его аналог ζη, поскольку в составляющих их цепях внутриклеточные домены имеют по три участка ITAM.

Важно подчеркнуть, что во всех вариантах антигенраспознающих комплексов Т-лимфоцитов необходимая для передачи сигнала молекула CD3 одинакова, она не важна для распознавания антигена. Для распознавания антигена служит небольшой участок TCR, возникающий при пространственном сближении NH_2-концевых доменов его цепей. Именно эти домены получили название «вариабельные» и обозначаются латинской буквой V, так как в каждом созревающем Т-лимфоците аминокислотная последовательность в пределах этих доменов индивидуальна. Второй внеклеточный домен в обеих цепях остается постоянным, называется константным и обозначается латинской буквой С.

Аминокислотные последовательности V-доменов цепей TCR определяются происходящими на этапах созревания DN2 и DN3 перестройками в определенных участках хромосом, в которых расположены соответствующие комплексы генов. Считается, что у млекопитающих гены для цепей TCR организованы по общему принципу, хотя их расположение и количество могут различаться. Наиболее изученными являются комплексы таких генов у человека и мыши (табл. 10).

Таблица 10

Характеристика генов Т-клеточных рецепторов млекопитающих

Свойство	Гены *Homo sapiens* для цепей				Гены *Mus musculus* для цепей			
	α	β	γ	δ	α	β	γ	δ
Расположены в хромосоме	14	7	7	14	14	6	13	14
Количество генов* V	43	40–42	4–6	3 + 5**	71	21	7	15 + 9**
Количество генов* D	–	2	–	3	–	2	–	2
Количество генов* J	50	6 + 7***	3+2****	4	39	5 + 6***	4	2
Количество генов* C	1	2	2	1	1	2	3	1

*Приведено только количество функциональных генов.

**Дополнительные гены, которые могут ассоциироваться как с Cα-, так и с Cδ-генами.

***Первая цифра – гены, относящиеся к группе $J_β1$, вторая – к группе $J_β2$.

****Первая цифра – гены, относящиеся к группе $J_γ1$, вторая – к группе $J_γ2$.

Общей чертой подобных генов является их кластерное расположение, причем в большинстве случаев V-гены располагаются в кластере начиная с 5′-конца (рис. 29). Несмотря на наличие в каждом из таких V-генов промоторных участков, ни один из них не способен экспрессироваться самостоятельно. Для того чтобы ген стал пригодным для транскрипции, его нуклеотидная последовательность должна физически объединиться с одним из генов из лежащей правее группы J-генов (если это цепи α или γ) или с сочетанием генов D и J, которое должно предварительно сформироваться (если это цепи β или δ). В этом и заключается упоминавшаяся выше реаранжировка генов, начинающаяся на этапе созревания DN2.

Для формирования пригодного для транскрипции гена β-цепи в клетке появляются специфичные только для лимфоцитов рекомбиназы RAG1 и RAG2 (их название происходит от англ. фразы **R**ecombination **a**ctivating **g**ene). Эти ферменты, действуя совместно, связываются с ДНК в хромосоме 6 мыши (или хромосоме 7 че-

ловека) таким образом, что один из случайно выбранных D-генов пространственно сближается с одним из случайно выбранных J-генов, расположенных справа от D-гена. С участием еще нескольких белков из системы репарации ДНК и специфичной только для лимфоцитов концевой дезоксинуклеотидтрансферазы TdT (**T**erminal **d**eoxynucleotidyl **T**ransferase) происходит вырезание фрагмента ДНК между двумя выбранными генами и соединение последовательностей D-гена и J-гена.

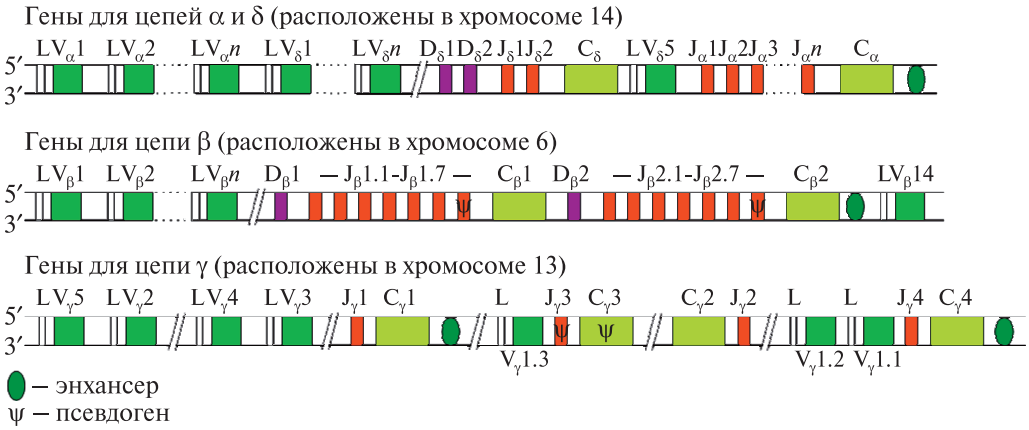


Рис. 29. Кластеры генов, необходимых для образования белковых цепей Т-клеточных рецепторов мыши (по 2013-KUBY Immunology). Пояснения приводятся в основном тексте

Появление единой последовательности DJ инициирует следующий этап реаранжировки. Теперь по такой же схеме один из случайно выбранных V-генов объединяется с уже имеющейся последовательностью DJ, в результате чего формируется пригодный для транскрипции ген. Его транскрипция начинается с промоторной области V-гена и заканчивается на терминаторе транскрипции одного из C-генов. Полученный транскрипт подвергается сплайсингу, и формируется зрелая мРНК, при трансляции которой на рибосомах получается β-цепь TCR.

Важно, что после успешного осуществления реаранжировки генов β-цепи в одной из пары гомологичных хромосом подобная перестройка во второй хромосоме происходить не может, так как срабатывает аллельное исключение. Но в случае нарушения процессов рекомбинации в первой из хромосом процесс повторяется на второй хромосоме, и тогда сформированное на ней сочетание VDJ будет определять специфичность рецептора у этой клетки и всех ее потомков.

Синтезированные β-цепи выводятся на поверхность клетки и объединяются с особым белком, который называется «пре-Tα-цепь». Этот белок одинаковый для всех Т-лимфоцитов, поэтому его еще называют инвариантной цепью, а поскольку при дальнейшем созревании он будет заменен на настоящую α-цепь, то также носит название «суррогатная α-цепь». Соответственно, такое сочетание цепей называют пре-TCR.

На этом же этапе созревания параллельно происходят синтез и выведение на поверхность цепей, входящих в состав молекулы CD3. Они располагаются вокруг формирующихся пре-TCR, делая этот рецептор пригодным для передачи сигнала внутрь клетки.

Собственно само появление на поверхности клеток пре-TCR служит сигналом для подготовки клеток к пролиферации. При этом используются многие из адаптерных и киназных белков, которые задействованы в передаче сигнала от зрелого TCR, но в данном случае пре-TCR запускает сигнальный путь сам по себе, без связывания рецептора с лигандом. И этот путь приводит к запуску пролиферации находящихся на этапе DN3 клеток.

Биологический смысл происходящего на этом этапе размножения (его еще называют β-селекцией) видят в увеличении числа клеток с одинаковой β-цепью Т-клеточного рецептора, т. е. в формировании клонов. Далее каждая отдельная клетка в каждом клоне переходит на этап созревания DN4, и в ней начинается процесс реаранжировки генов α-цепи TCR. Этот процесс осуществляется подобно описанному выше процессу для генов β-цепи: в клетке вновь появляются рекомбиназы RAG1 и RAG2, и один из случайно выбранных Vα-генов объединяется с одним из случайно выбранных Jα-генов. Поскольку в каждой клетке этот процесс происходит независимо, возникает большее разнообразие клеток по специфичности формирующихся TCR. Ведь дальше α-цепи выносятся на поверхность и заменяют суррогатные инвариантные цепи в пре-TCR. Это уже служит сигналом для начала формирования корецепторных молекул CD4 и CD8 (рис. 30).

Эти молекулы также относятся к суперсемейству иммуноглобулинов, т. е. в их внеклеточной части имеются повторяющиеся по структуре домены с внутридоменными дисульфидными мостиками. **Молекула CD4** представлена одной белковой цепью, внеклеточная часть которой имеет четыре подобных домена, за ними следуют трансмембранный домен и относительно длинный внутриклеточный домен, который содержит три остатка серина, пригодных для фосфорилирования. У человека структурные гены молекулы CD4 расположены в 3-й паре хромосом.

Молекула CD8 представляет собой гетеродимер из α- и β-цепей, но возможен и более редко встречающийся вариант – гомодимер αα. В каждой из цепей имеется один внеклеточный домен, затем следуют довольно протяженный (30 аминокислотных остатков в α-цепи и 50 – в β-цепи) связующий (спейсерный) участок, трансмембранный домен и хорошо выраженный цитоплазматический домен. Кодирующие обе цепи гены локализованы у человека во 2-й хромосоме.

Внутриклеточные участки молекулы CD4 и α-цепи молекулы CD8 сходны и постоянно связаны с тирозинкиназой $p56^{lck}$. Из этого следует, что CD4 и CD8 нужны клеткам для передачи внешних сигналов

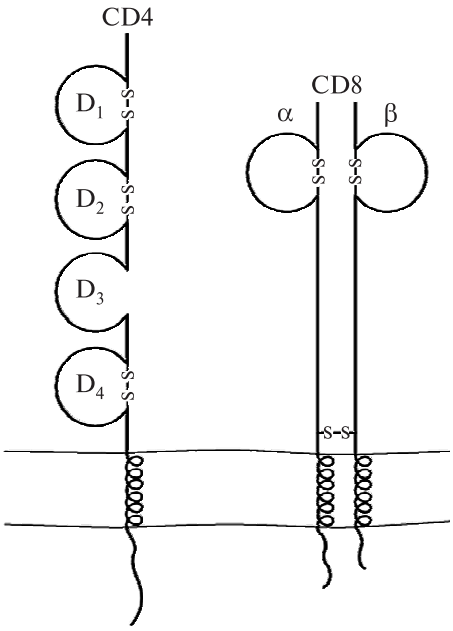


Рис. 30. Схема строения корецепторных молекул, входящих в состав антигенраспознающего комплекса Т-клеток. Пояснения приводятся в основном тексте

внутрь клетки, но источником этих сигналов являются не чужеродные антигены, а молекулы главного комплекса гистосовместимости антигенпредставляющих клеток. Установлено, что молекула CD4 специфически взаимодействует только с молекулами MHC класса II, а молекула CD8 – только с молекулами MHC класса I.

На поверхности находящихся на этапе созревания DN4 клеток оба типа молекул появляются одновременно, и клетки приобретают фенотип $CD4^+$, $CD8^+$, из-за чего их называют дважды позитивными (в англ. аббревиатуре DP). Такие DP-клетки покидают субкапсулярный корковый слой тимуса и переходят в глубокий корковый слой.

Поскольку у таких клеток уже имеется полностью сформированный антигенраспознающий комплекс, он может быть проверен на пригодность его к использованию. Начинать же такую проверку могут только эпителиальные клетки глубокого коркового слоя тимуса. Для этого они имеют на своей поверхности белки главного комплекса гистосовместимости, «нагруженные» фрагментами собственных белков организма. Сталкивающиеся с ними DP-клетки соприкасаются своими антигенраспознающими комплексами с сочетаниями MHC I – собственный пептид и MHC II – собственный пептид и либо прикрепляются к ним, либо не могут этого сделать. Неприкрепившиеся клетки не получают от эпителиальных клеток коркового слоя никаких сигналов и начинают медленно умирать. В англоязычном написании такая гибель клеток получила название «Death by neglect», что можно перевести как «смерть от пренебрежения». Отсутствие прикрепления фактически означает, что у таких DP-клеток не происходит «узнавание» белками CD4 молекул MHC II или белками CD8 молекул MHC I. Это приведет к тому, что такие клетки не смогут после созревания нормально активироваться в ходе представления им чужеродных антигенов антигенпредставляющими клетками.

Удивительно, что таких клеток с, условно говоря, неправильными корецепторными молекулами или в целом антигенраспознающими комплексами почему-то образуется 90–96 %. Одним из возможных объяснений этому является сложность пространственной ориентации цепей CD3 и цепей корецепторных молекул вокруг собственно TCR, с которым они связаны не ковалентно, а за счет электростатических взаимодействий.

Прикрепившиеся клетки также проходят отбор. Те из них, которые прикрепились к эпителиальным клеткам коркового слоя очень прочно, получают, по всей вероятности, сигнал апоптоза. Считается, что высокая степень прикрепления может быть именно у тех клеток, которые присоединились не только за счет связывания CD4 с MHC II или CD8 с MHC I, но и за счет сродства TCR к фрагменту собственных белков эпителиальных клеток тимуса. А такие клетки после созревания могут стать причиной аутоиммунных реакций, поэтому они и не допускаются до дальнейших этапов созревания. Количество таких клеток колеблется от 2 до 5 %.

Таким образом, разрешение на дальнейшее созревание получают только DP-клетки, прикрепившиеся со средней силой. Они получают от эпителиальных клеток сигналы выживания и начинают из дважды позитивных клеток превращаться в однопозитивные (в англ. аббревиатуре SP, от **s**ingle **p**ositive). Как регулируется процесс подавления экспрессии генов корецепторных белков, пока до конца не выяснено, но пропуск в мозговой слой тимуса получают только те клет-

ки, у которых на поверхности в составе антигенраспознающих комплексов остаются либо только CD4-молекулы, либо только CD8.

В мозговом слое SP-клетки подвергаются еще одной проверке. Ее обеспечивают эпителиальные клетки этого слоя и локализованные здесь дендритные клетки, развивающиеся из так называемых береговых макрофагов тимуса. К настоящему времени доказано, что эпителиальные клетки мозгового слоя тимуса обладают уникальной способностью синтезировать и затем процессировать белки почти всех клеток организма. Суть такого процессинга состоит в разделении белков на короткие пептиды, объединении этих пептидов с белками MHC I и выведении сформированных комплексов MHC – собственный пептид на поверхность клетки. Рассмотренную способность связывают с наличием в этих клетках особого белка, получившего название AIRE (от англ. **A**uto**i**mmune **re**gulator). Он отсутствует у некоторых людей с синдромом аутоиммунной полиэндокринопатии 1 (в англ. аббревиатуре APS1), что вызвано мутацией в соответствующем гене. Патологическое состояние у таких пациентов связано с наличием большого количества Т-клеток с TCR, обладающими сродством к собственным белкам организма. Белок AIRE имеет свойства типичного фактора транскрипции, но механизм его действия, приводящего к экспрессии большого количества тканеспецифических генов, пока не исследован.

Предполагается, что эпителиальные клетки мозгового слоя обеспечивают отрицательную селекцию преимущественно $CD8^+$-клеток, а для отрицательной селекции $CD4^+$-клеток нужны дендритные клетки и береговые макрофаги тимуса. Они осуществляют фагоцитоз эпителиальных клеток мозгового вещества и могут представлять фрагменты белков из этих клеток в сочетании с белками MHC II на своей поверхности.

Находящиеся на последнем этапе созревания Т-клетки своими рецепторами контактируют с представляющими антигенные детерминанты собственных белков организма клетками, и если TCR какой-либо клетки обладает сродством к таким антигенным детерминантам, то эта клетка получает сигнал апоптоза.

Необходимость такой проверки и элиминирования имеющих сродство к собственным белкам клеток основана на следующем. Как описано выше, специфичность TCR формируется за счет случайно возникающих комбинаций отдельных генов, и вполне вероятно, что какие-то из комбинаций оказываются потенциально опасными. Ведь имеющие такие TCR клетки могли бы стать основой иммунных ответов, направленных против клеток своего же организма. Одним из подтверждений правильности такого объяснения является упомянутый ранее синдром аутоиммунной полиэндокринопатии.

Таким образом организм обеспечивает себе **иммунологическую толерантность** (отсутствие реакции иммунной системы на собственные антигены) и одновременно создает разнообразный по специфичности набор клеток для распознавания чужеродных антигенов **(первичный распознающий репертуар)**. Считается, что количество распознаваемых зрелыми Т-лимфоцитами чужеродных антигенов описывается цифрами порядка 10^{16}, что, по всей вероятности, превышает то многообразие антигенов, с которым организм может встретиться в течение жизни. Иными словами, иммунная система высших млекопитающих способна обеспечить ответ на любой антиген, который проникает во внутреннюю среду, и в то же время не реагирует на антигены собственного организма.

Сложность осуществляемых в тимусе процессов, а также значимость проводимой в нем двойной селекции в определенной мере подтверждается и тем, что только около 5 % созревающих здесь клеток дозревают до конца. Очевидно, что гибель остальных 95 % оправдывается высокой специфичностью выживших клеток и их направленностью именно на защиту от чужеродных антигенов.

По функциям покидающие тимус окончательно созревшие Т-лимфоциты (или Т-лимфоциты-эмигранты) разделяются на несколько популяций. Две основные из них – **Т-хелперы** и **Т-киллеры**. Отличительный поверхностный маркер Т-хелперов – молекула CD4, Т-киллеров – молекула CD8. В совокупности эти две группы клеток составляют около 98 % от числа Т-эмигрантов. При этом соотношение Т-хелперы/Т-киллеры колеблется у взрослого человека среднего возраста в пределах 1,2–2,5.

В настоящее время установлено, что оставшиеся 2 % включают в себя несколько различающихся минорных популяций. Одна из них – **NKT-клетки**, которые, в отличие от клеток основных (мажорных) популяций, задействованы в реализации защитных реакций первого уровня, т. е. в конститутивной защите. По характеру действия они сходны с NK-клетками, но в отличие от них развиваются в тимусе. Их характерной чертой является наличие TCR, в которых вместо разнообразных α-цепей обнаруживается только один вариант α-цепи – Vα14. По этой причине иногда эти клетки называют инвариантными, сокращенно iNKT. Из корецепторных молекул у них может обнаруживаться только молекула CD4, но чаще их вообще нет (фенотип $CD4^-$, $CD8^-$). Известно, что NKT-клетки могут взаимодействовать с теми клетками, которые представляют не белковые антигены, а гликолипидные, и не в сочетании с классическими молекулами для представления антигена (MHC), а с родственной белкам MHC молекулой CD1.

Еще одна минорная популяция – **интраэпителиальные лимфоциты**, сокращенно **IEL**. Известно, что большинство из них имеют корецепторную молекулу CD8 и локализуются после выхода из тимуса в слизистых оболочках, что и послужило основой для их названия. Хотя характер их действия пока не выяснен, предполагается, что они должны участвовать в реализации конститутивных факторов защиты.

Регуляторные Т-лимфоциты, сокращенно T_{REG}, составляют еще одну из минорных популяций Т-лимфоцитов-эмигрантов. Для этих клеток показана способность ограничивать пролиферацию Т-лимфоцитов, активированных в ходе развития иммунных ответов. Их поверхностные маркеры – CD4 и CD25, но основным маркером для их идентификации признан внутриклеточный белок FoxP3, являющийся одним из главных регуляторов транскрипции. Именно с его появлением в зреющих Т-лимфоцитах связывают переход к данной клеточной линии. Как указывалось выше, большинство зреющих Т-клеток, у которых TCR имеет высокую степень сродства к собственным белкам организма, получают сигнал апоптоза. Однако у небольшого количества таких клеток в ходе высокоафинных контактов с дендритными клетками тимуса в процессе отрицательной селекции вместо апоптотических белков появляются молекулы FoxP3. Продукты активированных этим фактором транскрипции генов направляют клетку на данный путь развития и в дальнейшем позволяют им выполнять свои функции.

Недавно установлено, что T_{REG}-клетки мышей сдерживают развитие патологических состояний у животных с экспериментально вызванными аутоиммунны-

ми болезнями, такими как аллергический энцефалит, воспалительное поражение толстого кишечника и аутоиммунная форма диабета. Какой именно механизм подавления иммунных ответов на собственные антигены используют такие регуляторные клетки, точно не установлено. Но предполагается, что они, обладая высоким уровнем аффинности к комплексам MHC II – собственный пептид, могут вступать во взаимодействие с несущими такие комплексы антигенпредставляющими клетками и снижать их способность процессировать и представлять антиген, уменьшая тем самым вероятность активирования наивных Т-лимфоцитов и запуска иммунного ответа.

Предполагается также, что T_{REG}-клетки могут принимать участие в контроле уровня развития иммунных ответов на любые антигены, помогая в этом индуцированным T_{REG}-лимфоцитам, которые появляются при каждом иммунном ответе из наивных $CD4^+$-клеток под действием интерлейкинов TGFβ и IL-2. Они подавляют активность некоторых иммунокомпетентных клеток, препятствуя тем самым избыточному проявлению иммунного ответа.

3.3. ГЕНЕЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА В-ЛИМФОЦИТОВ

В отличие от Т-клеток еще одна основная группа иммунокомпетентных клеток лимфоидного происхождения – В-лимфоциты – у млекопитающих проходит основные этапы развития в красном костном мозге.

Красный костный мозг считается первичным органом иммунной системы, однако по сути представляет собой совокупность клеток, заполняющих ячейки губчатого вещества костей. Проходящие через кость кровеносные сосуды ветвятся в ней с образованием особых вариантов капилляров – синусоидов костного мозга, стенки которых более проницаемы для клеток, чем стенки обычных капилляров. В сложном трехмерном пространстве каждой ячейки, благодаря находящимся здесь постоянно стромальным клеткам костного мозга, создаются специфические условия для существования стволовых клеток различных тканей. Но для клеток крови стромальные клетки создают еще и условия для развития. Выделяемые ими вещества определяют переход развивающихся клеток крови от одной стадии развития к другой и контролируют их состояние на каждом этапе созревания. В процессе созревания внутри каждой ячейки зреющие клетки крови перемещаются от стенок, где они находятся в контакте с остеобластами, в соответствующие путям их развития микрониши, создаваемые стромальными клетками. Направляют их перемещение поверхностные молекулы стромальных клеток, а также выделяемые ими цитокины.

Главной конечной целью созревания В-клеток в микроокружении стромальных клеток красного костного мозга выступает формирование BCR – В-клеточного рецептора для распознавания чужеродных антигенов. Фактически такой рецептор является мембрансвязанной молекулой иммуноглобулина, детальная структура которого будет рассмотрена подробно в следующих разделах пособия. Здесь необходимо подчеркнуть, что гены, определяющие первичную структуру

рецепторных цепей BCR, также многочисленны и представляют собой систему кластеров. В связи с этим процессы формирования антигенраспознающих рецепторов Т- и В-лимфоцитов осуществляются сходным образом: для начала синтеза входящих в рецептор белковых цепей необходима реаранжировка ряда генов в соответствующих участках хромосом, причем, поскольку и в составе BCR имеются два типа цепей (легкие и тяжелые), реаранжировка генов для каждого варианта цепи и собственно синтез цепей разобщены во времени.

Конкретно для клеток лимфоидной группы развитие начинается от находящихся у стенок ячеек стволовых кроветворных клеток (табл. 11).

Таблица 11

Развитие B2-лимфоцитов

Локализация	Стадия развития	Поверхностные маркеры	Основная характеристика событий на данной стадии
Красный костный мозг	Стволовая кроветворная клетка	$CD117^{++}$, $CD44^{-}$, $CD25^{-}$	Клетки сохраняют способность развиваться в клетки других лимфоидных линий
	Стволовая лимфоидная клетка		
	Пре-про-В-клетка	$CD45R\ (B220)^{+}$, $IL\text{-}7R^{+-}$, $CD25^{-}$	Начинается реаранжировка генов D- и J-генов тяжелых цепей
	Ранняя про-В-клетка	$CD45R^{+}$, $CD117^{+-}$, $IL\text{-}7R^{+}$, $CD19^{+}$, $CD25^{-}$	Заканчивается реаранжировка D- и J-генов. Начинается синтез молекул CD19, Igα и Igβ
	Поздняя про-В-клетка	$CD117^{+-}$, $IL\text{-}7R^{++}$, $CD19^{+}$, $CD25^{+-}$	Формируется сочетание VDJ и далее пре-BCR. **Первая контрольная точка развития**
	Ранняя пре-В-клетка	Пре-BCR^{+}, $CD45R^{+}$, $CD19^{+}$, $IL\text{-}7R^{++}$, $CD25^{+}$	Пролиферация. Начинается подготовка к реаранжировке генов легких цепей BCR
	Поздняя пре-В-клетка	Пре-BCR^{+-}, $CD45R^{+}$, $CD19^{+}$, $IL\text{-}7R^{++}$, $CD25^{+}$	Реаранжировка генов легких цепей. Замена пре-BCR на зрелые BCR
	Незрелый В-лимфоцит	$mIgM^{++}$	**Клональная селекция и редактирование рецептора. Вторая контрольная точка развития**
Селезенка	Т1-незрелые В-лимфоциты	$mIgM^{+}$, $mIgD^{+-}$, $CD24^{+}$, $CD93^{+}$, $CD21^{+}$, $CD23^{+}$, $BAFF\text{-}R^{+-}$	Происходит постепенная замена mIgM на mIgD. Осуществляется периферическая стадия формирования иммунотолерантности
	Т2-незрелые В-лимфоциты	$mIgM^{+-}$, $mIgD^{++}$, $CD21^{+}$, $CD23^{+}$, $BAFF\text{-}R^{++}$	Осуществляется периферическая стадия формирования иммунотолерантности. Происходит разделение на фолликулярные В-лимфоциты и MZ-B-клетки

При получении этими клетками соответствующих сигналов они делятся и, если на дочерние клетки оказывает действие хемокин CXCL12, начинают развитие по пути лимфоидных предшественников. С этой целью происходит их перемещение ближе к центру ячеек, где клетки попадают под влияние продуцирующих данный хемокин стромальных клеток. Если они не мигрируют дальше и не уходят через стенки синусоидов в кровь, то становятся ранними предшественниками В-лимфоцитов. На этой стадии они называются **пре-про-В-клетками**.

Для клеток этой стадии созревания характерны наличие специфического поверхностного маркера CD45R (его второе название B220) и повышенный уровень продукции фактора транскрипции EBF1. Этот фактор считается ключевым, поскольку его взаимодействие с другими факторами транскрипции обеспечивает в конечном итоге активацию целого ряда генов, продукты которых необходимы для созревания по В-клеточному пути. Появление EBF1 определяется воздействием на пре-про-В-клетки IL-7, известного как фактор роста и созревания В-лимфоцитов, для чего на их поверхности уже есть небольшое количество рецепторов для этого интерлейкина.

На этом этапе EBF1 в ядре клетки связывается с фактором транскрипции EA2 и активирует гены, продукты которых подготавливают DJ-локус в 14-й хромосоме человека (или 12-й хромосоме мыши) для начала реаранжировки генов. Кроме этого, активируются гены, кодирующие рекомбиназы RAG1 и RAG2 и другие белки, необходимые для рекомбинации. После этого начинается сам процесс реаранжировки, в результате которого один из D-генов должен соединиться с одним из J-генов. Все это время про-В-клетка остается связанной со стромальной клеткой, продуцирующей CXCL12. Но когда начинается перестройка D- и J-генов, предшественник В-лимфоцита отделяется от нее и начинает перемещаться в поисках стромальных клеток, продуцирующих IL-7. При этом количество рецепторов для интерлейкина-7 увеличивается. Эта стадия в развитии называется «**ранняя про-В-клетка**».

На данной стадии процесс DJ-реаранжировки завершается, и клетка начинает готовиться к следующему этапу рекомбинации – объединению DJ-последовательности с последовательностью одного из V-генов. Для этого появляется фактор транскрипции PAX5, что приводит к необратимости перехода клетки на любой другой, не В-лимфоидный, путь развития. С его появлением включаются в работу гены, кодирующие необходимые для продвижения по выбранному пути белки. Один из них определяет синтез поверхностного белка CD19 – основного маркера зрелых В-лимфоцитов и корецептора для BCR. Вторым важным событием является повышение уровня синтеза рецептора для интерлейкина-7 (IL-7R). Третье следствие появления PAX5 – начало синтеза белковых цепей Igα, Igβ (они же называются CD79α и CD79β) и белка под названием «калнексин». Все эти белки входят в состав сигнального комплекса, который должен располагаться на мембране рядом с BCR, подобно тому как CD3-комплекс располагается рядом с Т-клеточным рецептором на мембране Т-лимфоцитов. Калнексин на этом этапе созревания является шапероном, стабилизирующим димер Igα/Igβ в отсутствие тяжелой цепи рецептора. И последнее событие на этой стадии – начало сближения одного из V-генов с уже имеющимся сочетанием DJ.

На следующей стадии развития, которая называется **поздней про-В-клеткой**, заканчивается формирование функционального сочетания VDJ и появляются тяжелые цепи типа μ. Одновременно в клетке синтезируются белок VpreB и белок λ5. Все эти белки выносятся на поверхность клетки, при этом тяжелые цепи μ попарно закрепляются в мембране рядом с сигнальным димером Igα/Igβ, а к каждой тяжелой цепи прикрепляются VpreB и λ5, составляя вместе суррогатную легкую цепь. Так формируется пре-BCR, через который в клетку поступают сигналы, приводящие к аллельному исключению.

Под влиянием этих сигналов меняется как состояние хромосомы, на которой уже есть сочетание VDJ (здесь исключаются какие-либо перестройки), так и гомологичной хромосомы, на которой участок с генами для тяжелых цепей становится недоступным для реаранжировки. Источник сигналов – контакт с отрицательно заряженными молекулами на поверхности стромальных клеток красного костного мозга, причем улавливают сигнал либо λ5-часть суррогатной легкой цепи, либо небольшой участок вариабельного домена тяжелой цепи μ.

Еще одним важным следствием таких сигналов является пролиферация выживших клеток. Это считается необходимым, потому что клетки, в которых не сформировался пре-BCR, элиминируются путем апоптоза. Причинами отсутствия пре-BCR могут быть нарушения в формировании передающей сигнал части рецептора либо неудачная реаранжировка генов тяжелых цепей. Установлено, что если в одной из гомологичных хромосом реаранжировка не дала функционального гена, то клетка проводит реаранжировку на второй хромосоме из пары, и только при неудаче второй реаранжировки клетка, не получив сигнала на выживание, уходит в апоптоз. Этот этап в развитии В-клеток часто называют **первой контрольной точкой** (1^{st} checkpoint).

С учетом того, что часть клеток не проходит эту контрольную точку, осуществляется несколько раундов деления пре-В-клеток. Этот этап **(стадия ранней пре-В-клетки)** очень похож на β-селекцию при созревании Т-клеток и также дает определенное повышение числа вариантов клеток по специфичности их антигенраспознающих рецепторов. Ведь каждая клетка-потомок, ведущая свое происхождение от клетки с определенным вариантом тяжелой цепи, на последующем этапе будет независимо формировать участвующие в создании специфичности легкие цепи.

После нескольких раундов деления количество пре-BCR на поверхности клеток уменьшается, что служит сигналом для активации генов, кодирующих рекомбиназы RAG1 и RAG2. Появление рекомбиназ означает переход зреющих клеток в стадию **поздней пре-В-клетки**. На этой стадии осуществляется реаранжировка генов, определяющих структуру вариабельных доменов легких цепей рецептора.

У млекопитающих легкие цепи BCR бывают двух типов – κ (каппа) и λ (лямбда). У мышей хромосомные перестройки этого этапа всегда начинаются на хромосоме 6, где располагаются гены для κ-цепей. Если на одной из гомологичных хромосом шестой пары сближение случайно выбранных V- и J-генов окажется непродуктивным, процесс перестройки осуществляется на второй хромосоме этой же пары. И только если и здесь реаранжировка окажется неудачной, освобождается от хроматиновых белков λ-локус на одной из хромосом 16-й пары. У человека процесс формирования функциональных генов легких цепей равновероятно может начинаться как на хро-

мосоме 2, где располагаются гены для κ-цепи, так и на хромосоме 22, несущей гены для цепей типа λ. Однако в конечном итоге как в формирующихся рецепторах, так и в последующем секретируемых иммуноглобулинах чаще встречаются κ-цепи (соотношение κ : λ равняется приблизительно 3 : 2).

После успешной VJ-реаранжировки полученный функциональный ген экспрессируется, и синтезированные легкие цепи замещают суррогатные цепи в пре-В-рецепторах, превращая их в мембранный IgM (mIgM). Полностью собранный BCR-рецептор имеет следующий вид (рис. 31).

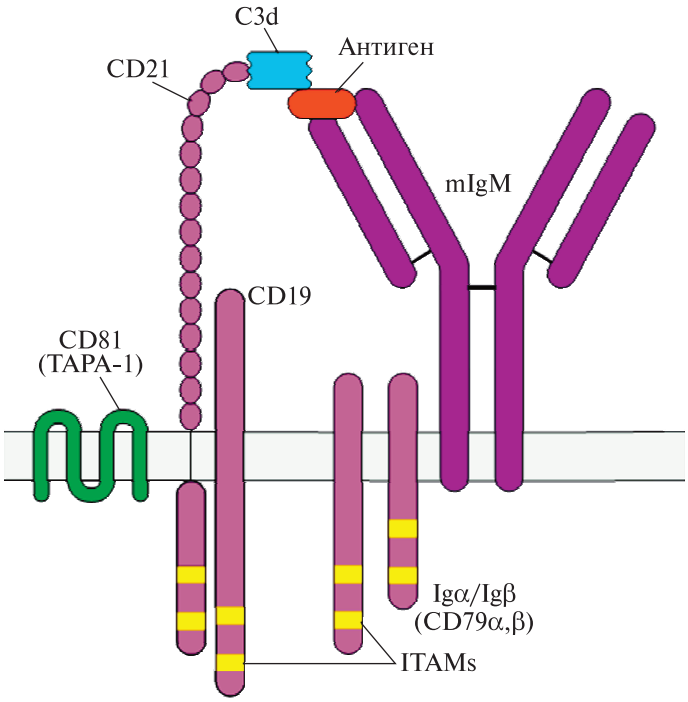


Рис. 31. Полностью сформированный BCR в сочетании с передающими сигнал молекулами (по 2013-KUBY Immunology). Красным цветом показан связанный антиген, опсонизированный производными молекулы С3 из системы комплемента (синий цвет). В этом случае через молекулы CD21 и CD19 в клетку передается дополнительный сигнал

Имеющие такой рецептор клетки считаются уже перешедшими на новую стадию развития – **незрелые В-лимфоциты**. Если по тем или иным причинам такое превращение не осуществляется, клетка переходит к состоянию апоптоза. Поэтому этот момент в созревании В-лимфоцитов принято считать **второй контрольной точкой** (2^{nd} checkpoint).

Когда рецепторы полностью сформированы, начинается проверка их специфичности по отношению к собственным антигенам организма. Необходимость такой проверки вытекает из того, что кодирующие вариабельные домены гены как тяжелых, так и легких цепей сочетаются при реаранжировках случайным образом.

Показано, что при прочном связывании BCR незрелых mIgM$^+$-клеток с какими-либо молекулами (в экспериментах *in vitro* это были специфичные к IgM антитела) в клетках индуцируется процесс апоптоза. Этот этап в генезе В-клеток получил название **клональной селекции незрелых В-лимфоцитов**, и его считают основой центральной (т. е. формируемой в центральных органах иммунной системы) иммунологической толерантности.

В какой-то мере клональная селекция незрелых В-лимфоцитов сопоставима с отрицательной селекцией зреющих Т-лимфоцитов в тимусе, однако пока не установлено, какие именно клетки в красном костном мозге представляют В-клеткам собственные антигены организма. Кроме того, экспериментально показано, что не все аутореактивные В-клетки погибают после связывания их рецепторов с собственными антигенами. В некоторых из них индуцируется особый процесс, получивший название «**редактирование рецептора**».

При включении процесса редактирования рецептора в клетке вновь активируются гены, кодирующие RAG1 и RAG2, и в соответствующих хромосомах инициируется повторная перестройка. Такие перестройки могут происходить как для генов тяжелых, так и для генов легких цепей, причем именно в тех гомологичных хромосомах, которые уже претерпевали реаранжировку. Это предположительно объясняют тем, что гомологичные хромосомы неактивны из-за аллельного исключения. Чаще редактируются легкие цепи, поскольку для их перестройки достаточно одного акта рекомбинации. В ходе создания нового сочетания VJ (или VDJ для тяжелой цепи) старое сочетание удаляется, а новое становится функциональным геном, который и наследуется далее всеми потомками такой клетки.

Показано также, что под клональную селекцию и редактирование рецептора попадают не все аутореактивные клетки. Часть из них могут покидать красный костный мозг и подвергаться отрицательной селекции уже на периферии.

Покинуть красный костный мозг способны только mIgM$^+$-В-лимфоциты, но они еще не считаются зрелыми. Для окончательного созревания (по крайней мере, у мышей) они должны попасть в селезенку. Этот период в созревании длится недолго, поэтому находящиеся на нем клетки получили название **транзиторных** (переходных) **В-клеток** и обозначаются Т1- и Т2-В-клетки (от англ. **T**ransitional **B-cells**). Деление их на две группы связано с постепенным изменением их поверхностных молекул, которое происходит на данном этапе созревания.

Т1-состояние характеризуется постепенной сменой μ-цепей в BCR на тяжелые цепи типа δ (дельта). При этом специфичность рецептора по отношению к антигенам остается прежней, что достигается изменением сплайсинга пре-мРНК, получаемой при экспрессии того же функционального гена, который сформировался при прошедшей ранее реаранжировке генов тяжелой цепи. Одновременно на поверхности клеток появляются молекулы CD21 и CD23, которые добавляются к уже имеющимся у Т1-клеток CD24 и CD93. В конце Т1-фазы созревания начинает появляться рецептор для молекулы BAFF (BAFF-R), через который в дальнейшем зрелые В-клетки получают сигналы на продление жизни, присоединяя к себе молекулы BAFF.

Т2-стадия отличается почти полной сменой mIgM-содержащих BCR на mIgD-содержащие, снижением уровней синтеза CD24 и CD93 и повышением уровней синтеза BAFF-R. Переход к полной зрелости достигается при полном ис-

чезновении с поверхности клетки CD24 и CD93. Осуществляется эта стадия созревания после попадания Т1-клеток в маргинальный синус в пределах белой пульпы селезенки и перемещения их через Т-клеточную зону белой пульпы.

Важно, что на стадиях созревания Т1 и Т2 осуществляется дальнейшая выбраковка аутореактивных В-клеток. Сталкиваясь уже вне красного костного мозга с большим количеством антигенов собственного организма, Т1- и Т2-В-лимфоциты получают сигналы апоптоза, если их рецепторы связывают антиген. По некоторым данным у мышей от 55 до 75 % не полностью созревших В2-клеток элиминируются из организма, и этот процесс называется периферическим формированием толерантности. Сочетание происходящей в красном костном мозге клональной селекции (центральное формирование толерантности) и только что описанного процесса сводит до минимума (но не исключает полностью) образование в дальнейшем антител, способных связываться с собственными белками организма.

Недавно установлено, что часть выходящих в кровоток аутореактивных клеток не получают сигнал апоптоза, а модифицируются таким образом, что их контакт с антигенами через BCR вызывает не активационные сигналы (что характерно для нормальной зрелой В-клетки), а переводит клетку в состояние анергии. Такие В-лимфоциты пока условно называют Т3-клетками. Под анергией здесь понимается неспособность отвечать на контакт с антигеном пролиферацией, дифференциацией и в дальнейшем продукцией антител. Показано, что такие уже зрелые В-клетки имеют меньшую продолжительность жизни, чем обычные В2-лимфоциты, и умирают путем апоптоза уже в ходе миграции зрелых В-клеток по организму. Предполагается, что их существование можно объяснить следующим образом: они нужны организму, чтобы связывать растворимые аутоантигены или комплексы чужеродных антигенов с собственными белками организма и тем самым ограничивать их контакт с обычными В-лимфоцитами, а значит, уменьшать вероятность развития аутоиммунных реакций. Однако это предположение еще не получило экспериментального подтверждения.

Большая часть Т2-клеток после окончательного созревания переходят в первичные фолликулы белой пульпы селезенки и составляют мажорную фракцию В-лимфоцитов, которая называется **В2-лимфоцитами**, или **фолликулярными В-лимфоцитами**. Уже находясь в фолликулах, эти лимфоциты экспрессируют на своей поверхности рецепторы для хемокинов, обеспечивающие их переход в кровоток и далее во вторичные лимфоидные органы. В экспериментах на трансгенных мышах с нокаутом необходимых для развития В-лимфоцитов генов показано, что наивные (т. е. не вступавшие в контакт с Т-хелперами 2) В2-клетки имеют продолжительность жизни около 4,5 месяца. Все это время они перемещаются из одного вторичного лимфоидного органа в другой, задерживаясь в каждом из них в соответствующих В-клеточных зонах на непродолжительный период. Такая миграция увеличивает вероятность встречи со способными активировать В-лимфоциты Т-хелперами 2 и тем самым ускоряет развитие иммунных ответов гуморального характера, т. е. приводящих к продукции антител.

У взрослых мышей и человека такие В-лимфоциты составляют около 95 % от общего числа В-лимфоцитов. Оставшиеся 5 % представлены двумя разновидностями В-клеток, которые называются В1-лимфоцитами и В-лимфоцитами маргинальной зоны.

B1-лимфоциты получили свое название из-за того, что они первыми появляются в ходе эмбрионального развития млекопитающих. Кроветворные органы зародыша (прежде всего эмбриональная печень) образуют первые клетки крови в то время, когда основной кроветворный орган – красный костный мозг – еще не сформирован. В этот период все лимфоциты в крови зародыша представлены Т-лимфоцитами с TCRγδ и B1-лимфоцитами. После рождения количество зародышевых лимфоцитов быстро сокращается, поскольку красный костный мозг и тимус обеспечивают развитие основных подклассов лимфоцитов. Однако зародышевые лимфоциты не исчезают полностью, так как их отличительной чертой является способность делиться вне кроветворных органов без дополнительной стимуляции. Такие, как их называют, самоподдерживающиеся популяции располагаются в полостях, соседствующих с поверхностью кишечника и дыхательных органов (перитонеальной и плевральной), и крайне редко обнаруживаются в других тканях организма и вторичных лимфоидных органах, поскольку миграция для таких клеток, как правило, нехарактерна.

B1-лимфоциты отличаются от B2-клеток не только местом локализации в организме. У них имеется обычно характерный для Т-лимфоцитов поверхностный антиген CD5, В-клеточный рецептор представлен преимущественно IgM, а корецепторные молекулы CD19 и CD21 отсутствуют. Разнообразие BCR по специфичности к антигенам гораздо ниже, чем у B2-лимфоцитов. Основными антигенами, которые могут связывать B1-лимфоциты, являются липополисахариды бактерий, причем связывание происходит с относительно низкой аффинностью. Продуцируемые B1-лимфоцитами иммуноглобулины относятся в основном к классу IgM и лишь изредка к классу IgA. Для перехода к продукции иммуноглобулинов B1-клеткам не требуется активация со стороны Т-хелперов, они синтезируют и выделяют антитела конститутивно, даже при отсутствии антигенной стимуляции. Считается, что так называемые естественные антитела, имеющиеся в организме от рождения, образуют именно клетки этой минорной популяции. Таким образом, их деятельность по своему характеру ближе к врожденным факторам защиты организма, чем к индуцибельным. Определяемую ими защиту, поскольку она связана с образованием антител, также относят к иммунным ответам, но это ответы на так называемые тимуснезависимые антигены, и они, как правило, не сопровождаются формированием иммунологической памяти.

Насколько значим вклад B1-субпопуляции В-лимфоцитов в общую защиту организма у большинства видов млекопитающих, судить трудно, однако то, что это необходимый элемент общих защитных сил организма, не вызывает сомнений. По всей вероятности, деятельность B1-лимфоцитов наиболее важна при постоянном воздействии на слизистые оболочки условно-патогенных или сапротрофных микроорганизмов нормальной микробиоты. В пользу этого говорит тот факт, что у питающихся только растительной пищей млекопитающих, которые используют осуществляемое в желудке или кишечнике микробное брожение для лучшего переваривания растительной биомассы и обогащения ее белками (в частности, речь идет о коровах и кроликах), B1-лимфоциты составляют не минорную, а мажорную фракцию В-лимфоцитов.

В-лимфоциты маргинальной зоны (сокращенно MZ-B-клетки) также способны отвечать на тимуснезависимые антигены и по ряду признаков схожи с B1-лимфо-

цитами. Свое название эти клетки получили исходя из основного места их локализации: они концентрируются в краевом, примыкающем к красной пульпе слое белой пульпы селезенки. Как и B1-лимфоциты, MZ-B-клетки характеризуются меньшим, чем у зрелых B2-лимфоцитов, количеством рецепторов с mIgD, могут отвечать на контакт с полисахаридсодержащими антигенами пролиферацией и продукцией антител преимущественно класса IgM, а также способны поддерживать свою численность за счет деления при отсутствии антигенной стимуляции. В отличие от B1-лимфоцитов они формируются из T1-B-клеток, т. е. ведут свое происхождение от общих с B2-лимфоцитами предшественников.

Под влиянием каких событий часть попавших в белую пульпу селезенки T1-клеток меняют характер своего созревания и мигрируют в противоположную сторону, уходя в зрелом состоянии не в первичные фолликулы, а в маргинальную зону, еще не выяснено. Но предполагается, что определенную роль в их образовании могут играть нейтрофилы, концентрирующиеся в селезенке именно в маргинальной зоне белой пульпы. Установлено также, что непосредственный контакт MZ-B-клеток с нейтрофилами и выделяемыми ими цитокинами повышает уровень ответа B-клеток маргинальной зоны на тимуснезависимые антигены. Предполагается, что нейтрофилы в этом случае играют роль, подобную роли T-хелперов подтипа 2 в развитии иммунных ответов на тимусзависимые антигены. Кроме того, после определяемых MZ-B-клетками иммунных ответов возникает иммунологическая память. По некоторым полученным на мышах данным часть продуцирующих IgM клеток памяти формируются именно из них.

Предположительно роль B-лимфоцитов маргинальной зоны может быть схожа с ролью B1-лимфоцитов вблизи слизистых оболочек – они обеспечивают более быстрое развертывание защиты против некоторых антигенов (3 суток вместо 7–10 суток при ответе с участием T-хелперов 2), попадающих непосредственно в кровоток. Характерное для селезенки замедление тока крови, вероятно, способствует удержанию таких антигенов в селезенке, где и создаются условия для иммунных ответов на них. Возникающие из активированных MZ-B-клеток плазмобласты уходят в красную пульпу и быстро пролиферируют, что и приводит к появлению в крови специфичных к антигену IgM уже на 3–4-е сутки.

Однако основными формами иммунных ответов в организме являются, конечно, ответы на тимусзависимые антигены. Именно они лежат в основе активных форм приобретенного иммунитета и обеспечивают выздоровление в ходе большинства инфекционных процессов.

3.4. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОК В ХОДЕ РАЗВИТИЯ ПЕРВИЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

Главным отличием дендритных клеток и макрофагов от других фагоцитов является их способность осуществлять **процессинг чужеродных антигенов**. Начальные этапы взаимодействия макрофага с антигенами практически не отличаются от обычного фагоцитоза, но после образования фагосомы происходит не уничтожение поглощенного антигена, а ферментативное разделение его на небольшие фрагменты. Для этого с образовавшейся фагосомой объединяются специфические

лизосомы, содержащие гидролитические ферменты, преимущественно так называемые кислые (действующие при низких значениях pH) протеазы.

В это же время в клетке, в определенных участках эндоплазматической сети, происходит формирование белков главного комплекса гистосовместимости класса II (MHC II). Эти белки в профессиональных антигенпредставляющих клетках образуются постоянно и предназначены для выведения на наружную поверхность цитоплазматической мембраны. По этим молекулам клетки иммунной системы конкретного организма узнают друг друга при когнатных (мембрана к мембране) взаимодействиях, поэтому на антигенпредставляющих клетках они присутствуют в значительных количествах.

Белки MHC II (рис. 32) состоят из двух полипептидных цепей – α и β с молекулярными массами 33 кДа и 28 кДа соответственно, каждая из которых имеет небольшой (15–25 аминокислотных остатков) цитоплазматический участок, трансмембранный домен (30 аминокислотных остатков) и внеклеточный регион, представленный двумя доменами по 90 аминокислотных остатков каждый.

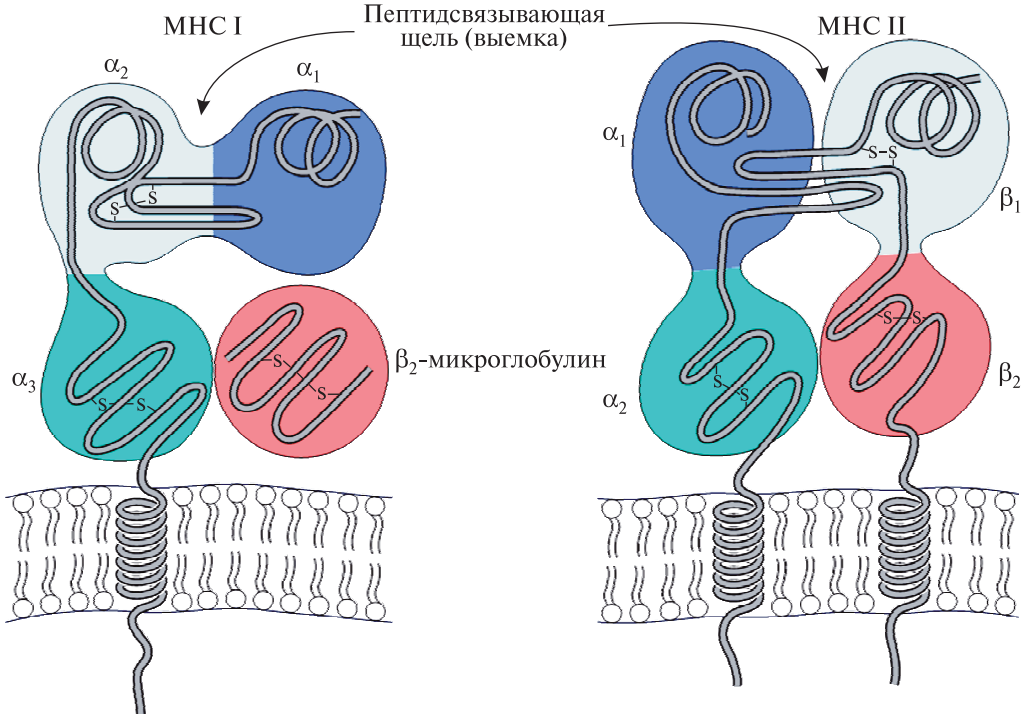


Рис. 32. Структура белков главного комплекса гистосовместимости (по 2013-KUBY Immunology)

Цепи закрепляются на мембране эндоплазматической сети таким образом, чтобы между их внеклеточными областями формировалась так называемая щель для связывания антигенного пептида. При отсутствии фрагментов чужеродных пептидов эта щель заполняется специальным белком с молекулярной массой около 35 кДа, который называется инвариантной цепью (сокращенно Ii-цепь). Размер

пептидсвязывающей щели невелик, поэтому в нее входит только определенный участок Ii-цепи протяженностью 25 аминокислотных остатков. Предполагается, что такое заполнение антигенсвязывающей щели защищает формирующийся комплекс от случайного попадания в него собственных пептидов клетки, присутствующих в этом же участке цитоплазматической сети. Другой конец инвариантной цепи имеет трансмембранный участок и выходящий с противоположной стороны мембраны фрагмент. Считается, что эти обращенные в цитоплазму фрагменты инвариантных цепей способствуют образованию специфических мембранных везикул, в которые превращаются данные участки эндоплазматической сети, и далее направляют движение этих везикул по специальному пути.

Если антигенпредставляющая клетка осуществляет фагоцитоз или пиноцитоз, то реализуется процессинг экзогенных антигенов (рис. 33, правая часть). В этом случае идущие от поверхности клетки сигналы определяют такое движение содержащих MHC II везикул, при котором они сливаются с лизосомами, содержащими кислые протеазы. Под влиянием этих ферментов инвариантная цепь расщепляется, но таким образом, чтобы находящийся в пептидсвязывающей щели ее фрагмент оставался на месте. Этот фрагмент получил название CLIP (от англ. фразы **cl**ass II-associated **i**nvariant chain **p**eptide).

Далее такая мембранная везикула сливается с фаголизосомой, в которой уже находятся пептиды, полученные за счет протеолиза чужеродных белков. И тут вступает в действие открытый недавно у мышей белок HLA-DM. По структуре этот белок похож на обычный белок MHC II, но он не связывается с мембраной и никогда не выносится на поверхность клетки.

Считается, что HLA-DM особым образом взаимодействует с CLIP и удаляет этот остаток инвариантной цепи из пептидсвязывающей щели. Тогда вместо CLIP в пептидсвязывающую щель встраивается один из пептидов, полученных при расщеплении чужеродных белков.

После этого осуществляется слияние мембранной везикулы с наружной цитоплазматической мембраной, причем таким образом, чтобы белки MHC II со встроенными чужеродными пептидами оказались на поверхности клетки. С этого момента клетка действительно становится способной представлять антиген другим иммунокомпетентным клеткам.

От описанной выше схемы отличается процессинг чужеродных антигенов, проникших в клетку без формирования фаголизосомы, например антигенов вирусов (см. рис. 33, левая часть). В этом случае чужеродные антигены находятся непосредственно в цитозоле, и для расщепления их на фрагменты используются протеосомы. Установлено, что в активированных образами патогенности или цитокинами антигенпредставляющих клетках формируются варианты протеосом, отличающиеся от обычных протеосом клетки. Они называются **иммунопротеосомами** и отличаются повышенной способностью расщеплять белки на короткие пептиды. Кроме того, такие протеосомы способствуют взаимодействию формируемых ими пептидов с белками TAP-1 и **TAP-2** (от англ. **T**ransporters associated with **A**tigen **P**rocessing).

Попавший в иммунопротеосому чужеродный антиген гидролитически фрагментируется, и образующиеся фрагменты связываются со специальными белками TAP-1 и TAP-2. Эти закрепленные в мембранах эндоплазматической сети белки, действуя совместно, обеспечивают перемещение фрагментов внутрь тех участков

эндоплазматической сети, в которых происходит сборка молекул главного комплекса гистосовместимости класса I (MHC I), причем такой транспорт нуждается в молекулах АТФ, т. е. является энергозависимым.

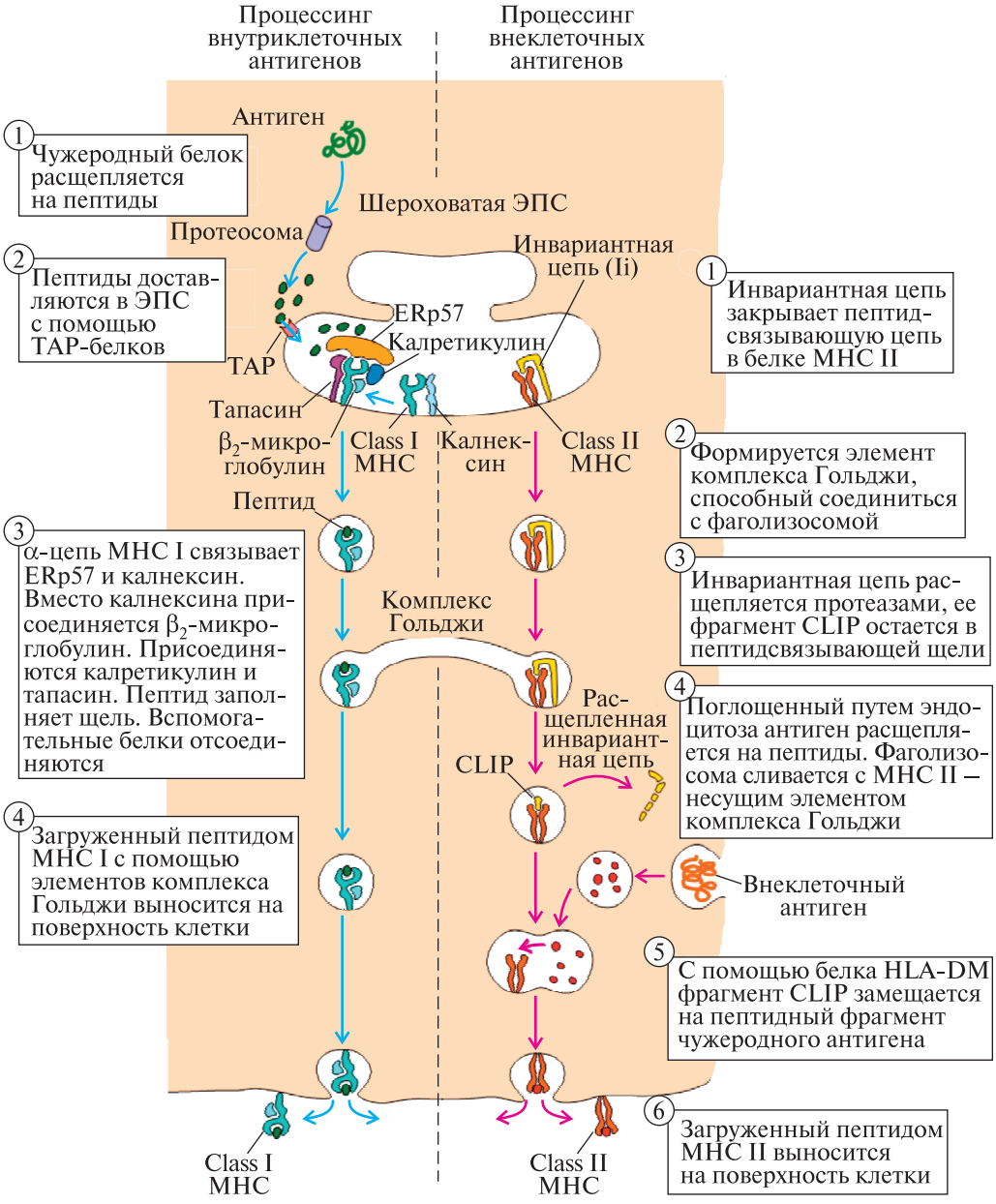


Рис. 33. Схема процессинга антигенов в зависимости от путей их попадания в клетку (по 2013-KUBY Immunology)

Молекула MHC I (см. рис. 32) также состоит из двух белковых цепей – α и β, однако, в отличие от MHC II, в мембране закрепляется только α-цепь. β-цепь не

имеет трансмембранного и цитоплазматического доменов и нековалентно присоединяется к α-цепи после закрепления последней в мембране. α-цепь белка MHC I (молекулярная масса 45 кДа) имеет три внеклеточных домена по 90 аминокислотных остатков каждый, трансмембранный домен протяженностью 25 аминокислотных остатков и цитоплазматический – 30 аминокислотных остатков. β-цепь значительно легче (12 кДа) и короче. Фактически она соответствует по размерам и расположению в молекуле MHC II второму домену β-цепи – β_2-домену, поэтому β-цепь в молекуле MHC I гораздо чаще называют «β_2-микроглобулин». Щель для присоединения фрагментов чужеродного антигена (здесь ее называют щелью Бьоркмана) в такой молекуле находится не между двумя цепями, а между доменами α_1 и α_2.

«Загрузка» белков MHC I также отличается от таковой для белка MHC II (рис. 34). В этом процессе участвуют несколько вспомогательных белков (шаперонов). Сначала к синтезированной на рибосомах α-цепи MHC I прикрепляется находящийся в жидкой фазе белок ERp57, который направляет ее к заякоренному в мембране ЭПС белку калнексину и способствует их объединению. При этом α-цепь закрепляется в мембране и приобретает близкую к окончательной пространственную конформацию, которую стабилизируют калнексин и остающийся связанным ERp57. Это создает условия для присоединения второй цепи белка MHC I – молекулы β_2-микроглобулина. Замена калнексина на β_2-микроглобулин приводит к формированию полной структуры белка MHC I, а оставшийся в связанном состоянии белок ERp57 закрывает пептидсвязывающую щель, препятствуя тем самым попаданию в нее каких-либо собственных пептидов клетки.

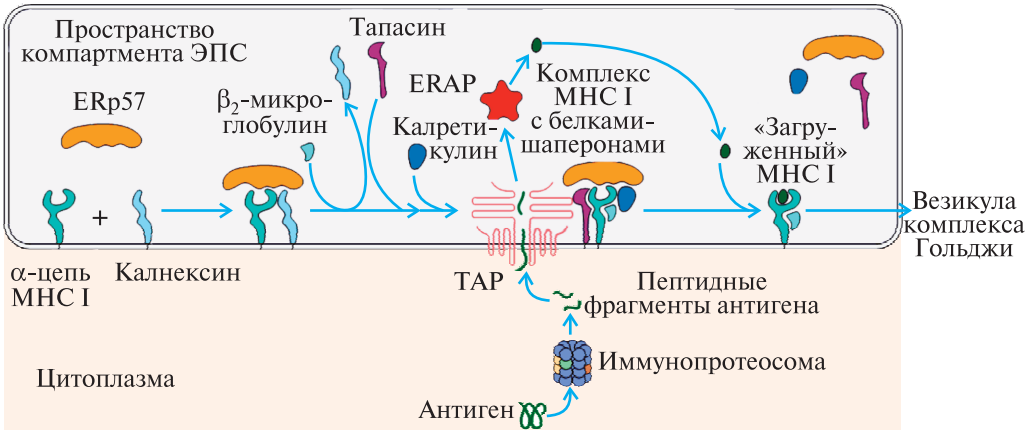


Рис. 34. «Загрузка» белка MHC I (по 2013-KUBY Immunology). Пояснения приводятся в основном тексте

Для освобождения петидсвязывающей щели нужны еще два шаперона – тапасин и калретикулин. Первый обладает способностью связываться как с α-цепью MHC I, так и с белками TAP, что позволяет ему доставить к месту закрепления MHC I систему переноса в пространство этого компартмента ЭПС пептидов из цитоплазмы. Переносимые TAP-белками пептиды подвергаются действию белка ERAP – аминопептидазы эндоплазматического ретикулюма, которая укорачивает разные по размерам пептиды до длины, пригодной для заполнения щели в MHC I. Калре-

тикулин, предположительно, способствует освобождению пептидсвязывающей щели от белка ERp57 и загрузке в нее отредактированного ERAP фрагмента чужеродного антигена. После этого все шапероны отсоединяются от стабилизированного чужеродным пептидом белка MHC I, и данный участок мембраны эндоплазматической сети начинает сворачиваться в замкнутую везикулу, которая перемещается к наружной цитоплазматической мембране. После слияния такой везикулы с наружной мембраной на поверхности антигенпредставляющей клетки появляется высокостабильный комплекс MHC I – фрагмент чужеродного антигена.

В настоящее время установлено, что два вышеописанных пути процессинга антигенов не изолированы друг от друга полностью. Макрофаги и дендритные клетки могут представлять Т-лимфоцитам один и тот же антиген как в сочетании с MHC I, так и с MHC II. Это явление получило название перекрестного представления антигена (от англ. cross-presentation). Причем когда антиген, обычно процессируемый по пути с участием MHC II, представляется в сочетании с MHC I, это называют перекрестным примированием (от англ. cross-priming), а когда наоборот – перекрестной толерантностью (от англ. cross-tolerance).

Суть перекрестного примирования, вероятно, в том, чтобы в дальнейшем, после представления антигена наивным Т-хелперам, такая антигенпредставляющая клетка была уничтожена Т-киллерами как потенциальный источник опасности. Перекрестная же толерантность (т. е. превращение изначальной мишени для Т-киллеров в невосприимчивые к их действию клетки) может быть объяснена следующим образом. Пораженная вирусом клетка, перешедшая к представлению фрагментов вирусных белков в сочетании с MHC II, может успеть до своей смерти обеспечить образование антител против данного вируса.

Перекрестное представление антигенов осуществляют лишь некоторые клетки. По всей вероятности, для такой перестройки дендритная клетка должна получить своеобразную «лицензию» – разрешение на этот процесс от $CD4^+$-клеток, однако молекулярные механизмы такого «лицензирования» пока не установлены.

Известно, что процессинг чужеродного антигена продолжается в течение нескольких часов (по некоторым данным до 20), но первые комплексы, включающие белок MHC и чужеродный пептид, появляются на поверхности дендритных клеток уже через 60 мин. Количество таких комплексов на клетке в конце процессинга определено как 10^2, тогда как общее количество молекул MHC составляет 10^5. Несмотря на то что несущих информацию о чужеродном антигене комплексов в 1000 раз меньше, чем не несущих, этого достаточно, чтобы макрофаг мог активировать Т-клетку.

Для продолжения развития иммунного ответа дендритная клетка или макрофаг должны, условно говоря, отыскать среди множества Т-клеток организма ту, у которой Т-клеточный рецептор будет комплементарен фрагменту чужеродного антигена. Хотя макрофаги подвижны, скорость их перемещения не является таковой, чтобы найти «свою» Т-клетку самостоятельно. По этой причине макрофаги перемещаются в ближайший вторичный лимфоидный орган (лимфоузел или пейерову бляшку), куда током крови постоянно заносятся все новые и новые лимфоциты и где вероятность встречи с «нужным» Т-лимфоцитом возрастает. Фактически по-

лучается, что за счет постоянной миграции по многократно повторяющейся схеме «кровоток – лимфоидный орган – кровоток» еще не активированные Т-лимфоциты, посещая поочередно вторичные лимфоидные органы, ищут «свои», соответствующие их клеточным рецепторам антигенпредставляющие клетки.

Поскольку расщепление антигена в ходе процессинга дает не один, а множество различных фрагментов, на поверхности макрофага в комплексах с белками MHC представлены разные антигенные детерминанты этого антигена, что, естественно, увеличивает вероятность обнаружения подходящего по специфичности партнера. Сколько времени уходит на такой поиск в организме, установить невозможно, но то, что он всегда оказывается успешным, не вызывает сомнений – у млекопитающих можно получить иммунный ответ практически на любой (кроме антигенов из организма однояйцевого близнеца) полный чужеродный антиген.

Когда искомый Т-лимфоцит найден, дальнейшие события будут зависеть от того, с каким белком MHC были ассоциированы в ходе процессинга фрагменты чужеродного антигена. Если это молекулы MHC II, то успешный контакт будет осуществлен с $CD4^+$-клеткой. Это должен быть так называемый «наивный» Т-хелпер, который после выхода из тимуса еще ни разу не делился (такие клетки часто обозначают как Т-хелперы подтипа «ноль», сокращенно T_H0).

Решающим моментом в начале такого контакта является комплементарность Т-клеточного рецептора и фрагмента чужеродного антигена. Но получаемого Т-хелпером через молекулу CD3 сигнала недостаточно для активации. В обязательном порядке должна сработать находящаяся рядом с рецептором молекула CD4. Как известно, она обладает сродством к молекуле MHC II, и именно через нее в клетку поступает дополнительный активационный сигнал.

Однако связывания описанных выше молекул также недостаточно для активации. Более того, если контакт ограничивается только таким взаимодействием, то клетка переходит к состоянию анергии, т. е. перестает отвечать на подобные сигналы в дальнейшем. Для начала активации в обязательном порядке необходимо взаимодействие еще одной пары молекул, которые перемещаются в мембранах клетки к уже соединившимся молекулам. Фактически в месте контакта формируется иммунологический синапс, который, по нынешним представлениям, принято делить на центральный супрамолекулярный комплекс, сокращенно cSMAC (от англ. **c**entral **s**upra**m**olecular **a**ctivating **c**omplex), и периферический супрамолекулярный комплекс – pSMAC (рис. 35).

Входящие в состав cSMAC костимуляторные молекулы – это молекула CD28 на Т-клетке и ее лиганд на антигенпредставляющей клетке, который представляет собой либо молекулу CD80, либо молекулу CD86 (ранее они назывались B7-1 и B7-2 соответственно). Контакт между ними обеспечивает поступление в Т-клетку второго активационного сигнала, из-за чего эти молекулы называют корецепторами, а само взаимодействие – костимуляцией.

По современным представлениям установившийся контакт должен быть достаточно продолжительным. Это следует из того, что вокруг cSMAC располагаются и попарно взаимодействуют молекулы адгезии, формируя периферическую часть иммунологического синапса. Со стороны антигенпредставляющей клетки в усилении адгезии участвуют молекулы ICAM-1 (она же CD54) и LFA-3 (она же CD58).

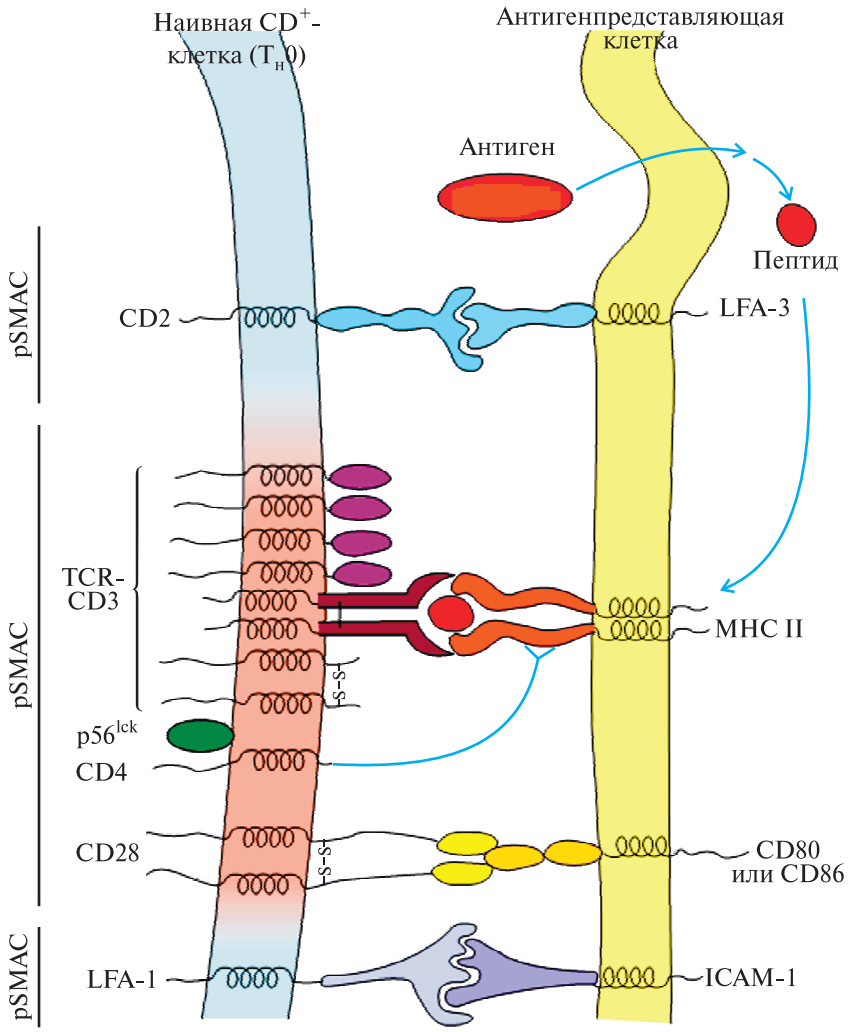


Рис. 35. Контакт между наивной $CD4^+$-Т-клеткой и дендритной клеткой (или макрофагом) в процессе представления антигена (по 2013-KUBY Immunology). Пояснения приводятся в основном тексте

Лигандами для них на поверхности Т-лимфоцита являются LFA-1 (она же CD11) и CD2 соответственно.

Необходимость второго, костимулирующего, сигнала доказана экспериментально на изолированных антигенпредставляющих клетках и наивных Т-хелперах. Более того, продемонстрировано, что при отсутствии костимуляции примированные антигеном Т-клетки переходят в состояние анергии.

Скорее всего, биологическая сущность корецепции в этом и заключается. Как известно, загрузка MHC II чужеродным пептидом происходит после предварительной активации антигенпредставляющей клетки чужеродным антигеном, которая и определяет появление на поверхности АПК значительного количества молекул CD80 или CD86. Попадание же собственных пептидов клетки в MHC II,

которое может происходить при аутофагии (процессе прижизненной деградации с помощью лизосом отслуживших свое молекул цитоплазмы), не сопровождается экспрессией кодирующих корецепторы генов. То есть в тех случаях, когда на поверхности клетки оказывается комплекс MHC II – собственный пептид, это идет на пользу организму – избежавшие отрицательной селекции в тимусе аутореактивные Т-клетки становятся неактивируемыми. Таким образом клональная анергия на периферии дополняет центральную иммунотолерантность.

Специальными экспериментами было установлено, что для запуска активации наивной Т-клетки достаточно даже одного эффективного когнатного взаимодействия, максимума активация достигает при 10 одновременно действующих комплексах MHC II – пептид.

Суть активации заключается в передаче от TCR и корецепторных молекул сигналов, приводящих к появлению нескольких транскрипционных факторов. К настоящему времени описаны некоторые сигнальные пути, которые используются Т-лимфоцитами при активации (рис. 36). Запускающим процесс включения сигнальных путей белком считается тирозинкиназа Lck из семейства Srk. Она постоянно связана с молекулой CD4, и когда образуется иммунологический синапс, рядом с ней оказывается мембранная тирозинфосфатаза CD45. Этот фермент отщепляет от тирозинкиназы Lck ингибирующую ее активность фосфатную группу, после чего активированная Lck фосфорилирует ITAM-участки в цепях молекулы CD3.

Это дает возможность еще одной тирозинкиназе, ZAP-70 (от англ. **z**-chain-**a**ssociated **p**rotein kinase of 70 kDa), получить фосфатную группу, стать активной и начать фосфорилировать основной адаптерный белок LAT (от англ. the **L**inker for **A**ctivation of **T** cells).

LAT-белок, фосфорилированный в нескольких сайтах, способен активировать различные белки, но для этого он должен связаться с адаптерным комплексом GADS (от англ. **G**RB2-related **a**daptor **d**ownstream of **S**hc) – SLP-76 (от англ. **S**H2 domain-containing **l**eukocyte **p**rotein of **76** kDa). Отсутствие любого из этих белков блокирует сразу несколько сигнальных путей.

Один из них заключается в активации фосфолипазы Cγ1 (PLCγ1) с участием киназы Itk и далее реализуется по стандартной схеме, приводя к образованию факторов транскрипции NFAT и NFκB. Еще один путь запускается при активации Grb-2 (от англ. **G**rowth factor receptor-**b**ound protein **2**), который связывает белок SOS, и далее через белок Ras запускается MAP-киназный каскад, приводящий к появлению фактора транскрипции AP-1.

Одновременно с участием белка VAV реализуется путь, приводящий к перестройкам цитоскелета, необходимым для секреции цитокинов с участием элементов комплекса Гольджи.

При связывании корецептора CD28 с лигандом при участии Grb-2 и фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) запускается начинающийся с белков Akt (**AKT**8 virus oncogene cellular homolog) и PDK (3-**p**hosphoinositide-**d**ependent protein **k**inase) путь, обеспечивающий клетке уход от апоптоза через взаимодействие белков BAX (**B**cl-2-**a**ssociated **X** protein) и BAD (**B**cl-2-**a**ssociated **d**eath promoter).

Конечным результатом всех запущенных когнатным взаимодействием процессов является активация нескольких групп генов, обеспечивающих: 1) продукцию цитокинов; 2) образование рецепторов для цитокинов; 3) изменение набора поверхностных молекул для последующих межклеточных взаимодействий.

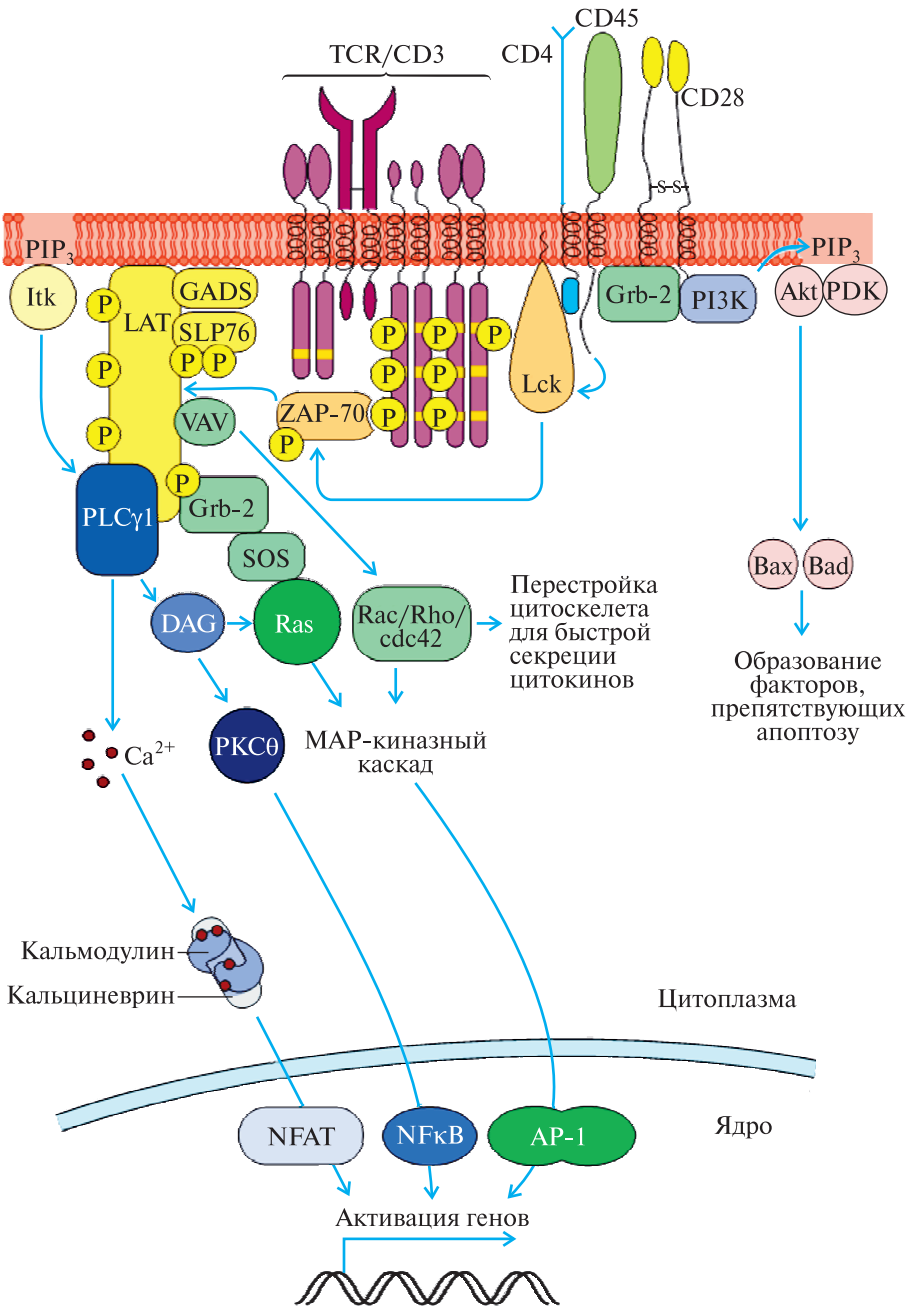


Рис. 36. Сигнальные пути, запускаемые в наивном Т-лимфоците при когнатном взаимодействии с антигенпредставляющей клеткой (по 2013-KUBY Immunology)

Сравнение поверхностных молекул наивных и активированных Т-хелперов показало, что в результате активирования молекулы CD28 частично заменяются на близкие по структуре, но противоположные по функции молекулы CD152 (ранее

известные как CTLA-4). Молекула CD152 при контакте с CD80/86 передает в клетку не стимулирующий, а ингибирующий сигнал, что, как предполагают, предотвращает избыточное стимулирование уже активированных Т-клеток. Кроме того, на поверхности активированных Т-хелперов появляются до сих пор отсутствовавшие молекулы CD154, которые необходимы для взаимодействия Т-клеток с В-лимфоцитами. Ранее такие молекулы называли CD40-лиганд и обозначали CD40L, поскольку они комплементарны молекуле CD40 на поверхности В-лимфоцитов.

Помимо новых поверхностных структур для когнатных взаимодействий на активированных Т-клетках увеличиваются разнообразие и количество рецепторов для цитокинов. Это особенно важно, поскольку только когнатное взаимодействие макрофага с Т-хелпером не обеспечивает полного активирования последнего. Экспериментально доказана необходимость гуморального стимулирования Т-клеток. Первоначально оно осуществляется за счет выделения дендритной клеткой или макрофагом в момент контакта с Т-хелпером **интерлейкина-12 (IL-12)**. (Ранее эту роль отводили интерлейкину-1, но при более детальном изучении дендритных клеток отдали интерлейкину-12.)

Небольшие количества локально действующего IL-12 связываются с рецепторами для него на Т-клетке и запускают через соответствующие сигнальные пути секрецию **интерлейкина-2 (IL-2)**, который впервые описан в 1976 г. как фактор роста Т-лимфоцитов. Действие IL-2, осуществляемое через определенные поверхностные рецепторы, заключается в преодолении клетками так называемой «точки рестрикции» в жизненном цикле клетки и, как следствие этого, переходе клеток к делению, т. е. интерлейкин-2 является типичным цитокином. В данном случае имеет место аутокринное действие IL-2: выделяемый клеткой цитокин запускает процессы деления в продуцирующих его клетках.

С этого момента начинается формирование клона активированных Т-хелперов, все клетки которого будут иметь одинаковый по специфичности взаимодействия с чужеродным антигеном TCR. Клон формируется в течение нескольких часов, при этом пролиферация вновь появляющихся клеток поддерживается интерлейкинами, которые постоянно продуцируются возникающими потомками.

В настоящее время установлено, что в зависимости от преобладания в месте формирования клона тех или иных цитокинов клетки формирующегося клона могут дифференцироваться на пять разных подтипов (табл. 12).

Таблица 12

Характеристика Т-хелперов различных подтипов

Подтип	Поляризующий цитокин	Главный фактор транскрипции	Секретируемый цитокин	Функция
T_H1	IL-12 INFγ IL-18	T-Bet	INFγ TNF	Обеспечивают активацию тканевых макрофагов на борьбу с внутриклеточными патогенами
T_H2	IL-4	GATA-3	IL-4 IL-5 IL-13	Обеспечивают активацию В-лимфоцитов и формирование гуморального иммунного ответа

Окончание табл. 12

Подтип	Поляризующий цитокин	Главный фактор транскрипции	Секретируемый цитокин	Функция
T_H17	TGFβ IL-6 (IL-23)	RORγ	IL-17A IL-17F IL-22	Поддерживают и усиливают воспалительные реакции, имеют отношение к аутоиммунным ответам
T_{REG}	TGFβ IL-2	FoxP3	IL-10 TGFβ	Регулируют уровень иммунных ответов, сдерживают избыточное развитие воспаления
T_{FH}	IL-6 IL-21	Bcl-6	IL-4 IL-21	Оказывают помощь при созревании аффинности и дифференциации активированных В-лимфоцитов в герминативных центрах

Цитокины, оказывающие наибольшее влияние на превращение размножающихся Т-хелперов в клетки того или иного подтипа, называют теперь поляризующими. Главное следствие их воздействия на Т-клетки – это появление в них определенного активатора транскрипции, от которого зависит экспрессия приводящих к дифференциации генов.

Представители каждого подтипа имеют определенные поверхностные молекулы и продуцируют в ходе жизнедеятельности свой набор интерлейкинов, что и определяет выполняемые ими функции.

Наиболее изученными и давно уже известными являются Т-хелперы подтипов 1 и 2 (T_H1 и T_H2). Именно с ними связывают основные проявления иммунных ответов на тимусзависимые антигены, осуществляемые с участием $CD4^+$-клеток.

Иммунный ответ, приводящий к продукции специфических по отношению к вызвавшему его антигену антител, реализуется благодаря появлению клонов T_H2. Как известно, сами Т-клетки не обладают способностью синтезировать и выделять иммуноглобулины, поэтому их роль заключается в активировании являющихся продуцентами антител В-лимфоцитов.

Т-хелперы 2 каждого конкретного клона появляются для того, чтобы найти среди множества имеющихся в организме зрелых В-лимфоцитов те, у которых BCR будут комплементарны фрагменту чужеродного антигена, вызвавшего активацию ставшего прародителем этого клона наивного Т-хелпера. Когда такой В-лимфоцит обнаружен, T_H2 вступает с ним в когнатное и гуморальное взаимодействие.

Обнаруживать T_H2 пригодный для активации В-лимфоцит помогают сами В-лимфоциты. Благодаря имеющимся на их поверхности BCR они связывают чужеродные антигены, поглощают комплекс BCR – антиген путем эндоцитоза и процессируют чужеродный антиген с использованием молекул MHC II. Кроме этого, контакт с антигеном заранее подготавливает В-клетку к увеличению продолжительности жизни и пролиферации в случае последующей активации. Это влияние антигена реализуется благодаря начинающимся от В-клеточного рецептора и корецепторных молекул сигнальным путям (рис. 37). Эти пути очень схожи

с теми, которые начинаются от клеточного рецептора и корецепторов Т-клеток, но инициирующими киназами здесь являются Lyn, Syk и Btk, а основной адаптерный белок носит название не LAT, а BLNK, и вместо фосфолипазы Cγ1 работает PLCγ2.

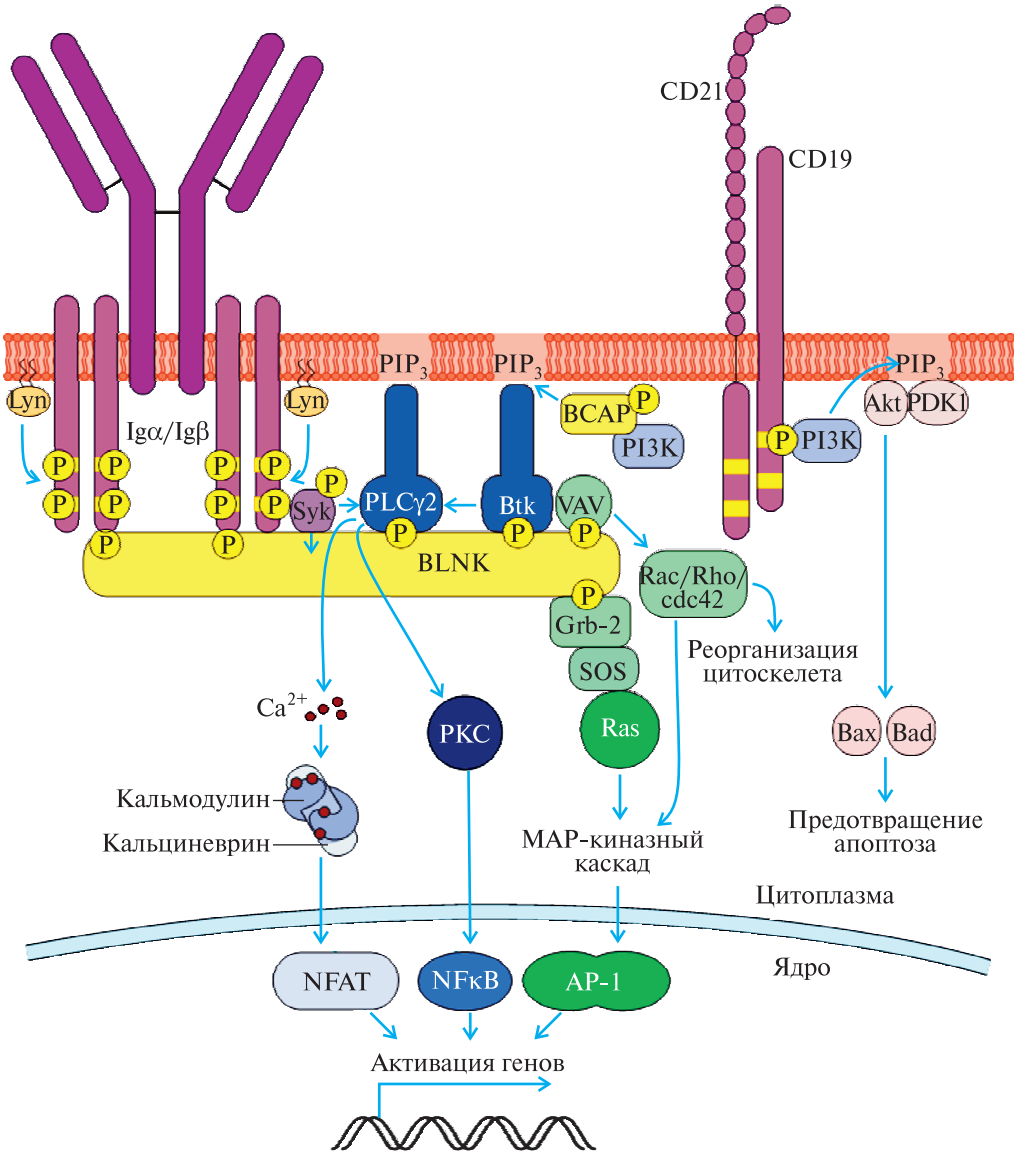


Рис. 37. Сигнальные пути, реализующиеся при связывании В-клеткой антигена

При столкновении перемещающихся через Т-клеточную зону вторичных лимфоидных органов наивных В-лимфоцитов с T_H2 первичный контакт устанавливается подобно тому, как это происходит при взаимодействии АПК с наивными Т-лимфоцитами, только в данном случае активирующей клеткой является T_H2.

Он узнает своим рецептором фрагмент чужеродного антигена, молекула CD4 взаимодействует с белком MHC II, срабатывают корецепторы CD28 и CD80 или CD86, и это приводит к взаимодействию CD154 на поверхности Т-лимфоцита и CD40 на поверхности В-клетки. Идущий от CD40 сигнал усиливает все ранее полученные от чужеродного антигена сигналы и подготавливает В-лимфоцит к делению.

Часть таким образом активированных В-лимфоцитов попадает под влияние выделяемого T_H2 интерлейкина-4 и начинает делиться еще на границе Т- и В-клеточных зон в лимфоузле или селезенке. Так образуется первичный фолликул, состоящий из В-клеток, которые продуцируют антитела класса IgM, обладающие первичной аффинностью своих рецепторов к чужеродному антигену.

Некоторые же В-лимфоциты после контакта с T_H2 смещаются глубже в В-клеточную зону и формируют вторичный фолликул. Здесь под влиянием интерлейкинов, выделяемых фолликулярными дендритными клетками, они осуществляют соматические гипермутации в генах, кодирующих последовательность аминокислот в V-доменах их В-клеточных рецепторов. Этот процесс, обозначаемый обычно англ. аббревиатурой SHM (**s**omatic **h**yper**m**utation), осуществляется с помощью специального фермента – активационно индуцируемой цитидиндезаминазы (сокращенно AID, от англ. **a**ctivation-**i**nduced cytidine **d**eaminase). Гипермутациями эти изменения в V-генах назвали из-за их очень быстрого (в течение нескольких часов) формирования.

Осуществившие изменения своего BCR клетки здесь же, в герминативном центре (так называют вторичные фолликулы в В-клеточной зоне), подвергаются проверке на сродство к чужеродному антигену. Эту проверку осуществляют фолликулярные дендритные клетки и фолликулярные Т-хелперы (T_{FH}). Дендритные клетки поставляют прошедшим гипермутационный процесс В-лимфоцитам антиген, те процессируют его и представляют Т-клеткам. Чем лучше связывают В-клетки антиген обновленным рецептором, тем больше они могут представить на своей поверхности комплексов MHC II – фрагмент антигена и тем больше получат от фолликулярных Т-хелперов сигналов на выживание и размножение. Если же В-клетка не получила улучшенный рецептор или получила аутореактивный рецептор, она не получает подобных сигналов и быстро умирает путем апоптоза. Описанный только что процесс получил название «**созревание аффинности**».

Но в герминативных центрах происходит еще один очень важный процесс – **переключение классов иммуноглобулинов**, или CSR в англ. аббревиатуре (от фразы «**c**lass **s**witch **r**ecombination»). Он осуществляется следующим путем (рис. 38).

Упоминавшийся выше фермент AID способен вызывать процесс образования двунитевых разрывов в особых участках хромосомы, обозначенных S (от англ. switch – переключение). Эти участки имеются в межгенных областях между всеми генами, кодирующими константные части тяжелых цепей иммуноглобулинов, кроме области между генами Cμ и Cδ. S-участок имеется также между сочетанием VDJ и геном Cμ.

При образовании индуцированного AID разрыва в этом участке и в любом другом ограниченный разрывами участок ДНК хромосомы закольцовывается и исключается из нее. Последовательности двух S-участков соединяются, что приводит к формированию готового для экспрессии гена. В этом гене VDJ-фрагмент остается неизменным (т. е. сродство вариабельной части тяжелой цепи остается

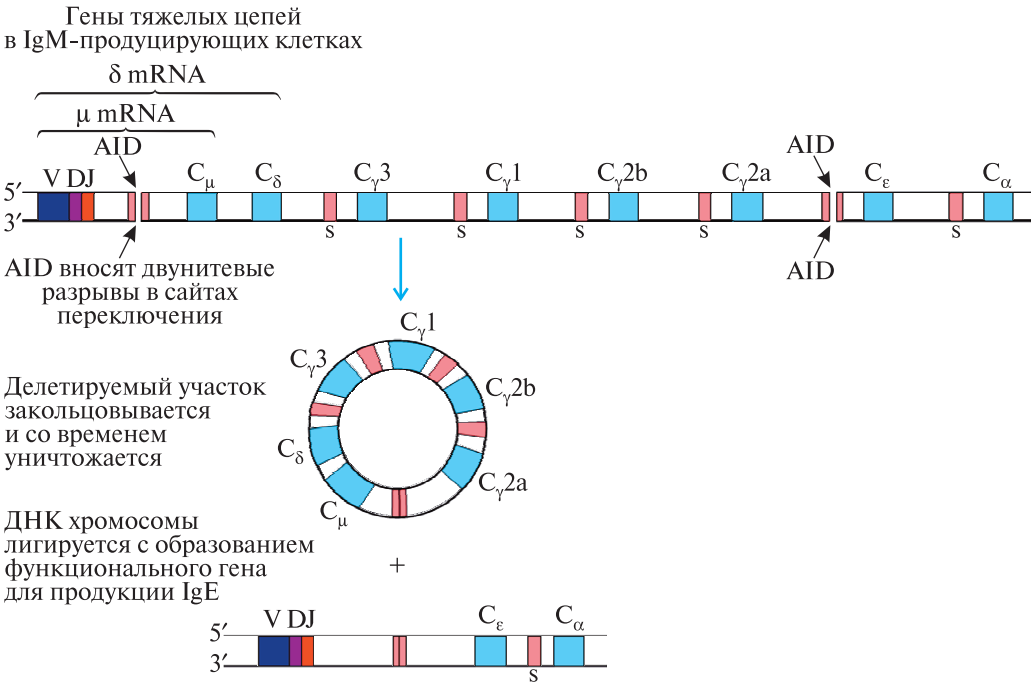


Рис. 38. Переключение продукции антител с класса IgM на класс IgE (по 2013-KUBY Immunology)

прежним), а остальная часть тяжелой цепи меняется. Таким образом прошедшие через герминативный центр (вторичный фолликул) В-лимфоциты получают способность продуцировать антитела остальных классов.

На какой именно класс происходит переключение, определяется воздействием определенных цитокинов. Интерлейкин-4 способствует переключению на подкласс IgG1 и класс IgE, TGFβ – на класс IgA и подкласс IgG2b, IL-5 – на класс IgA, IFNγ – на подклассы IgG3 и IgG2a.

Большая часть прошедших через повышение аффинности и переключение классов клеток превращается в плазматические клетки и приступает к продуцированию антител. Как правило, они подключаются к работавшим в начале первичного иммунного ответа IgM-продуцирующим клеткам на 7–10-е сутки после проникновения антигена и создают основное количество обеспечивающих защиту антител.

Меньшая часть превращается в клетки иммунологической памяти, которые перемещаются в красный костный мозг и получают возможность сохраняться в организме годами. Так закладывается основа для формирования в будущем вторичных иммунных ответов гуморального типа на вызвавшего первичный иммунный ответ антиген, т. е. основа активных форм иммунитета.

Характер действия Т-хелперов подтипа 1 (T_H1) существенно отличается от только что описанного. Они обеспечивают такую форму иммунного ответа на тимусзависимые антигены, которую относят не к гуморальным, а к клеточным вариантам защиты. Как указывалось выше (см. табл. 12), стимулирующими факторами для их развития при размножении потомков наивного Т-лимфоцита являются IL-12,

IFNγ и IL-18. Эти цитокины вырабатываются различными клетками в значительных количествах при их контакте с патогенами, которые предпочитают в организме хозяина вести внутриклеточное существование. В частности, дендритные клетки продуцируют указанные цитокины при активации их через патогенраспознающие рецепторы TLR4 и TLR3. При этом реализуются сигнальные пути, приводящие к образованию фактора транскрипции T-Bet, а не GATA-3, как при развитии T_H2.

После формирования клона T_H1 они, мигрируя по организму, задерживаются в местах локализации вызвавшего их образование антигена. Их основной задачей является выделение значительного количества характерных для них цитокинов INFγ и фактора некроза опухолей, которые имеют широкий спектр действия. В частности, они не только привлекают тканевые макрофаги и дендритные клетки, но и активируют их на лучший захват и процессирование антигенов, стимулируют в целом их бактерицидную активность и продукцию ими все того же INFγ, способствуют активации и пролиферации Т-киллеров. Перечисленные эффекты направлены преимущественно на борьбу с внутриклеточными патогенами, что и определяет преимущественное их образование при инфицировании организма микобактериями или вирусами. При этом сами T_H1 не оказывают губительного действия на инфицированные патогенами клетки, но создают условия для их уничтожения макрофагами или киллерными клетками.

Наглядно это можно продемонстрировать на примере введения туберкулина – фильтрата культуральной жидкости возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* – в кожу предплечья человека (известная всем проба Манту). У вакцинированных против туберкулеза или болеющих им людей в месте введения препарата в течение 48 ч развивается выраженное локальное воспаление, связанное с уничтожением тканевыми макрофагами клеток дермы, покрытых туберкулином. Такую реакцию традиционно считают проявлением **гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)**. О причастности Т-лимфоцитов к проявлению этого типа гиперчувствительности известно еще с начала XX в., но выяснить, что $T_{ГЗТ}$ (Т-лимфоциты гиперчувствительности замедленного типа) являются на самом деле T_H1, удалось только в конце прошлого столетия.

Следует отметить, что приведенный выше пример демонстрирует не только характер такого иммунного ответа, но и формирование иммунологической памяти. Упомянутая реакция на пробу Манту не проявляется у человека несенсибилизированного, т. е. не имевшего контакта с возбудителем туберкулеза или противотуберкулезной вакциной. Развитие воспаления у сенсибилизированных характерными для *Mycobacterium tuberculosis* антигенами людей объясняется тем, что после первого попадания антигена и развития первичного иммунного ответа некоторое количество T_H1 из формировавшихся при таком ответе клонов не погибло, а они перешли в состояние клеток иммунологической памяти.

Еще одним вариантом иммунных ответов клеточного типа является **образование цитотоксических Т-лимфоцитов** (в англ. аббревиатуре CTL, или Tc). Они формируются из $CD8^+$-Т-лимфоцитов, или, как их ранее называли, Т-киллеров. В настоящее время установлено, что выходящие из тимуса зрелые $CD8^+$-клетки еще не способны осуществлять давшие им название функции и представляют собой лишь предшественники цитотоксических Т-лимфоцитов или наивные Т-киллеры. Для их превращения в цитотоксические Т-лимфоциты необходима активация, которую осуществляют дендритные клетки совместно с $CD4^+$-клетками.

Как указывалось выше, процессинг попавших в цитоплазму клетки чужеродных антигенов осуществляется преимущественно с участием белков MHC I. Если дендритная клетка процессировала такой антиген, то при столкновениях с наивными Т-лимфоцитами во вторичных лимфоидных органах она войдет в плодотворный в плане активации контакт только с наивным Т-киллером. Это обусловлено тем, что и в этом случае, как и при активации наивных Т-хелперов, необходимо двойное распознавание. Начальным моментом в формировании плодотворного контакта является соответствие Т-клеточного рецептора наивного Т-киллера фрагменту чужеродного антигена, но одновременно должно происходить и взаимодействие белка MHC с находящейся рядом с рецептором дополнительной молекулой. Как известно, у Т-киллеров такой молекулой является CD8, которая обладает сродством к белкам MHC I.

Далее все осуществляется практически по такой же схеме, как при контакте дендритных клеток и наивных Т-хелперов (см. рис. 35). Образуется иммунологический синапс, в центральной части которого взаимодействуют корецепторные молекулы CD28 на Т-киллере и CD80 или CD86 на дендритной клетке. В периферической части синапса срабатывают усиливающие адгезию молекулы: LFA-1 (она же CD11) дендритной клетки связывается с ICAM-I (она же CD54) на Т-киллере, а вторую адгезивную пару составляют CD2 дендритной клетки и LFA-3 (она же CD58) Т-лимфоцита.

Основные сигнальные пути, запускаемые в Т-киллерах, практически ничем не отличаются от путей, реализуемых в наивных Т-хелперах при их активации антигенпредставляющими клетками (см. рис. 37). Однако появление аналогичных активаторов транскрипции в киллерах дает еще один эффект: в клетке начинается продукция гранзима В и перфорина, которые накапливаются в замкнутых везикулах эндоплазматической сети.

Но такие клетки не проявляют сразу же киллерную активность. Они отсоединяются от активировавших их дендритных клеток и начинают пролиферировать. Толчком для начала пролиферации служит воздействие IL-2 экзогенного происхождения, источником которого являются активированные $CD4^+$-клетки. Это было подтверждено экспериментами на трансгенных мышах, у которых нокаутированы необходимые для синтеза IL-2 гены. После начала пролиферации клон может поддерживать свою способность к увеличению численности за счет продукции собственного IL-2.

Кроме того, на других трансгенных линиях мышей показано, что для успешного формирования активных Т-киллеров обязательно необходимы активированные T_H1 или T_H17. Причем они не только служат источниками запускающего пролиферацию IL-2, а особым образом при когнатных взаимодействиях стимулируют дендритные клетки на контакты в дальнейшем именно с наивными Т-киллерами.

В настоящее время установлено, что при активации $CD8^+$-клеток идет и их дифференциация. По крайней мере, у мышей уже обнаружены два подтипа цитотоксических Т-лимфоцитов, которые обозначают Tc1 и Tc2. Эти варианты слегка напоминают T_H1 и T_H2 по спектру образуемых ими цитокинов и по влиянию цитокинов на их формирование. Для появления клеток подтипа Tc1 нужен не только IL-2, но и IFNγ, которого они и продуцируют больше, а для развития клона Tc2-клеток нужен IL-4, который они продуцируют потом преимущественно.

Показано также, что киллеры подтипа Tc1 при воздействии на клетки-мишени используют как перфорин-гранзимовый способ, так и запуск апоптоза в мишени посредством передачи сигнала через Fas-рецептор (CD95), для чего у них имеется высокий уровень экспрессии Fas-лиганда. CTL подтипа Tc2 используют только первый из вариантов киллерного действия.

Следует отметить, что действие перфорина на мембрану клетки-мишени осуществляется только в пределах иммунологического синапса. При этом собственная мембрана киллера остается неповрежденной, и он, после восстановления несущих перфорин и гранзим гранул, может повторять контакты со следующими клетками-мишенями.

Ранее считалось, что связанная с $CD8^+$-клетками форма иммунного ответа реализуется только в период контакта с возбудителем и иммунологической памятью не характеризуется. В настоящее время доказано сохранение части активированных Т-лимфоцитов из каждого клона, формирующегося в ходе соответствующего иммунного ответа, в виде $CD8^+$-клеток памяти.

Возникающая в результате описанных выше иммунных ответов иммунологическая память лежит в основе активных форм приобретенного иммунитета, который, в свою очередь, базируется на вторичных иммунных ответах.

Различия в характере первичного и вторичного иммунных ответов можно проследить по количеству, изотипическому составу и уровню специфичности образующихся в организме антител (иммуноглобулинов) (рис. 39).

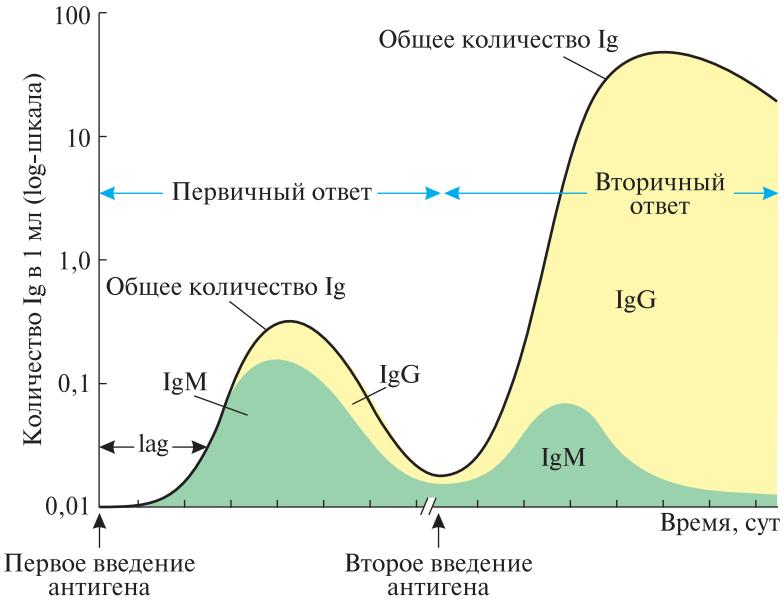


Рис. 39. Сравнительная характеристика первичного и вторичного иммунных ответов (по 2013-KUBY Immunology)

При первичном иммунном ответе в первые трое суток после попадания во внутреннюю среду организма конкретного антигена количество специфичных по отношению к нему антител нарастает медленно. Это можно объяснить тем,

что определенное время уходит на процессинг антигена, перемещения клеток, установление межклеточных контактов, образование клонов Т-хелперов, а затем клонов В-лимфоцитов. Когда клоны уже образованы, за счет множества плазматических клеток происходит быстрое, отражаемое на графике логарифмической кривой нарастание количества антител, которое продолжается от 2 до 7 суток. В результате этого к 10-м суткам количество антител достигает максимума и сохраняется на этом уровне последующие 15–20 суток. Затем количество антител постепенно уменьшается и через 2–3 месяца антител, специфичных к данному конкретному антигену, в организме практически не остается.

В случае же вторичного иммунного ответа первый этап (этап формирования клонов) сокращается до нескольких часов, поскольку клоны образуются из сохранившихся после первичного иммунного ответа В-клеток памяти. Соответственно, в организме сразу наблюдается быстрое логарифмическое нарастание титра антител, который может достигать максимума уже на 3–5-е сутки. Как правило, максимальный титр антител при вторичном иммунном ответе оказывается большим, чем при первичном, и снижение титра происходит в течение большего отрезка времени.

Кроме того, при первичном иммунном ответе в первые несколько суток среди образующихся антител преобладают иммуноглобулины класса (изотипа) IgM. Затем по мере нарастания титра происходит увеличение процентного содержания IgG, и при максимальном титре они составляют более 99 %. При вторичном иммунном ответе первые же образующиеся антитела являются IgG. Установлено также, что антитела, взятые из организма на 10–20-е сутки после первого попадания антигена, обладают большей аффинностью (сродством) к нему, чем антитела, образующиеся в первые сутки первичного иммунного ответа. При вторичном иммунном ответе первые же образующиеся антитела обладают максимальной аффинностью. По всей вероятности, существует какой-то пока не открытый путь отбора и превращения в клетки памяти тех В-лимфоцитов, у которых в ходе развития первичного иммунного ответа уже произошло переключение продукции антител с классов IgM и IgD на класс IgG и антитела которых обладают наиболее высоким сродством к антигену.

Реализующаяся в ходе первичного иммунного ответа смена классов образующихся антител находит логическое объяснение исходя из структуры и свойств иммуноглобулинов. Секретированные клеткой иммуноглобулины класса IgM являются пентамерами и имеют 10 (а не 2, как мономерный IgG) антигенсвязывающих участков (паратопов), но они заметно уступают IgG в способности проходить через стенки капилляров и распространяться по организму. По этой причине в первые часы (сутки) первичного иммунного ответа, когда надо максимально прочно связать еще, условно говоря, незнакомый организму антиген и ограничить его распространение, иммуноглобулины класса М являются наиболее подходящими. Но в то же время организму приходится решать задачу по обеспечению защиты от возможного нового проникновения этого антигена, и защита эта должна охватывать весь организм. Для решения этой задачи и образуются (причем в гораздо больших, чем IgM, количествах) высоко мобильные IgG. Во время вторичного иммунного ответа организм сразу же решает обе задачи за счет быстрого (в течение одних суток) появления большого количества иммуноглобулинов класса G.

Следует также отметить, что в ходе вторичных иммунных ответов антиген клеткам памяти могут представлять не только дендритные клетки и макрофаги, но и другие клетки организма, что, как считают некоторые исследователи, делает вторичный иммунный ответ еще более быстрым по развитию.

Суммируя вышеизложенное, можно констатировать, что с точки зрения защиты от антигена (например, возбудителя болезни) вторичный иммунный ответ оказывается более эффективным, чем первичный. Благодаря этому во многих случаях вызванный возбудителем инфекционный процесс останавливается на стадии инкубационного периода и не доходит до стадии проявления симптомов болезни – человек практически не замечает, что был инфицирован. Особенно важно, что при вторичном иммунном ответе, так же как и при первичном, каждый вновь образовавшийся клон В-лимфоцитов дает новые клетки памяти, продлевая тем самым уже имеющийся активный иммунитет. Это означает, что, эффективно защищая себя при второй (третьей и т. д.) встрече с уже известным антигеном, организм обеспечивает себе защиту от возможного последующего контакта с ним. Поэтому по отношению к наиболее распространенным и в силу этого потенциально более опасным антигенам (возбудителям болезни) активная защита может поддерживаться в течение всей жизни.

3.5. ЗНАЧЕНИЕ МИГРАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ДЛЯ РАЗВИТИЯ ИММУННЫХ ОТВЕТОВ

В отличие от других лейкоцитов Т- и В-лимфоциты не уходят на постоянное местожительство в ткани, а перемещаются в кровотоке и лимфе, периодически задерживаясь во вторичных лимфоидных органах. Причем в ходе такой миграции Т-и В-клетки локализуются в них в различных зонах, т. е. в период оседлости они оказываются пространственно разобщены.

Наиболее четко эта особенность локализации лимфоцитов выражена в лимфатических узлах. **Лимфатический узел** (рис. 40) представляет собой обособленный от остальной части организма капсулой из соединительной ткани орган, разделенный направленными внутрь выростами этой капсулы на доли. Доли лимфоузла имеют сходное строение и состоят из трех слоев: субкапсулярного коркового, глубокого коркового и мозгового. В каждую долю входит артериола и выходит венула, причем соединяющие их капилляры располагаются в глубоком корковом слое.

К каждому узлу подходит несколько афферентных (приносящих) лимфатических сосудов и выходит один, более крупный, эфферентный (выносящий) сосуд. Притекающая по афферентным сосудам лимфа попадает в субкапсулярный маргинальный (краевой) синус и просачивается через слои каждой доли в направлении от субкапсулярного коркового до мозгового.

Мозговые слои долей объединяются, и в мозговом веществе имеется медуллярный синус, собираясь в котором, лимфа и перетекает в эфферентный лимфатический сосуд. Проходя через слои лимфоузла, лимфа очищается от попавших из тканей компонентов, в том числе и от чужеродных антигенов, если таковые имеются. Осевшие в слоях лимфоузла загрязнения уничтожаются постоянно присутствующими здесь макрофагами лимфоузлов и макрофагами, пришедшими

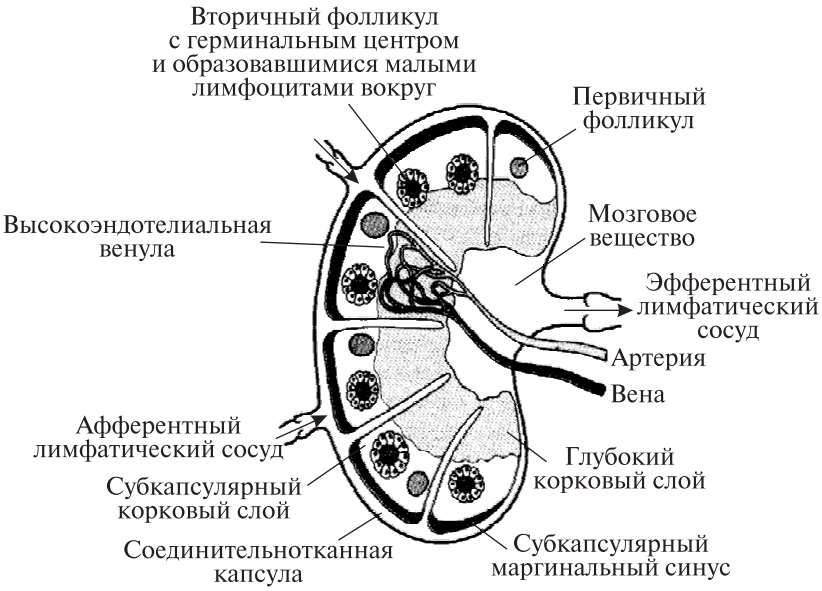


Рис. 40. Схема строения лимфатического узла
(по D. M. Wier, J. Stewart, 1997)

в лимфоузел с притекающей лимфой. Большинство макрофагов обнаруживается на границах коркового и мозгового слоев, из-за чего их иногда называют береговыми макрофагами.

Очищение лимфы не единственная функция лимфоузлов, они также обеспечивают условия для пролиферации (размножения) активированных В-лимфоцитов. При микроскопировании срезов через доли лимфоузла в субкапсулярном корковом слое выявляются первичные и вторичные фолликулы, представляющие собой скопления В-клеток, что и дает основание называть этот слой В-клеточной зоной. Первичным фолликулом считается группа не делящихся в данный момент В-лимфоцитов, а вторичным – возникшая из первичного фолликула группа делящихся клеток. Центральную часть вторичного фолликула называют герминальным (герминативным) центром, или центром размножения. Количество таких фолликулов увеличивается в период присутствия в организме чужеродных антигенов (например, при инфекционном заболевании), поэтому считается, что субкапсулярный корковый слой является местом развития клонов активированных Т-хелперами В-лимфоцитов, т. е. местом реализации последнего этапа гуморального иммунного ответа на тимусзависимые антигены. Предполагается также, что находящиеся в непосредственной близости с фолликулами дендритные клетки лимфоузлов способны дополнительно представлять клеткам формирующихся клонов чужеродный антиген и тем самым способствовать формированию клеток иммунной памяти.

В отличие от субкапсулярного в глубоком корковом (паракортикальном) слое преобладают Т-лимфоциты, поэтому его называют Т-клеточной, или тимусзависимой, зоной. Второе название этой зоны не случайно – показано, что у тимэктомированных или изначально бестимусных животных (белых мышей линии nude) этот слой в лимфоузлах сильно деградирован или же вообще отсутствует. Считается, что для нормального функционирования этого слоя как места лока-

лизации Т-клеток в период оседлости необходимо наличие в организме определенного количества выделяемых тимусом гормонов, в частности тимозинов, тимопоэтина и тимулина.

Предполагается, что пространственное разделение Т- и В-лимфоцитов имеет определенный биологический смысл – потомки активированных Т-хелперами В-лимфоцитов (т. е. клетки формирующихся в результате иммунного ответа клонов) уже не должны вступать в когнатные (мембрана к мембране) взаимодействия с активирующими Т-клетками, поскольку это может помешать пролиферации, подготовке к секреции иммуноглобулинов или превращению в клетки памяти. По современным представлениям в пределах В-клеточной зоны могут присутствовать Т-клетки, но это особые разновидности $CD4^+$-клеток, такие как фолликулярные хелперы (T_{FH}) и специальные регуляторные клетки (T_{REG}), но механизмы и характер их действия еще не исследованы.

В какой-то мере подтверждением такого предположения можно считать тот факт, что и в других вторичных лимфоидных органах – селезенке и пейеровых бляшках – также имеет место пространственное разобщение Т- и В-клеток. В частности, в пейеровой бляшке Т-клеточной зоной является ее периферическая часть, а В-лимфоциты, так же как и в лимфоузлах образующие фолликулы, располагаются в центре бляшки.

В селезенке, которая представляет собой самый крупный из вторичных лимфоидных орган, различают красную и белую пульпу (рис. 41). И то и другое – скопление клеток крови, поступающих по артериям, расположенным в отходящих от соединительнотканной капсулы перегородках (трабекулах). Уходящие в пространство селезеночных долек артериолы ветвятся на капилляры, стенки которых способны пропускать все клеточные элементы крови. Вышедшие из капилляров клетки распределяются неравномерно: непосредственно вокруг капилляров и мелких артериол скапливаются лимфоциты, образуя белую пульпу (мальпигиевы тельца селезенки), а все остальные клетки крови, среди которых подавляющее большинство составляют окрашенные в красный цвет эритроциты и тромбоциты, – красную.

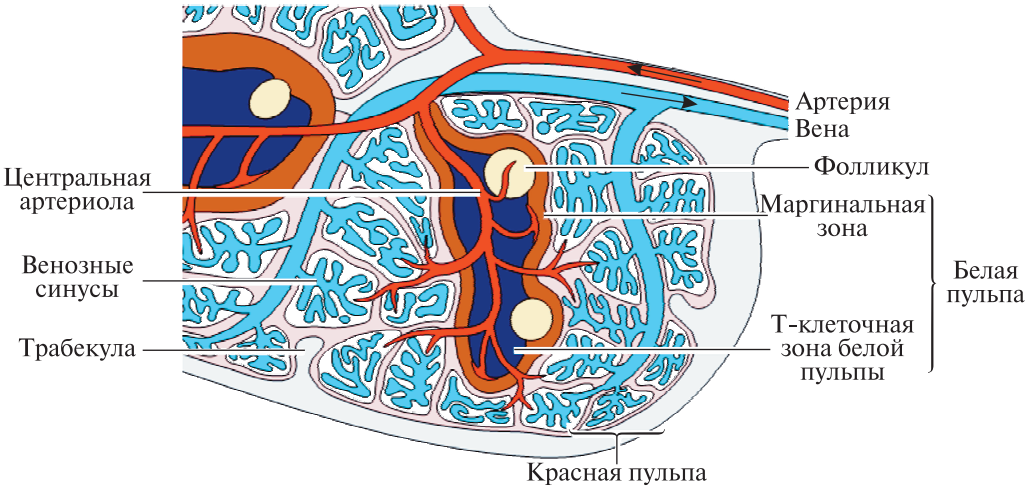


Рис. 41. Схематичное изображение строения селезенки (по 2013-KUBY Immunology)

В свою очередь уже в пределах белой пульпы выявляется разделение на Т-клеточную зону (располагается непосредственно вокруг мелких артериол, образуя периартериальную муфту) и В-клеточную зону (называемую также мантией), примыкающую к красной пульпе. В последней, как и в субкапсулярном слое лимфоузлов, выявляются фолликулы, количество которых возрастает при попадании в кровоток чужеродных антигенов. Считается, что селезенка является основным местом формирования клонов активированных В-лимфоцитов при гуморальной форме иммунного ответа и именно из селезенки в кровь через стенки расширенных венозных капилляров попадает большая часть антителопродуцирующих плазматических клеток.

Как и лимфоузлы, селезенка служит местом непосредственных контактов трех основных групп иммунокомпетентных клеток, участвующих в развитии иммунных ответов на попавшие в кровь чужеродные антигены: макрофагов, Т-хелперов и еще не активированных В-лимфоцитов. Описанное выше расположение лимфоцитов в белой пульпе и прилегание белой пульпы к артериолам представляется наиболее оптимальным для таких взаимодействий. Условная логика здесь такова: поглотивший в кровотоке чужеродный антиген макрофаг сразу же после выхода из артериолы попадает в окружение Т-лимфоцитов, что позволяет ему достаточно быстро обнаружить тот из них, который имеет соответствующий процессированному антигену Т-клеточный рецептор. Активированный таким воздействием Т-хелпер пролиферирует, и его потомки, сталкиваясь с выходящими из артериол и перемещающимися в направлении мантии еще не активированными В-лимфоцитами, находят и активируют В-клетку с соответствующим В-клеточным рецептором. Такой уже активированный В-лимфоцит смещается в В-клеточную зону и пролиферирует, давая начало клону плазматических (антителопродуцирующих) клеток. Далее плазматические клетки смещаются в сторону прилегающих к В-клеточной зоне расширенных венозных капилляров, проходят через их стенки и возвращаются в кровоток, где и продуцируют нужные в данный момент организму антитела. Согласно такой схеме вероятность продуктивных в плане развития иммунных ответов контактов между макрофагами, Т-хелперами и В-лимфоцитами представляется большей, чем при постоянном перемещении клеток в кровотоке.

Таким образом, можно с определенной степенью условности считать, что лимфоузлы служат предпочтительным местом для формирования ответа на попавшие в тканевую жидкость и лимфу чужеродные антигены, в то время как селезенка создает условия для ответа на антигены, попавшие в кровоток.

Находит логичное объяснение и необходимость именно такой, с остановками во вторичных (периферических) лимфоидных органах, миграции лимфоцитов. Поскольку, как вы знаете, неактивированные В- и Т-лимфоциты строго индивидуальны по специфичности своих антигенраспознающих рецепторов (т. е. каждый из них фактически присутствует в организме в данный момент в единственном числе), для формирования иммунного ответа на попавший именно сейчас чужеродный антиген клетки должны постоянно мигрировать. В противном случае вероятность встречи нужного Т-хелпера с представляющим антиген макрофагом существенно уменьшается. В то же время, если бы клетки мигрировали без остановок, вероятность необходимых для активации тесных (когнатных, мембрана к мембране) контактов также была бы непозволительно низкой. Кроме того, формирование клонов уже активированных Т- и В-лимфоцитов происходит под

непосредственным воздействием конкретных выделяемых активирующими и активируемыми клетками интерлейкинов (цитокинов). Известно, что время существования большинства интерлейкинов исчисляется минутами. Следовательно, если бы клетки не находились в непосредственной близости друг от друга, как, например, В-лимфоциты во вторичных фолликулах, создать действующую концентрацию активирующих молекул, допустим, во всем кровотоке, по которому распределились бы активируемые клетки клона, было бы невозможно. Плюс к этому создание высоких концентраций тех или иных интерлейкинов в кровотоке неминуемо приводило бы к ненужной в данный момент для организма активации множества клеток, поскольку взаимодействие лиганд – рецептор является чисто химическим процессом и его вероятность пропорциональна концентрации лиганда. Во вторичных же лимфоидных органах (лимфоузлах, селезенке, пейеровых бляшках, других лимфоидных скоплениях), при условии постоянной миграции Т- и В-лимфоцитов с остановкой (задержкой) активированных вариантов их именно здесь, создаются идеальные условия как для когнатных, так и для гуморальных (за счет выделяемых интерлейкинов) взаимодействий.

3.6. ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

К индуцибельным защитным механизмам относится и такое явление, как гиперчувствительность по отношению к некоторым антигенам. Рассматривать эту группу иммунных ответов организма отдельно приходится из-за того, что в результате их развития возникают выраженные в виде нежелательных симптомов отклонения от нормальных физиологических функций, которых нет при обычном иммунном ответе.

Первые сведения о подобных реакциях на антиген получил Р. Кох в 1980 г. при введении в кожу человека туберкулина – фильтрата жидкой культуры возбудителя туберкулеза. Развивающиеся в ответ на введение туберкулина покраснение и уплотнение кожи фактически были проявлением гиперчувствительности замедленного типа, однако на тот момент местную по проявлению, да еще и вызванную экспериментально реакцию никто не посчитал чем-то особенным. Поэтому начальной точкой отсчета в истории изучения гиперчувствительности принято считать проведенные в 1902 г. эксперименты Ш. Рише и П. Портье. Эти исследователи изучали токсичность экстрактов из щупалец актиний, используя в качестве тест-системы собак. При первом введении экстрактов у подопытных животных не наблюдалось никаких симптомов отравления, но вторая инъекция этим же животным того же препарата, сделанная через несколько недель после первой, приводила к очень быстрому развитию слабости, рвоты, затруднению дыхания и в некоторых случаях к смерти. Зная о том, что введение антигенов вызывает у животных иммунитет (защиту от антигена), авторы назвали открытое ими явление **анафилаксией** (от греч. anaphylaxis, где ana – отрицательная частица **не**, phylaxis – защита).

Подобную реакцию у морских свинок, но уже на введение лошадиного белка, наблюдали в 1905 г. Г. П. Сахаров и Т. Смит. Проводя работу по оценке качества антитоксических сывороток, полученных из организма иммунизированных

дифтерийным токсином лошадей, они вынужденно использовали животных, которые несколько недель назад подвергались инъекциям смеси токсина и сыворотки. Поскольку токсин сывороткой нейтрализовался и эти животные не имели никаких симптомов отравления, их посчитали интактными и вторично использовали в опытах. Однако повторное введение смеси токсина и сыворотки привело к гибели животных в течение 3–5 мин, при этом изменения в их состоянии не имели ничего общего с симптомами, вызываемыми действием дифтерийного токсина. Сразу же после инъекции регистрировались затруднение дыхания, кашель, удушье, судороги и смерть. Выясняя причину случившегося, авторы провели дополнительные эксперименты и убедились, что вызывает названные симптомы не токсин, а сыворотка крови лошади. Причем происходит такая реакция только при повторных инъекциях, что и позволило считать случившееся проявлением анафилаксии в крайней степени выражения **(анафилактический шок)**.

Дальнейшие исследования на других видах животных показали, что анафилактическая реакция не является чем-то уникальным и, вероятно, свойственна всем млекопитающим. Практиковавшие введение сывороток медики сопоставили наблюдавшиеся ими факты ухудшения самочувствия у некоторых пациентов после нескольких инъекций сывороток с полученными на животных данными и пришли к выводу, что и у человека возможны такие реакции. В частности, К. Пирке в работе 1906 г. уже с позиций анафилаксии попытался объяснить описанную им ранее сывороточную болезнь и применил термин **«аллергия»** (от греч. allos ergon – другое действие) к таким случаям избыточной реакции на антигены.

Признанием важности для медицины такого явления, как гиперчувствительность иммунной системы, стало присуждение Ш. Рише Нобелевской премии 1913 года за цикл работ по изучению анафилаксии.

Проведенные в первой половине XX в. исследования показали, что люди не одинаковы по проявлению симптомов гиперчувствительности и повышенная чувствительность к определенным антигенам имеет семейный характер. В 1923 г. А. Кока и Р. Кук, описывая симптоматику наиболее тяжелых проявлений аллергический состояний у человека (крапивницы, экземы, астмы, сенной лихорадки), предложили называть такие проявления **атопией**, подчеркивая тем самым нетипичность таких ответов на антиген для человека как вида. Постепенно по мере накопления сведений о распространенности в популяциях человека такого типа реагирования на антиген термин «атопия» стал приобретать несколько иной смысл – так стали называть наследственно обусловленную склонность к аллергии, а имеющую эту склонность людей – атопиками.

Точных сведений о характере наследования атопии не получено до сих пор, но установлено, что если оба родителя страдают аллергией, то вероятность проявления ее у детей составляет около 50 %. Если атопиком является один из родителей – приблизительно 30 %. При исследованиях однояйцевых близнецов выяснилось, что атопия не определяется только генотипом – совпадения аллергических реакций на конкретные антигены у генетически идентичных людей составляют чуть больше 50 %.

Уже на ранних этапах изучения гиперчувствительности стало понятно, что существует как минимум две формы (два типа) таких реакций. Несмотря на то что они проявляются только у сенсибилизированных (т. е. уже имевших контакт

с вызывающим гиперчувствительность антигеном) организмов, время проявления симптомов после вторичного контакта с антигеном может существенно различаться. Типичная анафилаксия проявляется через несколько минут (реже часов), кожные реакции, подобные реакции на туберкулин, – через несколько часов или суток. Это послужило основанием для разделения всей гиперчувствительности на ГНТ (гиперчувствительность немедленного типа) и ГЗТ (гиперчувствительность замедленного типа).

Выяснилось также, что в эксперименте можно, перенося кровь от уже сенсибилизированного организма к интактному (не имевшему контакта с вызывающим гиперчувствительность антигеном), передать состояние сенсибилизации. Это, во-первых, доказывало причастность иммунной системы к развитию гиперчувствительности, во-вторых, позволило установить еще одну разницу в гиперчувствительности двух типов.

Оказалось, что обуславливающая ГНТ сенсибилизация переносится с сывороткой крови. Если после введения небольшого количества сыворотки крови сенсибилизированного животного интактному ввести последнему вызывающий у первого анафилаксию антиген, то интактное животное ответит на это первое введение антигена анафилаксией. Это явление назвали **пассивным переносом анафилаксии**. Подобные результаты были получены в 1921 г. в ходе проведения эксперимента на себе К. Прауснитцем и Х. Кюстнером. Сыворотку крови страдавшего аллергией на рыбные продукты Кюстнера вводили под кожу предплечья не являвшемуся атопиком Прауснитцу, а затем в те же участки кожи вводили вытяжку из тканей рыб. У несклонного к аллергии Прауснитца в течение нескольких минут развилась местная аллергическая реакция, выражавшаяся в покраснении и образовании волдырей в месте введения антигена.

В противоположность этому для переноса сенсибилизации вызывающими ГЗТ антигенами необходимо введение в интактный организм не сыворотки, а клеток крови. Причем переносить сенсибилизацию могут не все клетки, а только Т-лимфоциты. Такая передача сенсибилизации получила название **адоптивного** (от лат. *adopt* – воспринимать) **переноса гиперчувствительности**. Эти эксперименты позволили предполагать, что развитие ГЗТ опосредуется клетками, а развитие ГНТ – антителами. Однако доказать правомочность таких предположений удалось только во второй половине XX в., когда были описаны структура антител и их классы у млекопитающих.

В 1969 г. Р. Кумбс и Ф. Джелл предложили новую классификацию гиперчувствительности, разделив ее на четыре типа, которые принято обозначать римскими цифрами. Первые три типа включают реакции, развитие которых опосредовано антителами, последний (тип IV) – реакции, обусловленные Т-лимфоцитами.

Гиперчувствительность типа I представляет собой типичную анафилаксию и включает наиболее распространенные формы аллергических состояний (пищевая аллергия, крапивница, сенная лихорадка, экзема, астма). Проявляется у людей, имеющих врожденную предрасположенность (атопиков), и связана с повышенной продукцией иммуноглобулинов класса Е. Атопичные люди даже без воздействия на них аллергенов имеют несколько больший, чем у обычных людей, процент иммуноглобулинов этого класса, но при воздействии антигена количество IgE может возрастать у них в десятки или сотни раз.

Отличительная черта антител этого класса – их ярко выраженная цитофильность по отношению к базофилам и близким к ним по свойствам тучным клеткам. Они закрепляются на мембране этих клеток за счет взаимодействия с рецепторами FcεRI и FcεRII таким образом, что сохраняют способность связывать антиген. Собственно отличие сенсибилизированного аллергеном организма от интактного заключается в наличии на его базофилах и тучных клетках комплементарных этому антигену IgE. После попадания в кровь или тканевую жидкость сенсибилизированного организма аллерген взаимодействует со связанными с тучными клетками антителами (иммунологическая стадия проявления ГНТ). В том случае, когда одна молекула антигена связывается с несколькими находящимися рядом иммуноглобулинами, происходит дегрануляция тучных клеток (патохимическая стадия). Выбрасываемые тучными клетками медиаторы воспаления (прежде всего гистамин) и вызывают симптомы той или иной формы аллергии (патофизиологическая стадия).

При массированном воздействии антигена (попадании его в значительных дозах непосредственно в кровь) и высокой степени сенсибилизации (большом количестве связанных с IgE конкретной специфичности тучных клеток) возможен не локальный выброс медиаторов в ограниченном участке, а массовая дегрануляция по всему организму, что и приводит к системным аллергическим реакциям – крапивнице или анафилактическому шоку.

Подтверждениями именно такого механизма гиперчувствительности типа I являются снятие симптомов аллергии антигистаминовыми препаратами и эффект применения блокирующих антител. В последнем случае введение вместе с антигеном комплементарных ему антител класса IgG, препятствующих связыванию антигена с фиксированными на тучных клетках IgE, предотвращает развитие симптомов аллергической реакции.

Гиперчувствительность типа II также связана с антителами, но не относящимися к классу IgE. Иммунопатологические процессы этой группы сопровождаются повреждением клеток, поэтому такая гиперчувствительность называется цитотоксической, а не анафилактической, как гиперчувствительность типа I.

Суть такой гиперчувствительности заключается в следующем. Если по тем или иным причинам антитела подклассов IgG1 и IgG3 закрепляются на поверхности собственных клеток организма, то такие клетки, условно говоря, превращаются в мишень для действия ряда защитных механизмов. Во-первых, на поверхности таких клеток может активироваться комплемент и приводить их к гибели за счет возрастания внутриклеточного давления. Во-вторых, такую клетку могут разрушить нейтрофилы или эозинофилы, осуществляя так называемый антителозависимый цитолиз. Эти фагоциты имеют рецепторы для γ-цепей иммуноглобулинов и с их помощью фиксируются на клетке-мишени. Показано, что при контакте микрофагов с поверхностью объекта, который не может быть поглощен путем эндоцитоза из-за его значительных размеров, происходит активация лизосомных ферментов фагоцитов, усиливается продукция высокоактивных метаболитов кислорода и экзоцитоз содержимого гранул. Эта в целом защитная для организма реакция в данном случае становится причиной патологического состояния, поскольку мишенью является не чужеродный объект, а своя клетка. В-третьих, такие клетки-мишени могут быть поглощены макрофагами, на поверхности которых также имеются рецепторы для иммуноглобулинов G.

Наиболее часто лизису подвергаются связавшиеся с антителами клетки крови, что приводит к таким заболеваниям, как гемолитическая анемия, тромбоцитопения и агранулоцитоз. Примером развивающейся по такому механизму гемолитической патологии может быть гемолитическая болезнь новорожденных (ГБН). Это состояние возникает у резус-положительного плода, который развивается в матке резус-отрицательной женщины при второй беременности. Патология возможна в том случае, если первый ребенок также был резус-положительным и мать оказалась сенсибилизирована его D-антигенами из системы Rh. При второй беременности IgG матери проникают через плаценту в плод, закрепляются на его эритроцитах, что и приводит к их гибели по описанным выше путям.

В данном примере причиной происходящих событий являются чужие (материнские) антитела. Однако известны патологические состояния, связанные с появлением аутоантител как против клеток крови, так и против клеток других тканей (миастении, миокардиты, поражения соединительных тканей).

Довольно часто при таких аутоиммунных заболеваниях одновременно проявляют себя гиперчувствительность типа II и **гиперчувствительность типа III**.

Этот тип гиперчувствительности называют также иммунокомплексным, а связанные с ним патологии – болезнями иммунных комплексов. В этом случае антитела взаимодействуют не с антигенами клеток, а с так называемыми растворимыми антигенами, находящимися в плазме крови. Когда такие комплексы не уничтожаются фагоцитами еще во взвешенном состоянии, они могут оседать на различных тканях и запускать те же механизмы разрушения клеток, которые проявляют себя при гиперчувствительности типа II. При таких процессах прежде всего страдают стенки кровеносных сосудов, почечных канальцев и суставные поверхности.

Причиной появления таких иммунных комплексов могут быть попавшие в организм в больших количествах чужеродные белки. Например, описанная еще в начале XX в. сывороточная болезнь развивается по изложенной выше схеме. При введении больших доз гетерогенной по происхождению (например, лошадиной) сыворотки через 7–12 дней в организме появляются IgG против лошадиных белков и, связываясь с ними, формируют плохо элиминируемые иммунные комплексы. Их оседание в организме и приводит к появлению симптомов сывороточной болезни: повышению температуры, увеличению лимфоузлов, боли и отечности в области суставов, кожной сыпи.

Из аутоиммунных заболеваний такого рода в качестве примеров можно привести системную и дискоидную красные волчанки, склеродермию, дерматомиозит и др. По современным представлениям в патогенезе этих болезней сочетаются эффекты проявления нескольких типов гиперчувствительности, как зависящих от антител (по прежним представлениям – ГНТ), так и не связанных с ними (т. е. ГЗТ).

Развитие **гиперчувствительности типа IV** с давних пор связывают с деятельностью клеток лимфоидной системы, но только в настоящее время стал понятен ее механизм. Основную роль в таких реакциях играют Т-хелперы подтипа 1, которые появляются в ходе ответов на тимусзависимые антигены. Ранее эти клетки считали особой группой и, обозначая их $Т_{ГЗТ}$, не относили к группе хелперов. Сейчас доказано, что эти $CD4^+$-клетки являются результатом активации $Т_H0$ антигенпредставляющими клетками в лимфоузлах. Фактически сенсибилизация организма

при ГЗТ заключается в формировании в нем клонов таких T_H1. Именно они при повторных попаданиях этого же антигена перемещаются в места его локализации и, выделяя цитокины, активируют местные макрофаги, одновременно привлекая сюда новые, которые также активируются. Активированные макрофаги и уничтожают измененные чужеродным антигеном клетки, т. е. выступают в качестве эффекторов защитного ответа. Таким образом, $T_{ГЗТ}$ действительно являются хелперами, регуляторами гиперчувствительности замедленного типа, но помощь они оказывают не В-лимфоцитам, как T_H2, а макрофагам.

В большинстве случаев развивающиеся по такому механизму иммунные ответы на чужеродные антигены не приводят к серьезным повреждениям собственных органов и тканей, в силу чего их трудно отнести к гиперчувствительности. Лишь при некоторых заболеваниях эта защитная реакция может действительно становиться причиной патологии, в частности при лепре или туберкулезе. Считается, что часть повреждений кожи или легких при этих болезнях возникает как результат уничтожения макрофагами пораженных возбудителем клеток.

Еще одним вариантом повреждающего действия ГЗТ при действии чужеродных антигенов являются кожные дерматиты, возникающие при длительном воздействии низкомолекулярных веществ (антибиотиков, динитрофенола, парафенилендиамина и др.).

При ответе по такой схеме на собственные измененные антигены (аутоантигены) гиперчувствительность замедленного типа – явный повреждающий фактор, и в этом случае ее следует относить к патологическим, а не защитным проявлениям.

Заканчивая рассмотрение индуцибельных защитных реакций организма, следует подчеркнуть, что вся деятельность иммунной системы направлена на удаление из внутренней среды организма чужеродных молекул. Даже если речь идет о состоящих из множества молекул возбудителях инфекционных болезней – бактериях, грибах, вирусах, сумевших преодолеть барьеры конститутивной защиты, – борьба с ними во внутренней среде ведется именно на молекулярном уровне. Иммунокомпетентные клетки реагируют не на целостную клетку или вирусную частицу, а на их отдельные молекулы (антигены).

3.7. ОБЩИЕ СВОЙСТВА АНТИГЕНОВ

Понятие «антиген» происходит от широко используемых в современных языках древнегреческих слов (*анти* – противоположный и *генез* – рождающий). Кто и когда применил это слово для обозначения агентов, вызывающих ответную реакцию иммунной системы, история умалчивает. Вероятно, авторы термина имели в виду то, что при проникновении в организм болезнетворного начала (например, патогенных бактерий) в нем развивается (рождается) нечто, действующее противоположным болезнетворному началу образом, поскольку результатом такой реакции является предотвращение болезни в дальнейшем. То есть антиген – это что-либо, вызывающее рождение себе противоположного.

В ранний период формирования иммунологии под антигеном однозначно понимали организмы или вещества, имеющие отношение к инфекционным за-

болеваниям. В результате открытия таких явлений, как продукция специфичных к веществам растительного происхождения антител, гиперчувствительность и различие людей по группам крови, трактовка этого термина расширилась. В настоящее время термин «антиген» используют в нескольких имеющих общую основу значениях.

Современная трактовка такова: **антиген** – это агент, способный вызвать реакцию иммунной системы и специфично взаимодействовать (связываться) с продуктами этой реакции.

Приводимые в различных учебниках варианты определения понятия «антиген» могут в целом отражать суть, но иметь определенные недостатки. Например, вариант «антиген – это вещество, способное вызвать образование антител и взаимодействовать с ними» не охватывает те антигены, которые могут вызвать ответ иммунной системы, не приводящий к образованию антител. Кроме того, не всегда под антигеном имеют в виду именно конкретное вещество: под терминами «корпускулярный антиген» или «сложный антиген» в медицинской микробиологии понимают бактериальные клетки или вирусные частицы, состоящие из множества различных веществ.

В то же время в современной биохимии, цитологии, молекулярной биологии, да и собственно в иммунологии довольно часто употребляют понятие «антиген» для обозначения конкретных молекул или даже отдельных белковых цепей более сложной молекулы, хотя эти вещества не имеют прямого отношения к инфекционным болезням и в норме (без экспериментального введения в организм) никогда не вызывают иммунных ответов. Например, при характеристике клеток часто пишут об отличительных поверхностных маркерах или антигенах, подразумевая под этим конкретные, только для этих клеток характерные белки. Такое использование термина базируется на том, что в экспериментальной работе при идентификации этих белков и несущих их клеток применяются поли- или моноклональные антитела.

В настоящее время, благодаря открытию механизмов развития иммунных ответов, стало понятно, что антигенами являются практически любые вещества, молекулы которых имеют достаточную молекулярную массу в сочетании с определенной пространственной структурой. Фактически, чтобы признать какое-либо вещество антигеном, необходимо подтвердить наличие у него трех основных свойств**: иммуногенности**, **антигенности** и **специфичности**. Поскольку каждый конкретный организм иммунотолерантен по отношению к собственным антигенам, т. е. в норме (без патологии) не отвечает на свои обладающие тремя выше указанными свойствами молекулы, приходится добавлять к основным свойствам антигенов четвертое – **чужеродность**.

С учетом этого под **иммуногенностью** следует понимать способность вызвать иммунный ответ при введении во внутреннюю среду другого организма, обладающего не имеющей дефектов иммунной системой. **Антигенность** – это способность химически связываться с продуктами вызванного именно этим веществом иммунного ответа. **Специфичность** как свойство фактически вытекает из двух предыдущих – каждый антиген вызывает свой иммунный ответ, и это подтверждается тем, что взаимодействия с продуктами вызванного другим антигеном иммунного ответа, как правило, не наблюдается. Оговорка «как правило» в последнем определе-

нии приведена не случайно. Так называемые перекрестные реакции между антигенами и продуктами различных иммунных ответов все-таки возможны, но в тех случаях, когда антиген поливалентен и у него имеются антигенные детерминанты, совпадающие с таковыми других антигенов. Понятия «валентность антигена» и «антигенная детерминанта» будут рассмотрены в этом разделе далее.

Вещества, обладающие всеми четырьмя свойствами, принято называть **полными антигенами**. Необходимость введения этого понятия появилась в 30-е гг. XX в., когда было обнаружено, что некоторые вещества обладают антигенностью, но лишены иммуногенности. Возникает вполне резонный вопрос: как можно выявить антигенность, если невозможно (из-за отсутствия иммуногенности) получить продукты иммунного ответа к данному веществу? Оказывается, что ряд низкомолекулярных органических веществ (например, производных фенола или бензола) при введении в организм в чистом виде не вызывают продукцию антител, но смеси таких веществ с молекулами белка иммунный ответ вызывают. Анализ антител, образовавшихся в ходе такого иммунного ответа, показывает, что они разделяются по специфичности на две группы: одни из них реагируют только с белком, другие – только с низкомолекулярным веществом. Такие вещества получили название **неполных антигенов** или **гаптенов**, а используемый в смеси полипептид – **белка-носителя**. Термин «гаптен» был выбран не случайно – *гаптo* по-гречески означает «прикрепляю», а при выяснении этого феномена было установлено, что в использованной для иммунизации смеси молекулы с низкой молекулярной массой закреплялись на гораздо более крупных молекулах белка.

Из этих экспериментов были сделаны важнейшие и далеко идущие выводы. Во-первых, стало понятно, что иммунная система узнает не весь антиген сразу и целиком, а отдельные его фрагменты. Во-вторых, антитела взаимодействуют не со всей молекулой антигена и не с любым его участком, а со строго конкретным. В-третьих, для выработки иммунного ответа и для взаимодействия антигена с антителом важна пространственная структура молекулы антигена. В-четвертых, для индукции иммунного ответа действительно важна молекулярная масса (размер) молекулы антигена.

Осознание вышесказанного существенно изменило направленность и содержание проводимых для выяснения механизмов работы иммунной системы экспериментов и тем самым значительно ускорило открытие структуры антител, а в дальнейшем и роли отдельных клеток в развитии иммунных ответов. Кроме того, проявил себя бурный прогресс в изучении обладающих антигенными свойствами веществ, что и позволило к середине XX в. сформировать и поныне используемое представление об антигенах.

Согласно этим представлениям обладающая антигенными свойствами молекула должна иметь поверхностные, доступные для взаимодействия с антителами или рецепторами иммунокомпетентных клеток участки – **антигенные детерминанты**. Их наружная поверхность **(эпитоп)** способна обеспечивать слабые химические взаимодействия с соответствующим участком антитела или рецептора клетки – **эпитоп**. Количество антигенных детерминант принято называть **валентностью антигена**, а сами антигены в зависимости от этого свойства разделять на **моно-**, **поли-** и **мультивалентные**. Различие между поливалентными и мультивалентными антигенами базируется на том, что антигенные детерминанты одной молекулы мо-

гут быть разными (поливалентность) или одна и та же антигенная детерминанта может повторяться несколько раз, как это характерно для полимеров регулярного строения (мультивалентность).

Важно понимать, что антигенные детерминанты должны постоянно сохранять свою пространственную структуру, т. е. быть достаточно стабильными в условиях внутренней среды иммунизируемого организма и среды, обеспечивающей взаимодействие с антителами. В связи с этим становится понятно, что антигенные свойства в наибольшей мере зависимы от химической структуры вещества.

Если сравнивать между собой основные классы природных органических веществ, то липиды обладают наименее выраженной иммуногенностью и антигенностью. Это непосредственно вытекает из их химического строения. Жиры и воски имеют простую и не жесткую в пространственном отношении структуру, стероиды более сложны по пространственной конфигурации, но все простые липиды не имеют достаточной для полных антигенов молекулярной массы. Получить специфичные к стероидам или фосфолипидам антитела можно, как правило, при использовании так называемых комплексных антигенов, в которых липиды являются гаптенами, закрепленными на белках-носителях.

Низкомолекулярные углеводы неиммуногенны по такой же причине, но даже при значительной массе полимерных углеводов их антигенные свойства выражены очень слабо. Причина этого кроется в регулярном строении большинства таких полимеров, из-за чего их пространственная структура слишком проста. Примерами могут служить декстраны (продукты частичного гидролиза крахмала): декстран со средней молекулярной массой 75 000 абсолютно неантигенен и неиммуногенен, а иммуногенность его начинает проявляться при массе фрагментов около 600 000.

Подтверждением роли именно пространственной структуры молекул являются липополисахариды. Даже при относительно небольшой молекулярной массе они характеризуются ярко выраженными антигенными свойствами, что наглядно проявляется при изучении антигенных свойств бактерий, у которых такие вещества входят в состав капсул или клеточных стенок. При объединении изначально неиммуногенных и неантигенных липидов и полисахаридов возникает молекула более сложной пространственной конфигурации, в результате чего у нее проявляются типичные антигенные характеристики.

Имеющие самую большую массу полимерные нуклеиновые кислоты (например, ДНК) также не являются антигенами. Поначалу это кажется странным, потому что именно по последовательности нуклеотидов в ДНК все организмы (за исключением однояйцевых близнецов) и отличаются друг от друга. Но достаточно вспомнить пространственную организацию молекулы ДНК, и все становится понятным: хотя азотистые основания нуклеотидов имеют жесткую хорошо выраженную конфигурацию, они обращены в двойной спирали друг к другу и фактически скрыты внутри молекулы, а наружная поверхность ДНК не имеет выраженных антигенных детерминант. Считается также, что иммуногенность молекул ДНК и РНК резко снижается системами быстрого ферментативного расщепления нуклеиновых кислот в цитоплазме клеток.

Белки, будучи сложными гетерополимерами со сложной пространственной структурой, обладают наиболее хорошо выраженными антигенными характеристиками. Именно для них была установлена минимальная молекулярная масса,

обеспечивающая иммуногенность, – 5000. Именно они имеют максимально выраженную антигенную валентность, которая возрастает с увеличением молекулярных масс. Например, у яичного альбумина (молекулярная масса 44 000) валентность равна 5, у тиреоглобулина (650 000) – 40, у гемоцианина (6 500 000) – 231. Именно при изучении белковых антигенов были получены многочисленные сведения о структуре антигенных детерминант, продемонстрированы особенности конкретных аминокислотных остатков в зависимости от их собственного строения и положения в полипептидной цепи.

Учитывая значимость белковых молекул для жизни практически любых живых существ, их многообразие, существующее в природе с начальных этапов развития жизни, можно полагать, что иммунные системы высших животных постоянно эволюционировали и совершенствовались прежде всего под воздействием белковых антигенов. Поэтому именно для их распознавания и удаления из организма иммунная система наиболее приспособлена.

Исходя из многообразия природных белков, которые почти все являются антигенами, построить какую-либо общую всеохватывающую классификацию антигенов вряд ли возможно. Как правило, все известные варианты разделения антигенов на группы были продиктованы конкретными интересами их создателей и применяются в зависимости от стоящей перед исследователями задачи.

Так, можно классифицировать антигены по их отношению к организму, в котором они вызывают иммунный ответ. При таком подходе принято выделять:

1) **аутоантигены** – собственные антигены организма, на которые по тем или иным причинам отреагировала иммунная система. Как правило, такая реакция приводит к иммунопатологическим состояниям;

2) **изоантигены** – антигены генетически идентичных организмов;

3) **гомоантигены (аллоантигены)** – антигены разных особей одного и того же вида;

4) **гетероантигены (ксеноантигены)** – антигены особей любого другого вида;

5) **комплексные антигены** – результат объединения молекул различного происхождения.

По структурной организации антигенов их принято делить на две группы: так называемые **растворимые антигены** и **корпускулярные (партикулированные) антигены**. В первую группу входят все антигены, представленные собственно молекулами, причем любой сложности. Во вторую – состоящие из множества различных молекул иммуногенные агенты (фрагменты клеток или вирусов, неразрушенные вирусные частицы или клетки микроорганизмов, клетки других высших организмов). Естественно, что при попадании корпускулярных антигенов в организм в нем развивается несколько иммунных ответов на конкретные составляющие такой антиген молекулы, но во многих случаях исследователей не интересует, сколько и каких антител образовалось по отношению к каждому растворимому антигену из состава этого корпускулярного. Важно то, что совокупность таких ответов обеспечивает конечный результат – удаление из организма чужеродного агента, например болезнетворных бактерий.

В микробиологии появился и используется еще один термин – **«сложные антигены»**, близкий по смыслу термину «корпускулярные антигены». Так принято называть бактерии или вирусные частицы, но в этом случае само слово подчеркивает,

что речь идет не об одном антигене, а об их совокупности. В частности, для описания антигенных свойств бактерий как сложных антигенов приходится применять **антигенные формулы** – символические отображения сочетаний наиболее важных для идентификации штаммов антигенов. Выявляемые с помощью антител отличия бактерий разных видов и штаммов могут быть связаны с компонентами капсул, клеточных стенок или жгутиков. **Капсульные антигены** в микробиологии принято обозначать латинской буквой K, антигены клеточных стенок (так называемые **соматические антигены**) – буквой O, **жгутиковые** – буквой H. В формуле указывается, какой именно антиген из каждой группы имеется у бактерий данного штамма, символ группы отделяется от следующего двоеточием, например O111 : K58 : H2. Фактически антигенная формула является характеристикой внутривидового варианта, определяемого с помощью специфических сывороток, поэтому такие варианты называют **сероварами** (от лат. *serum* – сыворотка). На равных с этим наименованием могут использоваться термины **«серогруппа»** и **«серотип»**. Если для конкретного вида бактерий установлено существование нескольких серогрупп (сероваров, серотипов), они нумеруются, а в специальной литературе приводятся антигенные формулы и другие уже изученные характеристики этих бактерий. Такой подход существенно упрощает идентификацию бактерий, выделяемых, например, из организмов болеющих людей. Достаточно провести реакции агглютинации (они будут описаны в разделе «Применение антител») с определенными сыворотками, чтобы получить сведения об особенностях выделенного штамма. Такой прием называется **серотипированием** и широко применяется в медицинской микробиологии.

Возможно классифицировать антигены по эффекту, который они оказывают на иммунизируемый организм. В частности, агенты, вызывающие после первичного попадания в организм отсутствие реакции иммунной системы на последующие контакты организма с ними (толерантность), называют **толерогенами**. Агенты с противоположным действием, т. е. вызывающие повышенную реактивность организма на вторичные попадания, чаще всего именуют **аллергенами**.

В случае необходимости подчеркнуть характер развивающегося в организме ответа на антиген применяют термины **«тимусзависимые антигены»** и **«тимуснезависимые антигены»**, указывая на участие или неучастие в иммунном ответе Т-лимфоцитов.

Применительно к используемым в медицинской практике пересадкам органов и тканей появился термин **«трансплантационные антигены»**. В настоящее время, когда причины и механизмы отторжения пересаженных тканей частично выяснены, под ним понимают располагающиеся на поверхности клеток белки главного комплекса гистосовместимости (MHC). Наличие таких антигенов позволяет отличать один организм от другого (за исключением однояйцевых близнецов) даже в пределах одной семьи, т. е. они определяют **индивидуальную антигенную специфичность**.

В современной биологии и медицине широкое распространение получил термин **«дифференцировочные антигены»**, или **«CD-антигены»** (от англ. **C**luster of **D**ifferentiation). Так называют поверхностные молекулы клеток, по которым с помощью соответствующих антител можно отличать клетки определенной группы или же клетки одной и той же группы, находящиеся на разных стадиях развития или активации. Больше всего сведений о таких антигенах накоплено для клеток крови, преимущественно лейкоцитов. Количество уже известных CD-антигенов

исчисляется несколькими сотнями, и этот список постоянно пополняется. Информацию о структуре и функциях таких антигенов можно найти в приложениях к большинству солидных учебников по иммунологии, но следует помнить, что более полной она будет в изданиях последних лет.

В современной биологии и медицине широкое применение находит также понятие антигенной специфичности. Наиболее часто употребляемыми **типами (формами) антигенной специфичности** являются:

1) **видовая специфичность** – имеется в виду наличие антигенов, характерных для всех особей вида и не характерных для организмов других видов;

2) **гетероспецифичность** – наличие у организмов некоторых антигенов или антигенных детерминант, которые совпадают с таковыми других видов. Выделяют несколько групп антигенов, определяющих такую специфичность, исходя из возможных причин их образования. Часть таких антигенов характерна для близкородственных видов, и их наличие является следствием происхождения этих видов от общих предков. Известно также, что у некоторых паразитов имеются антигены, близкие к антигенам их хозяев. Например, у стафилококков и стрептококков есть антигены, частично совпадающие с антигенами сарколеммы сердечной мышцы человека; у некоторых вариантов вируса гриппа – антигены эритроцитов людей с группой крови А. Формирование такого сходства также объясняют с позиций эволюционного развития видов, но в данном случае это результат совместной эволюции паразитов и их хозяев. Такие антигены иногда называют антигенами мимикрии. Третья группа определяющих гетероспецифичность антигенов могла, как считают, образоваться в результате случайных совпадений конформационной структуры молекул, поскольку никаких логичных объяснений их наличия у далеко отстоящих в эволюционном отношении видов пока не имеется;

3) **групповая специфичность** – различия по антигенам групп особей внутри вида, например разделение людей по антигенам эритроцитов на так называемые группы крови;

4) **типоспецифичность** – понятие, практически совпадающее с групповой специфичностью, но применяемое для видов микроорганизмов;

5) **функциональная специфичность** – сходство по антигенным детерминантам молекул, выполняющих одинаковую функцию у разных организмов. Следует помнить, что, как правило, такие молекулы имеют не только сходные детерминанты, но и те, по которым проявляет себя видовая или групповая специфичность, благодаря чему и удается отличать, например, ферменты с одинаковой субстратной специфичностью, образованные в организмах животных разных видов;

6) **стадиоспецифичность** – понятие, относимое к эмбриогенезу: речь идет о молекулах, появляющихся только на определенной стадии эмбрионального развития и отсутствующих на других стадиях онтогенеза. Выявление таких антигенов позволяет с высокой точностью определить стадию развития, особенно тогда, когда морфологическая и анатомическая дифференциация стадий затруднена или невозможна;

7) **патологическая специфичность** – наличие антигенов, не характерных для организма в норме и появляющихся только при патологии. Поиск таких антигенов – важнейшая задача современной медицины, поскольку их обнаружение открывает новые возможности диагностики ряда болезней (например, злокачественных изменений) и контроля за состоянием пациентов при терапии;

8) **гаптеноспецифичность** – свойства комплексных антигенов, определяемые конкретным гаптеном. Имеет значение при развитии иммунных ответов на низкомолекулярные вещества, в частности на антибиотики или анилиновые красители, на которые у людей определенных профессий может возникать аллергия.

Для выявления антигенной специфичности любого из типов применяются соответствующие суспензии антител или иммуноглобулинов.

3.8. ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ, ФУНКЦИИ И КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИТЕЛ

Представление об антителах и вызывающих их продукцию антигенах начало формироваться в конце XIX в. Основополагающими стали проведенные в 1890 г. исследования Э. фон Беринга и Ш. Китасато, которые доказали наличие в плазме крови млекопитающих особых веществ, способных нейтрализовать действие токсинов бактерий. Такие вещества отсутствовали в крови изначально и появлялись в организме как ответ на действие токсина. Дальнейшие эксперименты показали, что подобный ответ могут вызывать различные вводимые в кровь агенты, причем появляющиеся в крови вещества обладают специфичностью, т. е. взаимодействуют только с агентом, вызвавшим ответ. Стало понятно, что предложенный Берингом и Китасато термин «антитоксины» слишком узок, и его заменили на термин «антитела». Так сформировалось представление об антителах как о веществах, обеспечивающих защиту от действия чужеродного агента, и антигенах как чужеродных агентах, вызывающих образование антител.

Однако о химической природе антител стало известно только к середине XX в. В 1937 г. А. Тизелиусу и Э. Кабату с применением метода электрофореза удалось установить принадлежность антител к гамма-глобулиновой фракции плазмы крови, что и привело к появлению термина «иммуноглобулины». Детально структуру иммуноглобулинов изучили в конце 1950-х – середине 1960-х гг. в лабораториях Р. Портера и Д. Эдельмана. В эти же годы в цитологических исследованиях было показано, что данные молекулы секретируются в плазму В-клетками крови. Это позволило сформулировать нынешнее представление об **антителах (иммуноглобулинах)** как о продуцируемых В-лимфоцитами гликопротеинах гамма-глобулиновой фракции плазмы крови высших животных и человека, способных специфически взаимодействовать с вызвавшим их продукцию антигеном.

Функциональная молекула иммуноглобулина представляет собой белок в четвертичной структуре, образованный четырьмя полипептидными цепями (рис. 42). Две из них принято называть легкими и обозначать буквой L (от англ. light – легкий), две другие – тяжелыми, или Н-цепями (от англ. heavy – тяжелый). Легкие цепи имеют массу около 25 кДа, и количество аминокислотных остатков в них колеблется в пределах от 210 до 220. Тяжелые цепи как минимум в два раза тяжелее легких, и протяженность их (в зависимости от класса) – от 440 до 550 аминокислотных остатков.

Все цепи имеют доменную структуру. Протяженность одного домена в среднем около 110 аминокислотных остатков, приблизительно 60 из них образуют скрепленную ковалентными S–S-связями глобулярную часть домена. В легких цепях

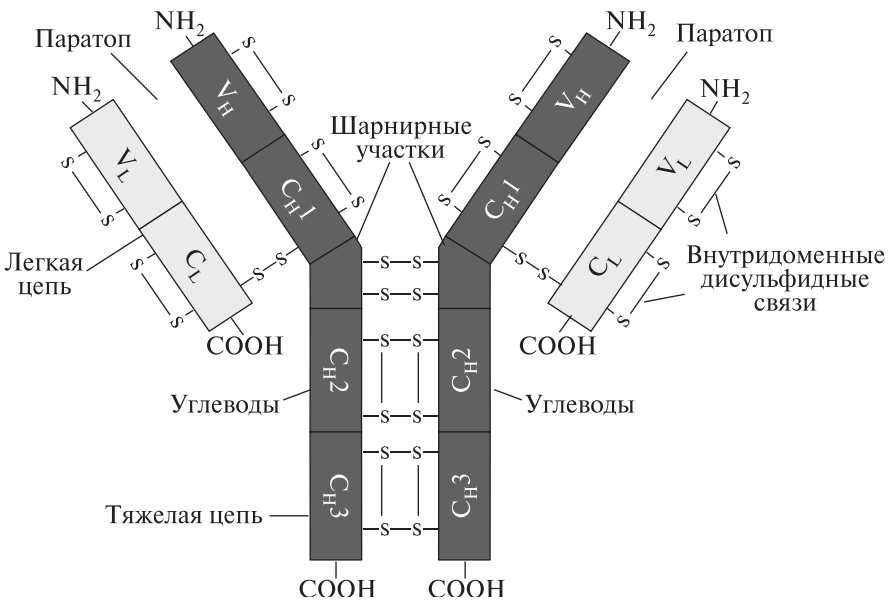


Рис. 42. Схема строения молекулы иммуноглобулина (по 2013-KUBY Immunology)

таких доменов всегда 2, в тяжелых – 4 или 5. Домены принято нумеровать начиная от NH_2-концов полипептидной цепи. И в легких, и в тяжелых цепях первый домен обозначается латинской буквой V (от англ. variable – вариабельный), последующие – латинской буквой C (от англ. constant – константный). Для обозначения принадлежности домена к определенной цепи и положения домена в ней используется правый нижний подстрочный индекс. Например, вариабельный домен легкой цепи обозначается как V_L, а второй константный домен тяжелой цепи – как C_H2.

На константных доменах и легких, и тяжелых цепей могут присутствовать углеводные компоненты. Количество, химический состав и локализация этих олигосахаридов варьируют в зависимости от класса или подкласса иммуноглобулинов.

Порядок расположения субъединиц в четвертичной структуре следующий: две одинаковые H-цепи ориентированы в молекуле так, что их COOH-концы сближены, и цепи закручены относительно друг друга участками, включающими домены C_H2, C_H3 и, если таковой имеется, C_H4 (рис. 43).

Между доменами двух цепей образуется не только множество характерных для четвертичной структуры слабых химических связей, но и несколько ковалентных S–S-связей, что и обеспечивает жесткую фиксацию этих участков субъединиц относительно друг друга. Количество S–S-связей и их положение варьируют в зависимости от класса и подкласса иммуноглобулинов, но большинство из них располагается в районе вторых константных доменов.

В каждой из H-цепей между доменами C_H1 и C_H2 имеется богатый остатками пролина так называемый шарнирный участок, обеспечивающий подвижность состоящих из доменов V и C_H1 частей субъединиц относительно остальной части молекулы. Именно к этим подвижным частям присоединены идентичные друг другу легкие цепи, NH_2-концы которых тесно сближены с NH_2-концами тяжелых цепей.

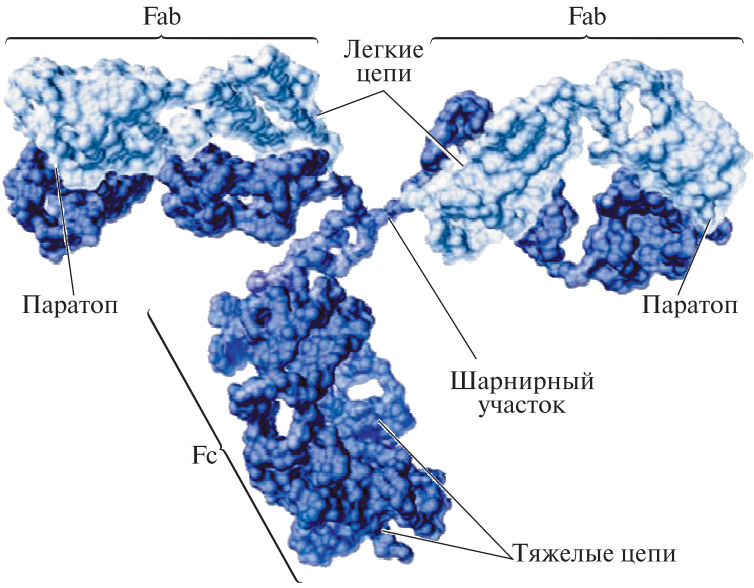


Рис. 43. Трехмерная структура молекулы IgG (по 2013-KUBY Immunology)

Легкая цепь жестко фиксирована относительно тяжелой множеством слабых химических взаимодействий между вариабельными и константными доменами и, как правило, одной ковалентной связью между доменами C_H1 и C_L. Таким образом подвижными относительно друг друга и остальной части иммуноглобулина оказываются два участка четвертичной структуры, включающие легкие субъединицы и домены V и C_H1 тяжелых субъединиц. Такое строение молекулы обеспечивает наилучшие условия для выполнения антителами их главной функции – связывания с антигеном.

Решающий вклад в понимание того, как структура иммуноглобулина соответствует его функциям, внесли работы сотрудников лабораторий Р. Портера и Д. Эдельмана. Проведенные в 50–60-х гг. XX в. опыты по фрагментации молекул иммуноглобулинов показали, что под воздействием фермента папаина образуются три фрагмента (рис. 44).

Два из них оказались идентичными между собой и способными связывать антиген, третий отличался от двух первых и с антигеном не взаимодействовал. Исходя из этого, первый удвоенный участок молекулы получил обозначение Fab (от англ. **a**ntigen **b**inding – связывающий антиген), а второй – Fc (от англ. **c**rystallisable – способный к кристаллизации, потому что он первым выпадал в осадок при осаждении продуктов протеолиза из раствора). Обработка иммуноглобулинов другой протеазой – пепсином – приводила к формированию одного крупного фрагмента и множества мелких. В этом случае только крупный фрагмент связывал антиген, причем в два раза большем количестве, чем полученные при действии папаина антигенсвязывающие фрагменты.

Кроме того, при обработке целых молекул и фрагментов меркаптоэтанолом и другими разрывающими S–S-связи агентами выяснилось, что антигенсвязыва-

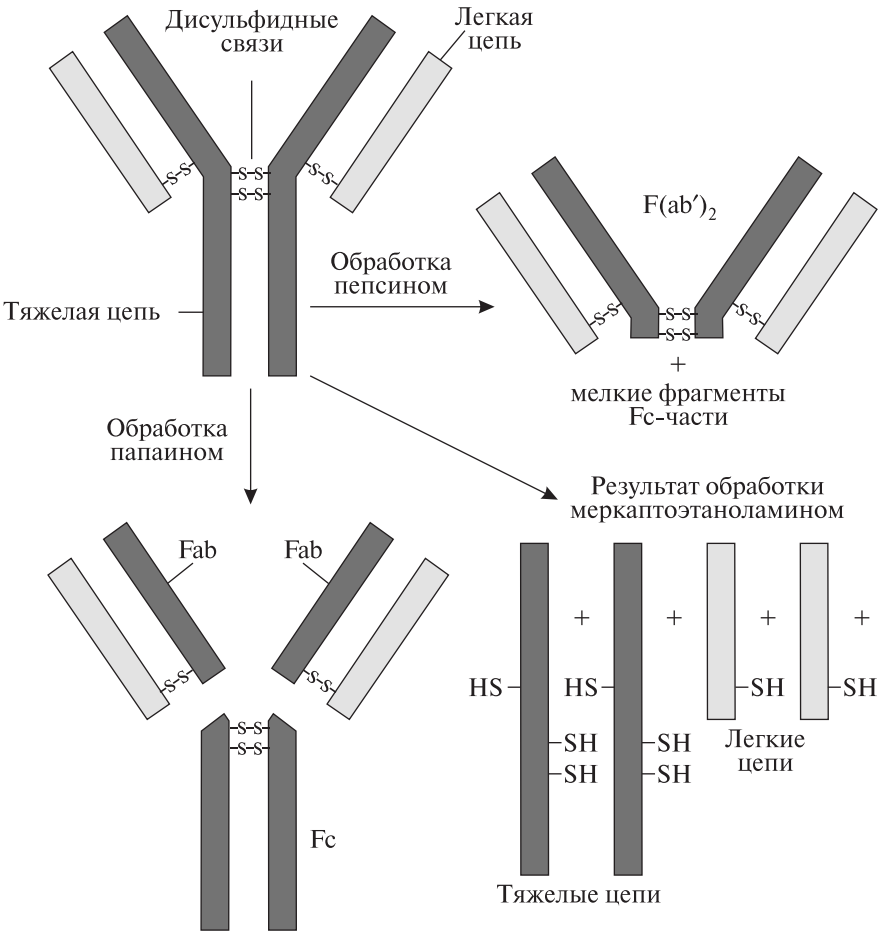


Рис. 44. Схема экспериментов по определению функций различных частей иммуноглобулина (по 2013-KUBY Immunology)

ющие фрагменты всегда содержат легкие цепи и часть тяжелых, а остальная часть молекулы сформирована только участками тяжелых цепей. Было также установлено, что ни легкие, ни тяжелые цепи в отдельности антиген связывать не могли. Из этого следовало, что антигенсвязывающий участок в части Fab формируется с обязательным участием двух цепей. Выяснению того, какие именно участки цепей важны для взаимодействия с антигеном, помогло сравнение аминокислотного состава иммуноглобулинов, различающихся по специфичности связывания с антигеном. Оказалось, что различия имеют место в первых от NH_2-конца доменах и легких, и тяжелых цепей, вследствие чего они и получили (как уже указывалось выше) название вариабельных. Это и позволило сформировать представление о **паратопе** – участке молекулы иммуноглобулина, который вступает в непосредственное химическое взаимодействие с поверхностью антигенной детерминанты – эпитопом.

Паратоп возникает в результате сближения вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей при формировании четвертичной структуры иммуноглобулина (рис. 45).

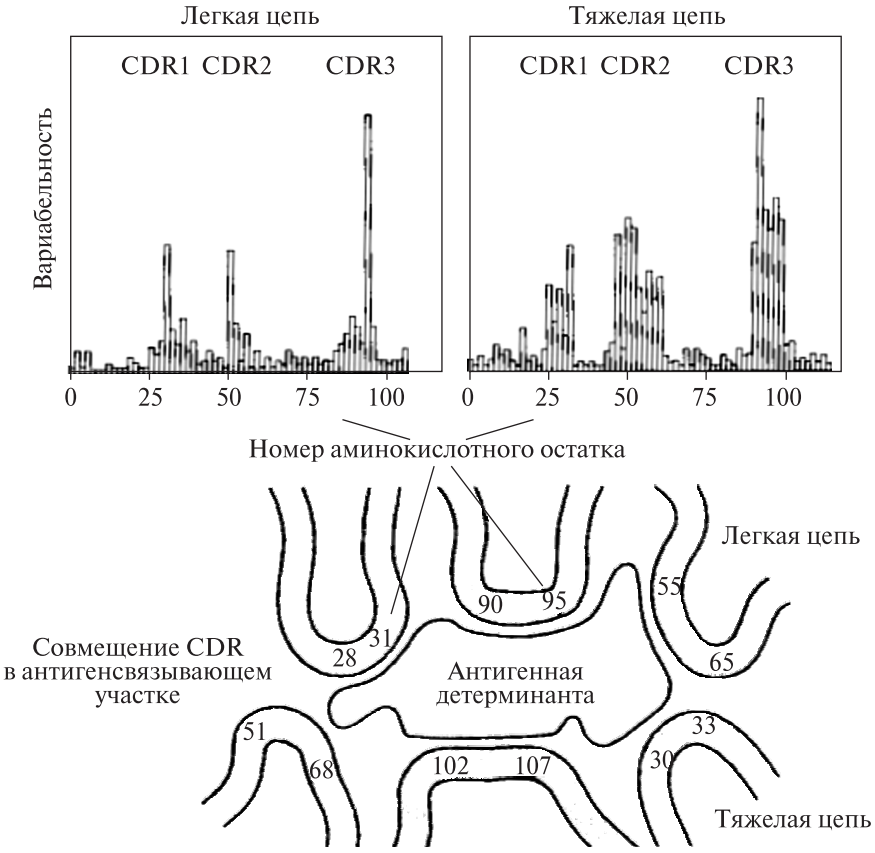


Рис. 45. Схема формирования антигенсвязывающего участка иммуноглобулина (по D. M. Weir, J. Stewart, 1997). Пояснения приводятся в основном тексте

Фактически между плотно соединенными субъединицами остается небольшая по размерам ниша, форма которой зеркально соответствует той или иной антигенной детерминанте. В создании внутренней поверхности этой ниши принимают участие по три участка вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей. Именно в этих участках наблюдается больше всего различий в аминокислотном составе антител, выработанных в ответ на действие разных антигенов, вследствие чего они и получили название гипервариабельных. Поскольку от аминокислотной последовательности гипервариабельных участков зависит комплементарное связывание антигена и антитела, эти участки часто называют CDR (от англ. **c**omplementarity-**d**etermining **r**egions – определяющие комплементарность области).

В каждой из цепей эти участки разобщены, между ними находятся фрагменты цепей с постоянным аминокислотным составом, которые называются каркасными участками. Однако при формировании третичной структуры каждой субъединицы и затем при объединении их в четвертичную структуру все шесть гипервариабельных участков сближаются и становятся стенками углубления между субъединицами.

Экспериментально показано, что достаточно одной аминокислотной замены в пределах любой из гипервариабельных областей, чтобы изменить специфичность связывания антитела с антигеном. Из этого делается вывод, что фактически взаимодействие антиген – антитело сводится к пространственному совмещению выступа на молекуле антигена (антигенной детерминанты) и впадины на молекуле антитела (антигенсвязывающего участка). Только при совпадении пространственных конфигураций ниши и выступа и возможно образование слабых химических связей между паратопом и эпитопом, обеспечивающих обратимое связывание антигена с иммуноглобулином.

Таким образом, выяснилось, что для взаимодействия антитела с антигеном нужны лишь два небольших участка иммуноглобулина. Естественно, возникали вопросы о роли остальных частей этой сложной молекулы. Постепенно и они были решены (рис. 46).

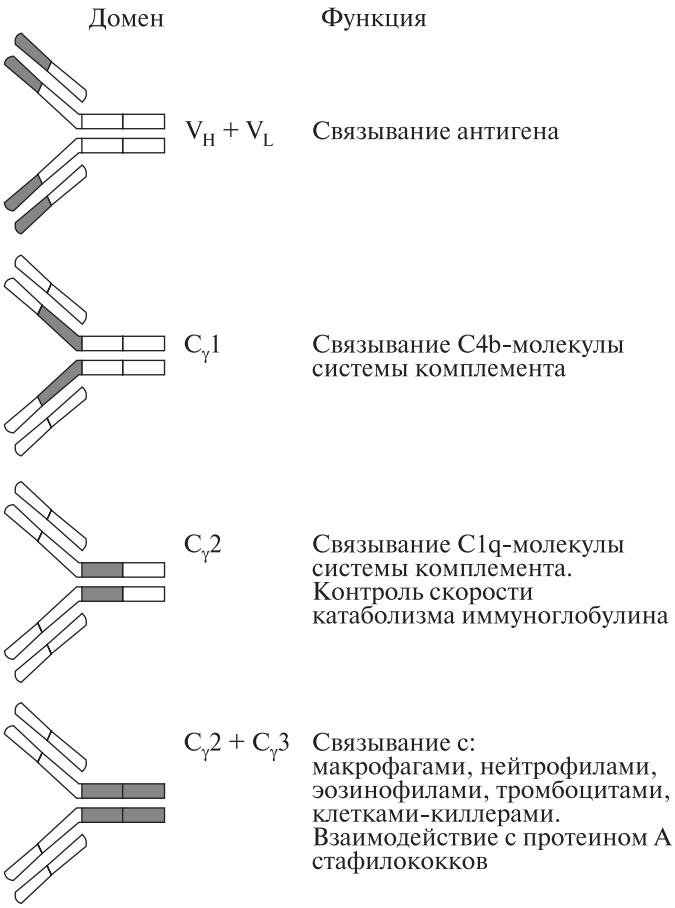


Рис. 46. Функции доменов IgG
(по D. M. Weir, J. Stewart, 1997)

Так, известно, что специфичность уже сформированного антитела к антигену не меняется даже после осаждения антител из раствора ионами солей или орга-

ническими растворителями. Исходя из этого, можно полагать, что взаиморасположение легких и тяжелых субъединиц иммуноглобулина является максимально стабильным, вероятно, вследствие структуры не только вариабельных, но и константных доменов. Фактически роль доменов C_H1 и C_L и заключается в поддержании антигенсвязывающего участка и его паратопа в неизменном состоянии. Кроме того, для домена C_H1 иммуноглобулинов IgG показана способность связываться с белком C4b из системы комплемента.

Существенно, что два несущих паратопы фрагмента молекулы могут занимать в пространстве практически любое положение относительно ее Fc-части. Это обеспечивается шарнирными участками тяжелых цепей. Считается, что подвижность Fab является одним из условий, важных для пространственного совмещения антигенных детерминант и антигенсвязывающих участков антител.

Следующий за шарнирным участком второй константный домен у иммуноглобулинов всех классов играет роль в определении времени существования антител в плазме крови и тканевой жидкости. Показано, что катаболизм антител связан расщеплением этих молекул протеазами именно в районе домена C_H2 и что на скорость катаболизма влияет состояние расположенных здесь углеводных компонентов. Предполагается, что и находящиеся в других доменах боковые олигосахаридные цепи могут иметь отношение к катаболизму, хотя функция углеводов в молекулах иммуноглобулинов еще не выяснена полностью.

Важнейшей функцией C_H2-домена IgG является его способность связывать белок C1q из системы комплемента и тем самым запускать классический путь ее активации. Установлено, что участок связывания C1q образован боковыми цепями остатка глутамина в положении 318 и двух остатков лизина в положениях 320 и 322. Расположение этого участка в данной части молекулы, как думают, не случайно. Предполагается, что у свободно двигающегося в плазме крови или тканевой жидкости IgG вследствие постоянного перемещения в пространстве его Fab-частей сайт связывания C1q недоступен для взаимодействий. Когда же иммуноглобулин связывается с антигенами на поверхности чужеродной клетки, движение Fab ограничивается, и C1q имеет возможность начать активацию. Тем самым комплемент не может запускаться свободными, не связанными с антигенами антителами, постоянно присутствующими в значительном количестве в крови.

Подобный механизм, вероятно, реализуется и при запуске активации системы комплемента иммуноглобулинами класса M, у которых сайт связывания с белком C1q расположен на третьем константном домене тяжелой цепи и представлен остатками гистидина-430, аспарагина-432 и пролина-436. Этот участок также становится доступным для взаимодействий только после связывания нескольких Fab-частей IgM и приобретения им особой, так называемой «крабовидной», конфигурации, что происходит именно на поверхности чужеродной клетки и не может осуществляться у не связанного с антигенами иммуноглобулина M.

Домены C_H2 и C_H3 антител класса IgG определяют еще одну важнейшую функцию – взаимодействие с рецепторами на поверхности лейкоцитов и клеток стенок располагающихся в плаценте кровеносных сосудов. Именно благодаря этому осуществляется наиболее эффективный иммунный фагоцитоз и формируется пассивная форма естественного приобретенного иммунитета у новорожденных. У иммуноглобулинов класса E за связывание с рецепторами тучных клеток и ба-

зофилов также отвечают участки тяжелых цепей, локализованные в третьем и втором константных доменах.

Изучение химической структуры молекул антител позволило установить не только изложенные выше общие принципы их строения, но и их разнообразие. У млекопитающих выявлено пять классов иммуноглобулинов, часть из которых разделяется на подклассы (табл. 13).

Таблица 13

Характеристика иммуноглобулинов млекопитающих

Свойство	Класс иммуноглобулинов				
	IgA	IgD	IgE	IgG	IgM
Тип Н-цепи	α	δ	ε	γ	μ
Количество С-доменов в Н-цепи	3	3	4	3	4
Форма существования вне клетки-продуцента	Мономер или димер	Мономер	Мономер	Мономер	Пентамер
Молекулярная масса, кДа	170 или 350	180	190	150	900
Граммов в 1 л крови	1–5	0,03–0,04	$2 \cdot 10^{-5}$ – $2 \cdot 10^{-4}$	6–19	0,5–2,0
Процент от общего количества Ig	15	< 1	< 1	80	5
Активация комплемента	–	–	–	++	++++
Способность проходить через плаценту	–	–	–	+	–
Способность связываться с фагоцитами	–	–	–	+	–
Способность связываться с тучными клетками	–	–	+	–	–

Принадлежность к классу или подклассу определяется структурой тяжелых цепей, которые принято обозначать буквами греческого алфавита, соответствующими латинским буквам в наименовании класса. В случае разделения класса на подклассы букве, обозначающей подтип тяжелой цепи, придана соответствующая подклассу цифра. Например, в состав иммуноглобулина подкласса IgG_3 входят тяжелые цепи γ_3.

Принадлежащие к различным типам или подтипам тяжелые цепи отличаются друг от друга по первичной структуре (количеством и расположением аминокислотных остатков и, соответственно, молекулярной массой), по третичной структуре (количеством и пространственной конфигурацией доменов, количеством внутридоменных S–S-связей, количеством и составом углеводных компонентов, протяженностью шарнирного участка) и по их участию в образовании четвертичной структуры (количеством межцепьевых S–S-связей).

В отличие от тяжелых легкие цепи не столь разнообразны, их существует всего два типа, которые принято обозначать к (каппа) и λ (лямбда). Они входят в состав иммуноглобулина независимо от класса, но никогда в одной молекуле иммуно-

глобулина не могут присутствовать легкие цепи обоих типов. Цепи типа κ в целом преобладают количественно. Например, у человека это преобладание выражается соотношением 3 : 2, однако у других видов млекопитающих эти соотношения могут быть иными.

Несмотря на различия в аминокислотных последовательностях цепей κ и λ, каких-либо функциональных различий между ними не выявлено. В то же время тип тяжелой цепи фактически определяет биологические особенности антител различных классов и подклассов.

Иммуноглобулины класса IgG составляют в норме 70–80 % от общего количества антител и являются основными обеспечивающими гуморальный иммунитет молекулами. Во время развития первичных иммунных ответов они уже к 10-м суткам почти полностью заменяют появляющиеся первыми IgM, а вторичный иммунный ответ почти сразу начинается с их продукции. Их наименьшая среди антител молекулярная масса (около 150 кДа) и наиболее выраженная способность преодолевать барьеры между кровью и тканями делают их практически вездесущими. В частности, только IgG способны проникать через плаценту в организм развивающегося плода и обеспечивать тем самым естественный пассивный иммунитет. Наличие на поверхности фагоцитирующих клеток большого количества рецепторов к тяжелым цепям типа γ определяет значение иммуноглобулинов этого класса как опсонинов. Помимо усиления фагоцитоза IgG способствуют проявлению еще одного конститутивного механизма защиты – обеспечивают активацию системы комплемента.

В настоящее время установлено, что у большинства видов млекопитающих имеет место дифференциация IgG на подклассы. У человека их выявлено четыре (рис. 47), среди которых преобладает IgG_1 – 65 % от всех иммуноглобулинов этого класса, IgG_2 составляет 23 %, IgG_3 – 8, IgG_4 – 4 %.

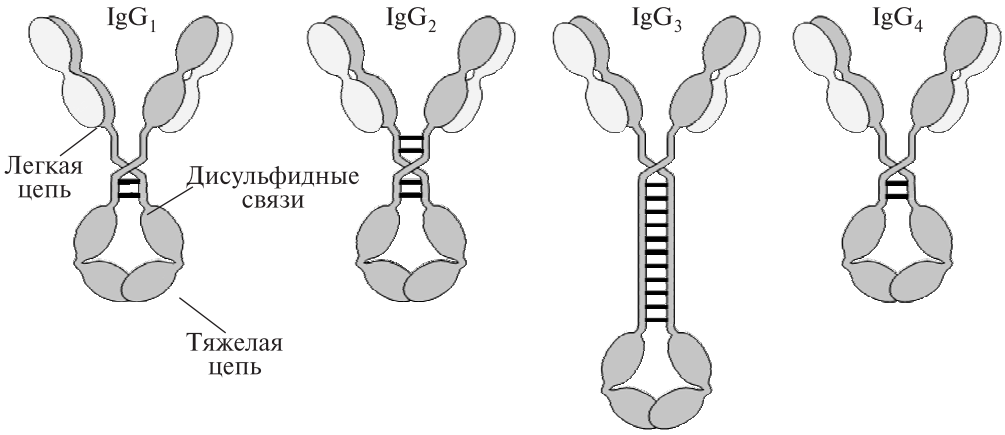


Рис. 47. Структурные различия подклассов IgG человека (по I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, 1989)

Основные структурные различия между молекулами подклассов незначительны и заключаются в длине шарнирных участков и количестве S–S-связей между тяжелыми цепями. Тем не менее выявлены функциональные особенности представителей каждого подкласса. В частности, IgG_2 обладает наименьшим сродством

к Fcγ-рецепторам на поверхности клеток, вследствие чего хуже остальных IgG проходит через плаценту и усиливает фагоцитоз. Наилучшими опсонинами и активаторами комплемента являются IgG_3 и IgG_1, тогда как представители подкласса IgG_4 вообще не способны активировать комплемент, но обладают сродством к рецепторам на поверхности тучных клеток и базофилов. Это свойство IgG_4 сближает их с IgE и делает причастными к развитию гиперчувствительности немедленного типа.

Второе место по численности занимают **иммуноглобулины класса А**. Их количество в плазме крови составляет от 15 до 20 % от общего количества иммуноглобулинов, но основную значимость антител этого класса связывают с их способностью попадать в секреты слизистых оболочек и экзокринных желез и именно там, фактически вне организма, обеспечивать защиту от антигенов. Исходя из этого, принято различать две формы IgA – сывороточную, обнаруживаемую в плазме крови, и секреторную, обозначаемую в сокращенном варианте как sIgA. Главное отличие sIgA от сывороточного заключается в структуре молекулы. Сывороточный IgA имеет строение, сходное с IgG, т. е. состоит из двух легких и двух тяжелых, но, естественно, α-цепей. Секреторная же форма IgA представляет собой комплекс, включающий две молекулы IgA, белковую j-цепь (от англ. joining – связующая) и так называемый секреторный компонент (рис. 48, *а*).

J-цепь имеет массу около 15 кДа и синтезируется продуцирующими IgA В-лимфоцитами, а секреторный компонент с массой 80 кДа образуется клетками эпителия и присоединяется к комплексу в процессе выведения иммуноглобулина в состав секрета. Происходит это следующим образом (рис. 48, *б*). Выделяемые В-лимфоцитом обычные IgA ковалентно (за счет дисульфидных мостиков) связываются j-цепями попарно. Димеры IgA присоединяются к рецепторам для j-цепи на поверхности эпителиальных клеток. Комплексы иммуноглобулин – рецептор поглощаются клеткой путем эндоцитоза, и образовавшиеся эндосомы транспортируются к поверхности клетки, граничащей с окружающей средой. После слияния эндосомы с наружной цитоплазматической мембраной и выведения комплекса на ее поверхность происходит протеолиз рецептора, но таким образом, чтобы часть рецептора осталась в составе комплекса, превращаясь в секреторный компонент. Экспериментально показано, что секреторный компонент защищает иммуноглобулин от дестабилизирующего воздействия и продлевает срок его действия вне организма.

Как и IgG, иммуноглобулины класса А делятся на подклассы, но в данном случае у человека их всего два. Сравнение характерных для подклассов тяжелых цепей показало, что их аминокислотные последовательности гомологичны на 95 %, но шарнирный участок в цепи α_2 на 13 аминокислот короче, чем в цепи α_1. Как оказалось, это небольшое отличие существенно сказывается на свойствах молекул – иммуноглобулины подкласса IgA_2 гораздо более устойчивы к действию протеолитических ферментов, в том числе и бактериальных протеаз.

Тем не менее в состав секретов попадают димеры, состоящие из антител любого из подклассов, т. е. какого-либо механизма, контролирующего выведение в секрет более устойчивых форм, по-видимому, не существует.

Еще более сложными по структуре являются **иммуноглобулины класса М**. В мономерной форме, включающей только две тяжелые и две легкие цепи, IgM обнаруживаются только на поверхности В-лимфоцитов, где они играют роль BCR. В плазме же крови они всегда присутствуют в виде пентамеров (рис. 49).

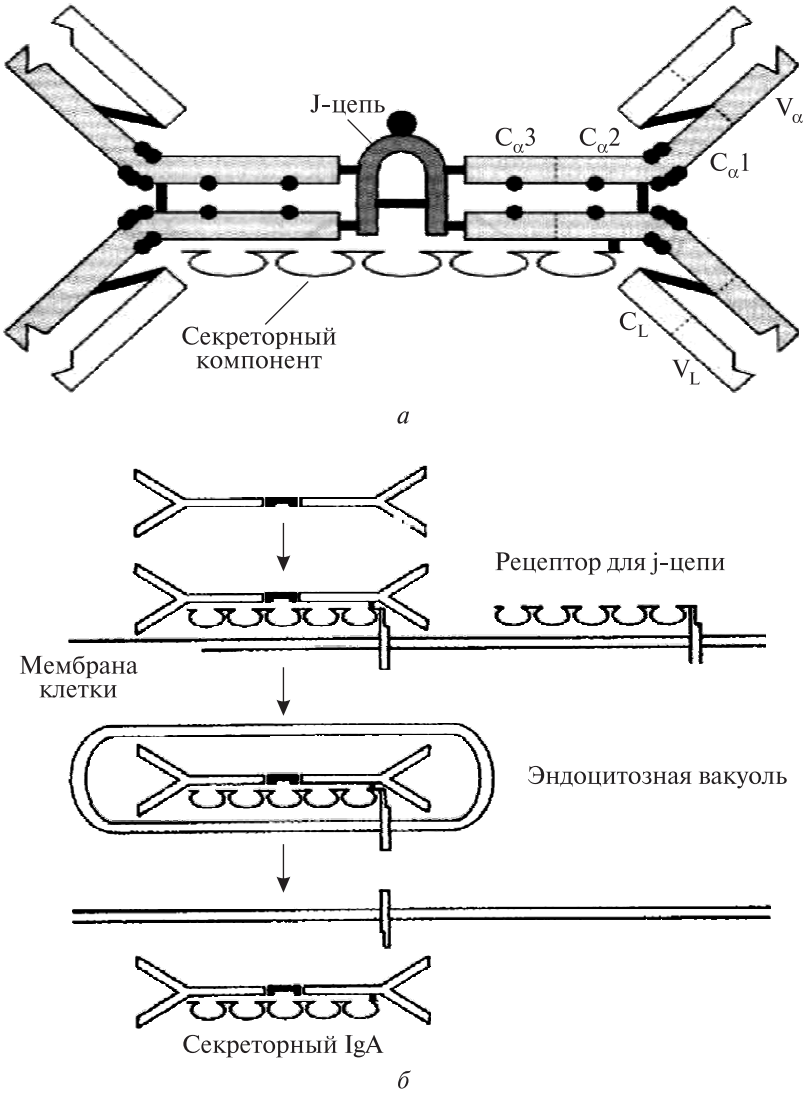


Рис. 48. Структура секреторного IgA (*а*);
схема его секреции (*б*) (по D. M. Weir, J. Stewart, 1997)

Формирование пентамеров обеспечивается такой же j-цепью, как и в секреторном IgA, которая ковалентно связывает два мономера. Но затем к уже имеющемуся димеру присоединяются еще три молекулы IgM, в результате чего образуется звездообразная структура, где каждый мономер ковалентно связан с двумя соседними. Одна S–S-связь формируется между C_H3-доменами μ-цепей, вторая – между доменами C_H4 (μ-цепи длиннее γ- и α-цепей на один константный домен). Такое расположение жестких ковалентных связей не случайно. Дело в том, что в тяжелых цепях μ отсутствует соответствующая шарнирным участкам аминокислотная последовательность. В то же время экспериментально продемонстрирована и электронно-микроскопически подтверждена способность пентамеров IgM

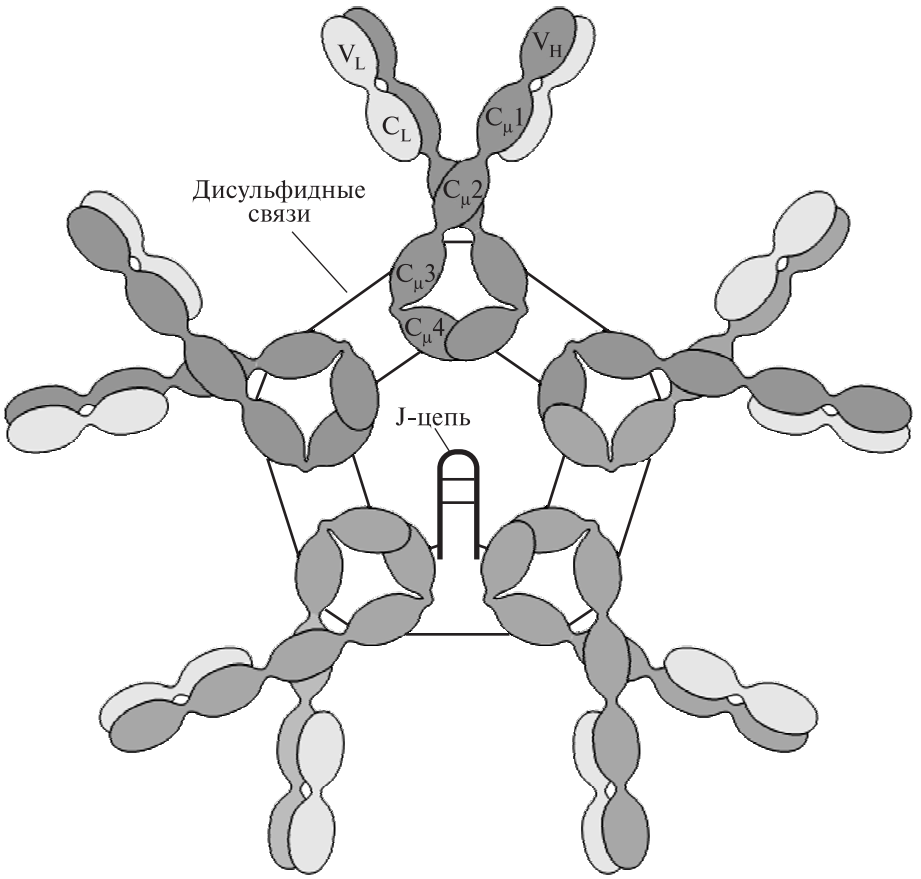


Рис. 49. Структура пентамерной формы IgM
(по I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, 1989)

перемещать свои десять Fab-частей в пространстве. Считается, что второй константный домен μ-цепей, в аминокислотной последовательности которого достаточно много остатков пролина, функционально заменяет шарнирный участок, но именно тогда, когда нижележащие участки цепи жестко фиксированы. Благодаря изгибанию цепей в районе C_H2-домена пентамер может взаимодействовать более чем пятью антигенсвязывающими участками с антигенными детерминантами, расположенными в одной плоскости, принимая при этом «крабовидную» конфигурацию. Как правило, такую форму IgM приобретает, закрепляясь на поверхности чужеродной клетки, и это способствует открыванию сразу нескольких C1q-связывающих сайтов на поверхности C_H3-доменов. Вот почему один пентамер IgM может запустить активацию системы комплемента по классическому пути, в то время как для активации за счет мономерных IgG их на клетке должно закрепиться гораздо больше.

Имея десять антигенсвязывающих участков, IgM могут более прочно, чем мономерные антитела, связывать антигены с несколькими повторяющимися антигенными детерминантами. Связывая одновременно несколько антигенов, такие антитела способствуют более быстрому их уничтожению фагоцитами. Кроме

того, благодаря наличию j-цепи иммуноглобулины М, как и IgA, могут попадать в секреты слизистых оболочек и связывать антигены вне организма. Тем не менее у высших млекопитающих IgM образуются лишь в небольшом количестве (1–5 % от числа всех иммуноглобулинов) и только на первых этапах первичных иммунных ответов. Следовательно, несмотря на все вышеописанные положительные черты, у антител этого класса имеется недостаток.

По современным представлениям таким недостатком является низкая мобильность: имея большую (около 900 кДа) молекулярную массу и сложную пространственную конфигурацию, пентамеры хуже, чем мономеры, преодолевают барьеры между кровью и тканями и в целом медленнее диффундируют. Вероятно, поэтому в ходе эволюции отобрались такие формы животных, у которых благодаря их большей приспособленности к условиям обитания закрепилась способность образовывать большое количество антител, пусть и менее прочно связывающих антиген, но более мобильных и специализированных. Можно полагать, что в отличие от других позвоночных, имеющих в качестве доминирующих антител IgM, млекопитающие получили лучшую защиту, перейдя на преимущественную продукцию IgG для связывания чужеродных антигенов во внутренней среде и IgA для борьбы с антигенами на поверхности слизистых оболочек.

Особое место среди иммуноглобулинов млекопитающих занимают **иммуноглобулины класса Е** (рис. 50). Их главной отличительной чертой является высоко выраженная цитофильность по отношению к базофилам и тучным клеткам. Закрепляясь на поверхности этих клеток, иммуноглобулины Е, по всей вероятности, обеспечивают более быстрый запуск воспалительных реакций при вторичных попаданиях антигена. Однако их способность стимулировать базофилы и тучные клетки на выброс медиаторов воспаления может при определенных ситуациях служить причиной развития нежелательного для человека иммунного ответа на некоторые антигены – одной из форм гиперчувствительности немедленного типа. Именно поэтому в первые годы после открытия IgE их называли реагинами (т. е. обеспечивающими повышенный уровень реагирования на антиген), или антителами аллергии.

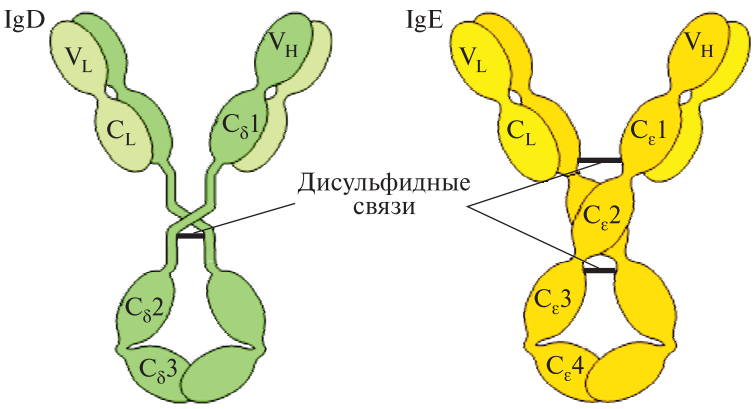


Рис. 50. Схема строения IgD и IgE
(по I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, 1989)

Антител этого класса образуется меньше всего – около 0,003 % от общего количества продуцируемых иммуноглобулинов. Причины переключения небольшой части плазматических клеток на продукцию антител этого класса до сих пор остаются невыясненными. Неясно также, почему при иммунном ответе на некоторые антигены у конкретных людей их количество повышается, что и определяет роль таких антигенов для этих людей как аллергенов.

Еще одной характерной чертой IgE является наличие у них четырех константных доменов в тяжелых цепях и отсутствие в них шарнирного участка. Считается, что, как и в тяжелых цепях типа μ, в ε-цепях роль шарнирного участка выполняет весь домен C_H2.

Пятый класс антител млекопитающих составляют **иммуноглобулины D** (см. рис. 50). Их продуцируется в организме около 1 %, но в плазме крови они присутствуют в следовых количествах. Большинство исследователей считает, что в плазму антитела этого класса попадают вследствие разрушения В-лимфоцитов, на поверхности которых они играют роль В-клеточных рецепторов. Никаких других функций IgD не установлено, и, скорее всего, их действительно нет, так как анализ свойств выделенных из мембран В-лимфоцитов иммуноглобулинов IgD показал их высокую чувствительность к протеазам сыворотки крови.

Для быстрого определения принадлежности иммуноглобулинов к конкретному классу или подклассу в экспериментальной работе применяют специфические антитела. Такой подход базируется на том, что иммуноглобулины имеют, как и прочие белки, хорошо выраженные **антигенные детерминанты**. Условно их делят на:

- **видовые**, позволяющие отличать антитела одного и того же класса, синтезированные в организмах разных видов;
- **изотипические**, отличающие антитела разных классов, синтезированные в одном организме;
- **аллотипические**, обеспечивающие отличие антител одного и того же класса, синтезированных разными особями одного вида;
- **идиотипические**, расположенные на вариабельных доменах легких и тяжелых цепей и позволяющие отличать антитела, обладающие различной специфичностью, т. е. выработанные в ответ на действие разных антигенов или даже разных антигенных детерминант одного поливалентного антигена.

Количество и расположение иммуноглобулиновых антигенных дерминант разных групп неодинаково, что отражено на рис. 51.

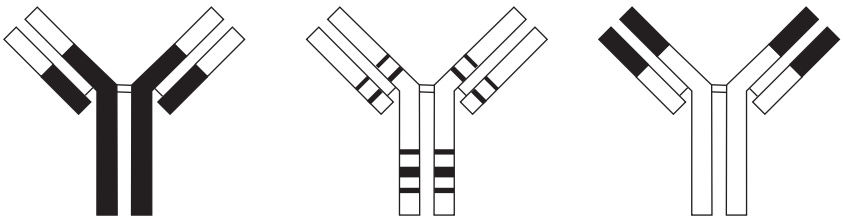


Рис. 51. Расположение антигенных детерминант на молекуле иммуноглобулина, определяющих: *а* – изотип; *б* – аллотип; *в* – идиотип (по D. M. Weir, J. Stewart, 1997)

Помимо классификации иммуноглобулинов по классам их, как и антигены, принято разделять в зависимости от происхождения:

- на **аутоантитела** – антитела собственного организма;
- **изоантитела** – антитела генетически идентичных особей;
- **гомоантитела (аллоантитела)** – антитела другой особи своего же вида;
- **гетероантитела (ксеноантитела)** – антитела особи другого вида.

По причине, вызвавшей их образование, антитела принято делить на иммунные, являющиеся результатом выраженного ответа на чужеродный антиген, и нормальные (естественные). **Нормальные антитела** образуются в организме без воздействия антигена, с которым они могут специфически взаимодействовать. По всей вероятности, их образование наследственно детерминировано, но каких-либо данных о механизмах такой детерминации пока не имеется. Нормальные антитела условно делят на две группы. К первой относятся гемагглютинины α и β человека, определяющие несовместимость крови людей разных групп. Ко второй – противобактериальные нормальные антитела, антитела против некоторых антигенов животного или растительного происхождения. В отношении антител этой группы не удалось установить определяющие их образование гены и характер наследования.

Особо рассматриваются так называемые **неполные антитела**. В небольших количествах их обнаруживают практически у всех людей, но причины и механизм их возникновения пока не выяснены. Главное отличие таких антител от обычных заключается в том, что они реагируют с антигеном только одним из двух антигенсвязывающих участков. Хотя причины их появления еще не определены, в медицине накоплен эмпирический опыт, указывающий на повышение продукции неполных антител при некоторых патологиях. В частности, их количество повышено у матерей и новорожденных при резус-конфликтах, у людей, страдающих аллергией того или иного вида, при некоторых инфекционных заболеваниях (дизентерии, брюшном тифе, бруцеллёзе). Эмпирически также было установлено, что неполные антитела могут неспецифически оседать на поверхности эритроцитов, поэтому их присутствие и количество определяют в реакциях Кумбса (постановка этих тестов описана в разделе «Реакции гемагглютинации»). В ряде случаев результаты тестов на выявление неполных антител позволяют поставить или уточнить диагноз.

Подводя итог описанию структуры антител, необходимо еще раз подчеркнуть ее соответствие выполняемым функциям. Наиболее важными **функциями иммуноглобулинов в защитных реакциях организма** являются:

1) ограничение подвижности антигенов (диффузионной или активной) во внутренней среде и на поверхности слизистых оболочек;

2) нейтрализация их токсических или патогенных свойств;

3) опсонизация чужеродных частиц и усиление за счет этого эффективности фагоцитоза;

4) активация системы комплемента;

5) обеспечение антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ). Такая форма цитотоксичности характерна для NK-клеток (натуральных киллеров) и реализуется следующим образом. Если на поверхности соб-

ственных, но пораженных чужеродным антигеном (например, вирусом) клеток закрепляются IgG, то натуральные киллеры присоединяются к поверхности таких клеток за счет специфических рецепторов FcγRIII (CD16) и осуществляют воздействие, приводящее клетку к гибели.

3.8.1. Генетические основы многообразия антител

Выполнение антителами всех вышеописанных функций базируется на максимально выраженной специфичности взаимодействия с антигенными детерминантами. Фактически продуцируемые каждым конкретным клоном плазматических клеток иммуноглобулины имеют свой, только для них характерный антигенсвязывающий участок, или паратоп. Выяснить причины такого поразительного разнообразия антител удалось только в последней четверти XX в.

Как и при образовании Т-клеточных рецепторов, решающую роль в формировании разнообразия аминокислотных последовательностей вариабельных доменов иммуноглобулинов играет изначальная множественность сегментов ДНК, объединяющихся в пригодный для транскрипции ген.

В настоящее время расположение и нуклеотидные последовательности таких сегментов у человека и мыши детально охарактеризованы и уточнены. Оказалось, что их количество не так велико, как представлялось ранее, и что часть таких фрагментов ДНК несут сочетания нуклеотидов, не позволяющие им нормально траскрибироваться. Количество этих так называемых псевдогенов в некоторых локусах даже превышает количество функциональных генов. Например, у человека при наличии максимально 44 активных V_H-сегментов выявлено 79 псевдогенов этой группы. Тем не менее количества функциональных генов в кластерах V, D и J вполне хватает для создания основы первичного распознающего репертуара (табл. 14).

Таблица 14

Характеристика генов цепей иммуноглобулинов млекопитающих

Свойство	Гены *Homo sapiens* для цепей			Гены *Mus musculus* для цепей		
	κ	λ	тяжелых	κ	λ	тяжелых
Расположены в хромосоме	2	22	14	6	16	12
Количество генов* V	34–48	33	38–44	91	3–8	101
Количество генов* D	–	–	23	–	–	19
Количество генов* J	5	4	6	4	3	4
Количество генов* C	1	4	9	1	3	8

*Приведено только количество функциональных генов.

При созревании В-лимфоцитов под влиянием микроокружения красного костного мозга и выделяемых здесь факторов роста (прежде всего интерлейкина-7) инициируется перестройка генов в описываемых кластерах.

Процесс перестройки в целом сходен с рассмотренным в разделе «Генез и характеристика Т-лимфоцитов» процессом формирования функциональных генов

Т-клеточного рецептора (TCR) и происходит с участием тех же рекомбиназ – RAG-1 и RAG-2.

Наиболее простые события осуществляются в районах кластеров легких цепей (рис. 52, 53).

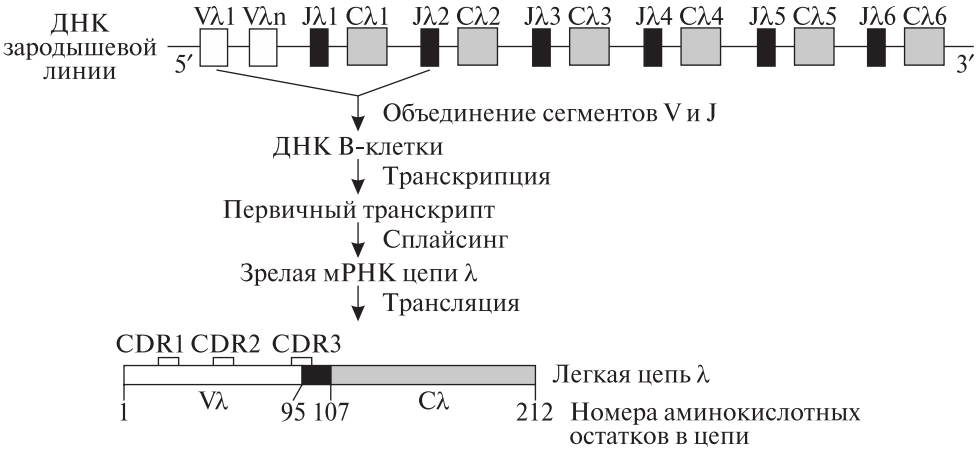


Рис. 52. Образование цепей типа λ
(по D. M. Weir, J. Stewart, 1997)

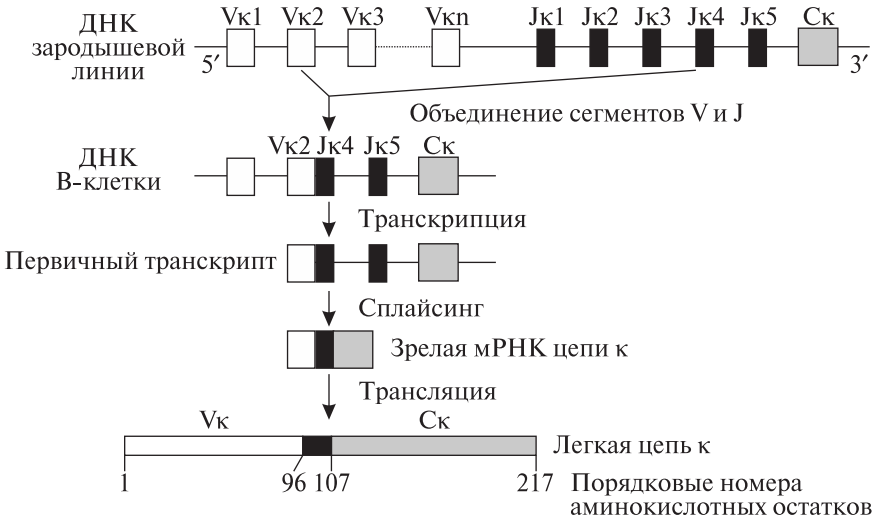


Рис. 53. Образование цепей типа κ
(по D. M. Weir, J. Stewart, 1997)

Один из случайно выбранных V-генов сближается с одним из генов J. При этом все находящиеся между ними гены удаляются из хромосомной ДНК. После этого с сайта инициации транскрипции того V-гена, который объединился с J-геном, начинается транскрипция, заканчивающаяся на терминаторе транскрипции гена С. Возникшая пре-мРНК подвергается сплайсингу, в ходе которого удаляются все последовательности, кроме соответствующих одному гену V, одному гену J

и одному гену С. После кэпирования и полиаденилирования такая мРНК транслируется в легкую цепь.

Установлено, что два из трех образующих часть паратопа гипервариабельных участка (их еще называют CDR) кодируются V-геном, а третий – J-геном.

При формировании функционального гена тяжелой цепи происходит не одна, а несколько перестроек на уровне ДНК. Сначала осуществляется объединение случайно выбранных генов D и J. При этом все находящиеся между ними сегменты ДНК удаляются. Затем осуществляется второй акт рекомбинации, приводящий к объединению комбинации DJ с одним из случайно выбранных V-генов, и снова расположенные между ними фрагменты ДНК полностью удаляются.

После этого начинается транскрипция с промотора выбранного при рекомбинации V-гена, которая заканчивается на терминаторе транскрипции, находящемся после кластера генов CμCδ (рис. 54).

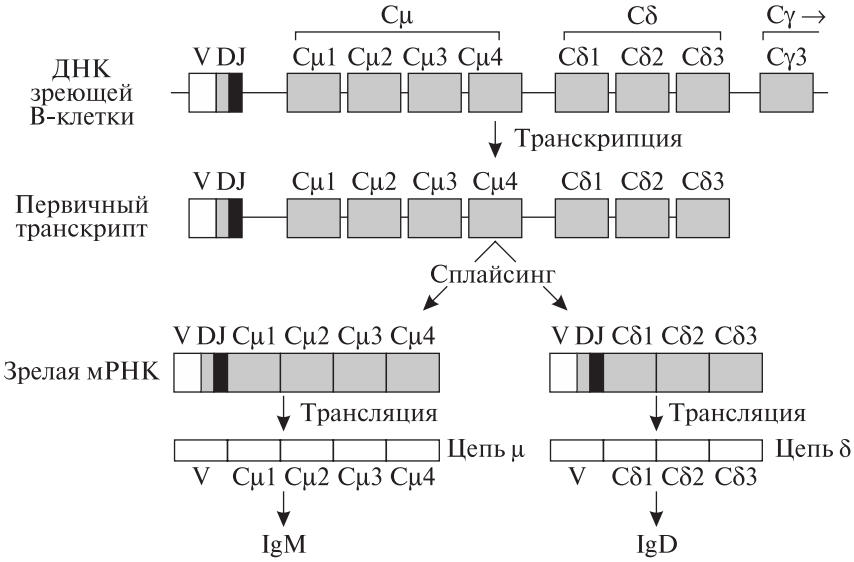


Рис. 54. Образование тяжелых цепей μ и δ (по D. M. Weir, J. Stewart, 1997)

Какая из тяжелых цепей – μ или δ – будет синтезироваться, решается в данном случае на уровне сплайсинга. Механизм выбора направления сплайсинга не известен, но результат его очевиден. В более молодых, еще не дозревших В-лимфоцитах формируются цепи типа μ, а затем и В-клеточный рецептор, представленный мембранным иммуноглобулином М. У окончательно созревших В-клеток направление сплайсинга меняется, и это выражается в замене части рецепторов на мембранный иммуноглобулин Д.

Переключение с мембранной формы иммуноглобулина на секретируемую из клетки осуществляется на уровне транскрипции (рис. 55). А вот происходящее в уже активированных Т-клетками В-лимфоцитах переключение на продукцию иммуноглобулинов других классов вновь осуществляется на уровне рекомбинации ДНК и сопровождается делециями (см. рис. 38). Например, если клетка под влиянием соответствующих интерлейкинов переключится на продукцию це-

пей Cε, она уже никогда не сможет продуцировать IgM, IgD, IgG3, IgG1, IgG2b и IgG2a. Следует подчеркнуть, что сочетание VDJ при таком переключении останется неизменным, т. е. специфичность по отношению к антигену не меняется при изменении класса антител.

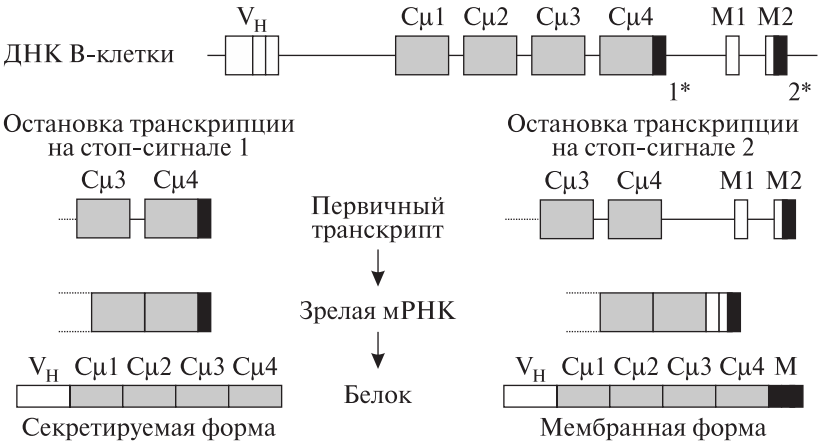


Рис. 55. Образование мембранной и секретируемой формы иммуноглобулинов (по D. M. Weir, J. Stewart, 1997)
*Стоп-сигналы с сайтами полиаденилирования
M1 и M2 – два экзона, кодирующие трансмембранную часть.
Экзон M1 удаляется при сплайсинге.

Вклад генов тяжелых цепей в формирование паратопа следующий: две CDR (два гипервариабельных участка) определяются последовательностью нуклеотидов V-гена, третья – окончанием V-гена, D-геном и J-геном.

Как и при образовании цепей Т-клеточного рецептора, в В-лимфоцитах имеет место аллельное исключение – после перестроек в одной из гомологичных хромосом гены соответствующих кластеров во второй хромосоме полностью репрессируются.

По современным представлениям помимо множественности зародышевых генов иммуноглобулинов и случайного выбора одного из генов каждой группы свой вклад в увеличение многообразия паратопов вносят: ошибки в формировании P- и N-фрагментов при рекомбинации, повышенный уровень соматического мутагенеза именно для генов иммуноглобулинов, конверсия генов и комбинирование легких и тяжелых цепей. В совокупности все эти механизмы должны давать от 10^{17} до 10^{20} различных вариантов паратопов, вот почему организм высшего млекопитающего может ответить антителообразованием практически на любой антиген.

3.8.2. Взаимодействие антигена и антитела

О том, что антитела способны связывать антиген, известно, можно сказать, со времени их открытия. Однако полная картина такого взаимодействия стала понятна только во второй половине XX в. после выяснения структуры антител и их антигенсвязывающих участков.

Как упоминалось выше, в непосредственное взаимодействие вступают не любые участки антитела и антигена, а строго определенные: антигенная детерминанта и антигенсвязывающий участок. Решающим моментом в реализации такого связывания является комплементарное совпадение пространственных конфигураций этих элементов сталкивающихся молекул, т. е. выступ на поверхности антигена (антигенная детерминанта) должен соответствовать по форме впадине (нише) между вариабельными доменами тяжелой и легкой цепей антитела. Необходимость такого пространственного соответствия диктуется тем, что связи, возникающие между образующими паратоп (поверхность ниши в антителе) и эпитоп (поверхность антигенной детерминанты) атомами, не ковалентны и формируются только на очень коротких расстояниях. Конкретно такими связями являются (в порядке возрастания необходимых для их образования расстояний между атомами): гидрофобные взаимодействия, вандерваальсовы силы, электростатические взаимодействия, водородные связи. Причем гидрофобное связывание обеспечивает около половины общей энергии (силы) удержания молекул в комплексе.

Как известно, обеспечиваемое такими связями взаимодействие обратимо, и в целом реакция антиген – антитело подчиняется законам, определяющим характер таких химических реакций. Применяя закон действующих масс, можно определять константу равновесия такой реакции по формуле $K = [AgAb]/[Ag]\cdot[Ab]$, где [AgAb] – концентрация комплексов антиген – антитело, [Ag] – концентрация несвязавшихся антигенных детерминант, [Ab] – концентрация свободных от антигена антигенсвязывающих участков. Значение рассчитанной по этой формуле константы является количественным выражением силы (прочности) связывания одного паратопа с одним эпитопом. Эту силу называют сродством, или **аффинностью (аффинитетом)**.

Учитывая, что обычное антитело имеет два антигенсвязывающих участка и антиген может иметь несколько повторяющихся антигенных детерминант, общую силу связывания всего антигена с антителом приходится выражать таким понятием, как **«авидность»**. Следует помнить, что реально аффинность антител можно определить только при использовании моновалентных антигенов, чаще всего гаптенов, поэтому для характеристики содержащих антитела суспензий или сывороток чаще применяется термин «авидность».

Авидность также называют суммарным выражением аффинности, однако необходимо учитывать, что ее значение не является арифметической суммой аффинитетов. По мере возрастания числа эффективных контактов между антигеном и антителом вероятность диссоциации комплекса антиген – антитело при разрыве связей между эпитопом и паратопом падает, поскольку для его распада необходимо одномоментное расхождение всех эпитопов и паратопов. Из-за этого при одинаковой аффинности авидность димера (например, секреторного IgA) будет превышать авидность мономера (сывороточного IgA) по отношению к четырехвалентному антигену более чем в два раза.

Анализируя взаимодействие антиген – антитело, можно отметить несколько особенностей:

1. Оно может реализоваться только в среде электролитов, поскольку часть описанных выше связей между эпитопом и паратопом возникает только в условиях,

обеспечивающих формирование несущих заряды поверхностей. Во внутренней среде организма животных такие условия реально присутствуют, но при постановке реакций антиген – антитело *in vitro* это необходимо учитывать.

2. Оптимальной концентрацией ионов солей для таких реакций является концентрация 0,85 %, а ионная сила растворов должна быть в пределах 0,5–0,1. Значительное повышение концентрации солей приводит к распаду комплексов антиген – антитело, в частности 15 % раствор NaCl используют для получения компонентов реакции в свободном состоянии.

3. Не нарушающие силу связывания значения pH попадают в интервал 6,4–8,6. При изменениях pH до значений более 9,0 или менее 5,0 происходит сдвиг реакции в сторону диссоциации комплексов, что также используется при элюции антител или антигенов.

4. Оптимальной для взаимодействия температурой является 37 °C, но образование комплексов антиген – антитело происходит и при более низких температурах достаточно эффективно. Например, ориентировочные реакции агглютинации ставят при комнатной (18–20 °C) температуре. Повышение температуры на несколько градусов (до 40 °C) не сказывается на эффективности взаимодействия, но более высокие температуры (60 °C) стимулируют распад комплексов антиген – антитело, что также можно применить для получения чистых фракций антигена или антитела. Считается, что температурный параметр реакции в большей степени зависит от антител, чем от антигенов, поскольку у млекопитающих, и в частности у человека, выявлены так называемые холодовые антитела. Они взаимодействуют с антигенами только при температурах ниже 37 °C и могут служить причиной развития гемолитической анемии, если являются аутоантителами.

5. При постановке реакций антиген – антитело *in vitro* видимые результаты реагирования проявляются не сразу после смешивания растворов реагентов, а по истечении определенного времени. В связи с этим реакцию антиген – антитело условно разделяют на фазу взаимодействия и фазу проявления. Условность такого разделения заключается в том, что собственно взаимодействие между паратопом и эпитопом при их правильном расположении друг относительно друга осуществляется мгновенно, однако до фазы проявления может проходить от нескольких минут до нескольких суток. Следует также помнить, что в зависимости от свойств и концентраций взятых в реакцию антител и антигенов проявление результатов взаимодействия может существенно различаться.

Наиболее показательными в плане визуализации являются реакции агглютинации и преципитации, при которых образуются фиксируемые невооруженным глазом агрегаты, состоящие из множества единиц антигенов и антител. Их образование и выпадение в осадок определяется прежде всего наличием в молекуле антитела как минимум двух антигенсвязывающих участков. В свою очередь участвующий в реакциях антиген должен иметь более чем одну антигенную детерминанту. Если эти два условия имеются, время и степень визуализации будут зависеть от концентраций реагентов, размеров несущих антигенные детерминанты частиц и однородности взятых в реакцию антител.

Собственно **феномен агглютинации (преципитации)** заключается в следующем. При случайных столкновениях антигенов и антител в растворе возможны ситуа-

ции, когда одна молекула антитела присоединяется одним из своих антигенсвязывающих участков к антигенной детерминанте на одной антигенной частице, а вторым – к такой же, но находящейся на другой частице. Тем самым две такие антигенные частицы оказываются связанными в агрегат. Поскольку антигены в таком агрегате поливалентны, возможны реализующиеся по аналогичной схеме взаимодействия с новыми молекулами антител, а значит, укрупнение уже существующих агрегатов и постепенное выпадение их в осадок. Характер выпадающего осадка прежде всего зависит от свойств антигенной частицы. Чем большие она имеет размеры, тем короче будет фаза взаимодействия и тем более выраженным будет осадок. Кроме того, важным является количество доступных для связывания антигенных детерминант. При наличии двух детерминант образуются агрегаты в виде цепочек или небольших колец (слабо видимый, медленно образующийся осадок). При увеличении количества детерминант возрастает вероятность образования агрегатов в виде трехмерных решеток (сеток), имеющих гораздо большие размеры. Соответственно, скорость образования и выраженность осадков увеличиваются.

Существенен для проявления результатов агглютинации и преципитации и состав участвующих в реакции антител. Если суспензия антител включает антитела различной специфичности, а антиген имеет несколько разновидностей комплементарных этим антителам антигенных детерминант, вероятность образования осадков возрастает. По этой причине так называемые поликлональные антитела, получаемые из сывороток иммунизированных конкретным поливалентным антигеном животных, являются более предпочтительными в подобных реакциях, чем обладающие только одним типом специфичности моноклональные антитела.

Кроме того, в каждой конкретной реакции проявляется влияние относительных количеств (концентраций) взаимодействующих агентов. При избытке любого из них вероятность образования агрегатов падает, поэтому кривая, графически отображающая изменение количества осадка в зависимости от концентраций антигенов или антител, имеет форму параболы. Соотношение концентраций антигенов и антител, при котором количество осадка максимально, называется **точкой эквивалентности** реакции. Минимальные и максимальные значения соотношений антиген – антитело, в пределах которых еще образуются видимые глазом осадки, определяют так называемую **зону эквивалентности**.

Все описанные выше особенности в равной мере касаются и агглютинации и преципитации, поскольку принципиальных различий между ними нет. Применение этих двух терминов сложилось исторически и сохраняется скорее как дань традициям. **Агглютинацией** принято считать осаждение антителами корпускулярных антигенов (клеток, вирусных частиц или состоящих из множества молекул их фрагментов), **преципитацией** – осаждение молекул, обладающих антигенными свойствами.

Агрегирование антигенов и антител имеет значение не только при постановке реакций *in vitro*. Наличие в молекуле иммуноглобулинов как минимум двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов явно не является случайностью. Происходящая в организме агглютинация усиливает иммобилизацию активно

двигающихся чужеродных агентов (например, бактерий) и значительно ускоряет их уничтожение путем фагоцитирования. То же можно отнести и к диффузионно двигающимся чужеродным молекулам (например, обладающим антигенными свойствами токсинам), которые, входя в состав преципитата, как правило, утрачивают вредные для организма свойства и с большей вероятностью обнаруживаются и уничтожаются фагоцитами. В обоих случаях будет иметь место наиболее эффективный иммунный фагоцитоз, при котором достаточно взаимодействия одного из вошедших в агрегат иммуноглобулинов с рецепторами фагоцитирующей клетки, чтобы все находящиеся в агрегате чужеродные агенты были уничтожены.

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ. ПРИНЦИПЫ ПОСТАНОВКИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ *IN VITRO*

4

В современной биологии и медицине иммуноглобулины – неотъемлемые участники исследований на клеточном и молекулярном уровнях. Их широкое применение базируется на высокой специфичности взаимодействия с антигенами, точнее с отдельными антигенными детерминантами. Фактически с помощью антител удается обнаруживать отличия не только клеток по их поверхностным антигенам, но и отдельных молекул друг от друга. Более того, с применением иммуноглобулинов возможно выявлять присутствие конкретных клеток или молекул в анализируемых субстанциях и получать их для изучения в чистом виде. Условно говоря, даже самые современные физические и химические методы изучения клеток и сложных органических молекул проигрывают иммунологическим методам по разрешающей способности и простоте их реализации. Отражением роли и значения иммуноглобулинов в современных научных исследованиях и биотехнологических производствах является присуждение Нобелевской премии за разработку гибридомной технологии, с помощью которой удается получать суспензии высокоспецифических антител.

До появления гибридомных технологий единственным источником антител для проведения иммунологических реакций были высшие животные. Чаще всего для этих целей используются лабораторные животные (кролики или мыши), но когда требуются значительные объемы сывороток, предпочтение отдается рогатому скоту или лошадям. Общий принцип получения антител в организме животных заключается в иммунизации их конкретным антигеном. Для этого суспензию антигена вводят во внутреннюю среду животного с помощью шприца, используя различные методы введения (внутримышечно, подкожно, внутрикожно и др.). Концентрации, растворители, вводимые дозы и время их введения подбираются с учетом особенностей иммунизируемого вида животных и с конкретной целью вызвать максимально высокую продукцию антител, специфичных к антигенным детерминантам вводимого антигена. Зная о том, что вторичный иммунный ответ дает более высокий титр антител и специфичность их будет более

высокой, антиген, как правило, вводят несколько раз на протяжении 4–5 недель. По достижении предполагаемого времени наилучшего выражения вторичного иммунного ответа отбирают небольшое количество крови животного, получают сыворотку (освобождают кровь от форменных элементов и фибриногена) и определяют количество нужных антител путем титрования сыворотки. Если титр признается удовлетворительным, животное обескровливают и получают максимально возможное количество сыворотки.

Для получения наиболее высокого титра антител антиген обычно вводят совместно с **адъювантами** – факторами различного происхождения и состава, стимулирующими деятельность иммунной системы. К настоящему времени известно, что адъювантными свойствами обладают лишенные жизнеспособности клетки различных микроорганизмов (микобактерий, нокардий, коринебактерий и др.), отдельные фракции разрушенных бактериальных клеток (чаще всего полисахариды или липополисахариды), некоторые органические (агар-агар, крахмал, пектины, желатин, лецитин, ланолин, глицерин и др.) и неорганические (минеральные масла, аммониево-кальциевые квасцы, гидроксиды алюминия или железа, фосфаты алюминия или кальция, хлорид кальция и др.) вещества природного происхождения, а также синтетические молекулы (олигонуклеотиды, полианионы и др.).

Способность выступать в качестве адъювантов для подавляющего большинства применяемых в таком качестве веществ была определена эмпирически, поскольку механизм воздействия адъювантов до сих пор обсуждается лишь предположительно. Одна из гипотез базируется на том, что многие адъюванты обладают способностью неспецифически сорбировать молекулы и одновременно являются веществами, плохо метаболизируемыми во внутренней среде организма млекопитающих (например, полисахариды растительного происхождения с большой молекулярной массой из органических адъювантов или аммониево-кальциевые квасцы из неорганических). Считается, что подобные соединения могут постепенно, в течение длительного времени освобождать введенный вместе с ними антиген. Такое действие часто называют эффектом депо, т. е. адъювант депонирует антиген, а затем многократно представляет его иммунной системе, обеспечивая тем самым последовательное развитие нескольких иммунных ответов на него. Предполагается также, что имеющие небольшую молекулярную массу и потому плохо процессируемые макрофагами антигены объединяются с макромолекулами адъюванта в комплексные антигены, вследствие чего более эффективно узнаются иммунной системой. Кроме того, для ряда обладающих адъювантными свойствами веществ экспериментально продемонстрировано активирующее и стимулирующее пролиферацию действие на макрофаги и лимфоциты.

Адъюванты принято делить на простые и сложные, исходя из того, одно это вещество или смесь нескольких веществ. В практике в зависимости от ситуаций используются многие простые и сложные адъюванты, но наиболее известными и широко применяемыми для получения иммунных сывороток являются **полный** и **неполный адъюванты Фрейнда**. Неполный вариант этого адъюванта включает липополисахариды *Mycobacterium tuberculosis*, ланолин (он же шерстяной воск – смесь жирных кислот, многоатомных спиртов и их эфиров, получаемая из шерсти овец), вазелиновое масло, эмульгаторы Твин-80 или Арцел А. Полным такой адъювант становится при добавлении культуры БЦЖ (BCG, от англ. bacillus

Calmette-Guerin – бацилла Кальметта – Герена), применяемой в качестве живого вакцинного препарата для профилактики туберкулеза. Оба варианта производятся промышленно и поставляются в лаборатории, где осуществляется иммунизация с целью получения сывороток.

Следует отметить, что неспецифическое стимулирование иммунной системы адъювантами находит применение и в профилактике инфекционных заболеваний. Многие химические вакцинные препараты производят сорбированными на гидроксиде или фосфате алюминия не только для лучшего хранения, но и для придания им способности дополнительно стимулировать иммунную систему. Считается также, что более продолжительный и эффективный искусственный активный иммунитет после применения живых или убитых вакцин в сравнении с некоторыми химическими является следствием наличия в составе первых бактериальных липополисахаридов и нуклепротеидов, обладающих адъювантными свойствами.

Полученные путем иммунизации животных суспензии антител в настоящее время называют поликлональными антителами. Действительно, зная о том, как именно представляется поливалентный антиген иммунной системе, можно предполагать, что в организме формируется множество клонов плазматических клеток. Для защиты организма от данного антигена такой ответ наиболее выгоден и эффективен, однако для применения таких антител в реакциях *in vitro* их многообразие может быть нежелательным. В частности, известно, что многие близкородственные бактерии обладают практически одинаковыми антигенами или антигенными детерминантами. Это приводит к так называемым перекрестным реакциям, когда агглютинат или преципитат образуется при смешивании поликлональных антител с антигенами (клетками или молекулами), не использовавшимися для иммунизации животного. Естественно, что при применении таких сывороток для идентификации выделенного антигена (например, конкретных болезнетворных бактерий) или обнаружения его в исследуемом материале перекрестные реакции явно нежелательны.

В связи с этим еще на заре применения сывороток для идентификации бактерий и диагностики инфекционных заболеваний был предложен до сих пор используемый метод улучшения их качества. Моноспецифические сыворотки, или, как их традиционно называют до сих пор, **антисыворотки** (*анти* в данном контексте обозначает «против конкретного антигена», например антисыворотка холерная, позволяющая отличить холерного вибриона от других бактерий), получают **путем истощения**, или **адсорбции** (рис. 56, *а*).

Для этого сыворотку смешивают с антигеном, дающим нежелательную перекрестную реакцию, в условиях, обеспечивающих взаимодействие антиген – антитело, и полученные комплексы отделяют от раствора, например, центрифугированием. Антител в сыворотке становится меньше (она истощается), но за счет адсорбции антигеном дающих нежелательную перекрестную реакцию антител специфичность сыворотки по отношению к нужному антигену нарастает. Используя по такой схеме последовательно несколько родственных антигенов, можно достичь нужного уровня специфичности сыворотки. Однако при истощении на каждом этапе происходит уменьшение общего объема сыворотки при удалении получаемых осадков, поэтому адсорбцию обычно проводят лишь несколько раз. Кроме того, такой прием не освобождает сыворотку от других, так называе-

мых балластных, антител. В связи с этим с появлением в химии колоночной аффинной хроматографии был разработан метод получения суспензий антител одинаковой специфичности из поликлональных сывороток (рис. 56, *б*).

Основой метода является обратимость реакций антиген – антитело. Хроматографическую колонку заполняют гранулами не сорбирующего белки вещества, с которым ковалентно связаны молекулы конкретного антигена. Затем через колонку пропускают раствор электролитов, обеспечивающий условия связывания антигенов и антител, и далее смесь такого раствора с сывороткой. По мере прохождения через колонку на заполняющем ее веществе будут осаждаться только специфичные по отношению к выбранному антигену антитела.

Смешивание сыворотки с суспензией клеток близкородственного микроорганизма (например, *Shigella* при получении антисыворотки для *E. coli*)

⇓

Осаждение внесенных микроорганизмов центрифугированием

⇓

Смешивание сыворотки с суспензией клеток другого близкородственного микроорганизма (например, *Salmonella*)

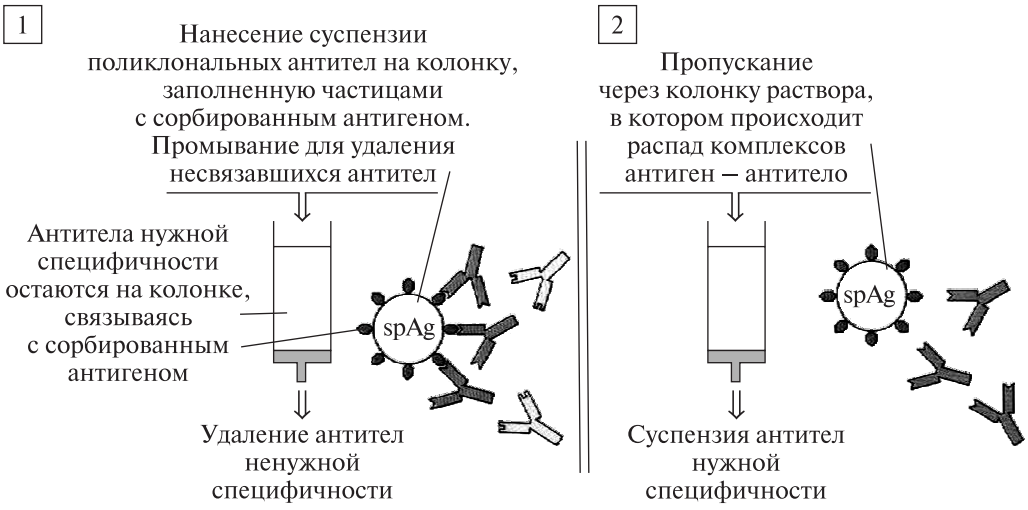
⇓

Осаждение внесенных микроорганизмов центрифугированием

⇓

И так далее, но не более 3–4 раз, поскольку с каждым этапом происходит уменьшение объема сыворотки

а



б

Рис. 56. Приемы улучшения качества поликлональных антител:
а – истощение сывороток (применяется для получения антисывороток, используемых при выявлении конкретных микроорганизмов);
б – выделение антител нужной специфичности посредством аффинной хроматографии (по D. M. Weir, J. Stewart, 1997)

После прохождения всего объема раствора, содержащего сыворотку, колонку промывают несколькими объемами исходного раствора электролитов для полного удаления всех несвязавшихся антител. Последним этапом является пропускание через колонку раствора, вызывающего диссоциацию комплексов антиген – антитело, что приводит к элюции (смыванию) нужных антител. Выходящую из колонки суспензию собирают и используют для постановки реакций.

Недостатки такого метода – небольшое количество нужных антител, получаемых из значительных объемов сыворотки, и отсутствие полной идентичности отбираемых таким методом антител. Последнее связано с тем, что при использовании поливалентного антигена в суспензии окажутся антитела, специфичные по отношению к разным антигенным детерминантам этого антигена, поскольку при иммунном ответе организма образовывались разные клоны плазматических клеток. Иначе говоря, такая суспензия, хотя и будет высокоспецифичной, останется все равно поликлональной.

Преодолеть это удалось в результате разработки **технологии создания клеток, пригодных для получения моноклональных антител**. Основой для такого подхода стало понимание того, что конкретные В-лимфоциты индивидуальны по своим клеточным рецепторам для антигена и после их активации Т-клетками они дают клон плазматических клеток, образующих антитела только одной специфичности. То есть если отобрать один из таких дающих нужные антитела В-лимфоцитов и размножать его вне организма, можно будет получать идентичные по антигенсвязывающим участкам антитела. Главной проблемой на пути воплощения такого теоретического подхода в жизнь стало отсутствие у клеток млекопитающих способности размножаться вне организма, на искусственных питательных средах. Решить эту проблему смогли Г. Кёллер и Ц. Мильштейн.

В отличие от обычных клеток млекопитающих злокачественно измененные (раковые) клетки обладают способностью продолжительное время (в специальных условиях бесконечно долго) делиться на питательных средах. Среди раковых заболеваний есть и такие, которые являются следствием злокачественного изменения клеток красного костного мозга – множественной миеломы. Один из симптомов этой болезни – накопление в крови белков глобулиновой фракции, которые представляют собой однородные по составу иммуноглобулины. Именно от таких больных были выделены злокачественно измененные способные к продукции антител В-лимфоциты, их называют «плазмоцитомы» (от плазматическая клетка), которые могут длительно размножаться в культуре. Со временем был найден способ вызывать множественную миелому красного костного мозга у лабораторных животных (в частности, белых мышей и крыс) и получены линии миеломных В-клеток различного происхождения.

Кроме того, уже существовала методика соматической гибридизации клеток животных – слияния под воздействием действующих на биологические мембраны химических веществ, например полиэтиленгликоля (сокращенно ПЭГ).

Опираясь на эти факты, Кёллер и Мильштейн поставили цель добиться объединения свойств миеломных и обычных В-клеток путем их слияния. Главной задачей при достижении цели стал подбор условий, позволяющих отобрать нужные продукты слияния, так называемые **гибридомы**. Для этого были использованы

клетки мутантных плазмоцитом, у которых отсутствовали ферменты путей биосинтеза азотистых оснований. В частности, есть мутанты, у которых не синтезируется гипоксантин-гуанидинфосфорибозилтрансфераза (сокращенно ГГФРТ) – один из ферментов пути синтеза пуриновых азотистых оснований. Такие клетки сохраняют жизнеспособность потому, что у млекопитающих помимо двух отдельных путей синтеза пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований имеется еще один общий путь синтеза пуринов и пиримидинов. Один из ферментов такого общего пути – дигидрофолатредуктаза – утрачивает свою активность при связывании с 4-аминоптероилглутаминовой кислотой (укороченное название – **аминоптерин**). Из этого следует, что на питательной среде с аминоптерином ГГФРТ-дефектные клетки делиться не могут, а при добавлении в среду гипоксантина быстро погибают, поскольку он не используется и накапливается в клетках до токсичной концентрации.

Подобным же образом ведут себя и плазмоцитомы, у которых отсутствует другой фермент – тимидинкиназа (сокращенно ТК), являющийся одним из ферментов пути синтеза пиримидинов. Значит, ТК-дефектные клетки также погибают на среде с аминоптерином и тимидином, но в данном случае из-за накапливания в клетках тимидина.

Получать мутантные линии плазмоцитом можно путем селекции исходной линии на средах с токсичными аналогами предшественников азотистых оснований. Для получения ГГФРТ-дефектных клеток используется 8-азагуанин, для получения ТК-дефектных – 5-бромдезоксиуридин.

Фактически главным достижением Кёллера и Мильштейна стало использование **содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин среды** (сокращенно **ГАТ-среды**), позволяющей отобрать нужные продукты слияния. Предложенная ими схема отбора гибридом, пригодных для получения моноклональных антител, представлена на рис. 57.

Первым этапом является иммунизация животного (например, белой мыши) тем антигеном, к которому необходимо получить моноклональные антитела. После развития иммунного ответа (что контролируется по появлению в сыворотке крови антител к выбранному антигену) из селезенки животного отбирают лимфоциты, смешивают с суспензией ГАТ-чувствительных миеломных клеток мыши, добавляют вещество, способствующее слиянию клеток (например, полиэтиленгликоль), и выдерживают необходимое для слияния время. Затем получившуюся смесь высевают на ГАТ-среду.

Поскольку слияние происходит неконтролируемо, в смеси могут содержаться: 1) неслившиеся В-лимфоциты из селезенки; 2) слившиеся друг с другом В-лимфоциты из селезенки; 3) неслившиеся миеломные ГАТ-чувствительные В-лимфоциты; 4) слившиеся друг с другом миеломные ГАТ-чувствительные В-лимфоциты; 5) гибридомы, являющиеся результатом слияния В-лимфоцитов из селезенки и миеломных ГАТ-чувствительных В-лимфоцитов. К размножению на ГАТ-среде оказываются способными только представители 5-й группы из присутствующих в смеси клеток, так как первые две группы не дадут клонов из-за неспособности обычных, не раковых, клеток длительно размножаться *in vitro*, две вторые – в силу их чувствительности к ГАТ-среде. Зато в 5-й группе могут оказаться такие объеди-

ненные клетки, потомки которых унаследуют от миеломной клетки способность постоянно делиться, а от нормального, не ракового, В-лимфоцита – нечувствительность к ГАТ-среде.



Рис. 57. Схема получения моноклональных антител (по D. M. Weir, J. Stewart, 1997). Пояснения приводятся в основном тексте

Сформировавшиеся клоны проверяют на способность продуцировать антитела и отбирают те из них, которые дают антитела к использованному для иммунизации животного антигену. Часть клеток из каждого такого клона консервируют путем замораживания при температуре жидкого азота, а сам клон подвергают расчистке. Суть расчистки заключается в разделении клона на изолированные клетки,

получении их потомства и анализе этого потомства на однородность и продукцию нужных антител. При необходимости проводят несколько последовательных расчисток получаемых дочерних клонов, причем на каждом этапе расчистки часть клеток каждого клона также консервируют, чтобы в случаях гибели клона была возможность не повторять процедуру с начала, а продолжить ее с конкретного этапа.

Полученные стабильные, не дающие расщепления клоны являются источниками гибридом, пригодных для получения абсолютно однородных по специфичности и изотипу антител, которые и называют моноклональными. Наработку нужного количества антител осуществляют либо побуждая гибридомные клетки к продукции антител в культуре, либо вводя суспензию таких гибридом в организм специально подготовленных лабораторных животных.

Если выбранный для иммунизации антиген был поливалентным, возможно получить столько клонов гибридом, сколько у данного антигена имеется антигенных детерминант. Это значит, что с использованием таких антител можно отличать и отделять друг от друга очень близкие по структуре молекулы, что невозможно при применении поликлональных антител. Преимущества моноклональных антител подтверждены более чем 30-летним опытом их применения в различных областях биологии и медицины. Благодаря использованию таких иммуноглобулинов удалось обнаружить и получить в пригодном для исследования количестве и виде множество не выявляемых другими методами веществ.

Моноклональные антитела все шире используются в масштабном промышленном производстве высокочистых препаратов для научных и медицинских целей. Осуществляемая с их помощью аффинная хроматография позволяет достигать максимально высокой степени гомогенности производимых веществ. На основе моноклональных антител разработаны специальные диагностические наборы, позволяющие идентифицировать возбудителей инфекционных заболеваний и антигены, появляющиеся в организме при различных патологиях неинфекционной природы.

В настоящее время существует множество линий миеломных ГАТ-чувствительных В-лимфоцитов, ведущих свое происхождение от млекопитающих различных видов. Отработаны также методы выделения В-лимфоцитов не из селезенки, а из периферической крови, отбираемой из сосудов иммунизируемого организма стандартными методами, что позволяет получать гибридомы и, соответственно, моноклональные антитела различной видовой принадлежности, включая человеческие. Это открывает возможности для терапии ряда заболеваний, например злокачественных изменений, путем доставки связанных с моноклональными антителами лекарственных препаратов непосредственно к раковым клеткам без причинения вреда остальным клеткам организма.

Переходя к рассмотрению принципов постановки различных реакций с применением поликлональных или моноклональных антител, следует отметить несколько общих правил. Поскольку в основе взаимодействия антиген – антитело лежит образование слабых химических связей, необходимо проводить все реакции в среде электролитов с соответствующими значениями pH и ионной силы раствора, использовать химически чистую посуду и соблюдать рекомендованный температурный режим. Подробности практической реализации вариантов каждого

из методов можно (и нужно!) находить в специально изданных руководствах, но понимание сути и принципа конкретного метода существенно помогает при доведении методики до нужного, позволяющего избегать артефактов уровня.

4.1. РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ

Реакции этой группы применяются для качественного и количественного определения корпускулярных антигенов или соответствующих им антител в анализируемых суспензиях. Наиболее широкое применение они находят в микробиологических исследованиях и медицине при диагностике инфекционных заболеваний.

Существует множество разновидностей реакций агглютинации, которые применяются в зависимости от поставленной цели. В случаях когда достаточно получения сведений о наличии конкретного антигена или конкретных антител, применяются качественные реакции, которые дают существенный выигрыш во времени. Наиболее распространенным вариантом таких экспресс-реакций является **ориентировочная реакция агглютинации на стекле**. Для ее постановки на поверхность обычного предметного стекла (или в лунки специальных стекол) наносят капли цельной или незначительно разведенной сыворотки и затем добавляют в каждую каплю корпускулярный антиген в растворе электролита (например, физиологическом растворе). В качестве контролей на стекло должны быть нанесены отдельные капли, содержащие только антиген или только сыворотку. В случае соответствия антигена антителам сыворотки в опытных каплях в течение 5–15 мин образуется видимый глазом осадок, который не наблюдается в контрольных каплях. В такой реакции неизвестным может быть антиген (например, выделенные в ходе исследования бактерии), и тогда используются промышленно производимые **антисыворотки**, содержащие антитела к антигенам бактерий конкретных видов или сероваров (серотипов, серогрупп). Применить эту реакцию можно и для анализа сыворотки, полученной, например, от конкретного пациента. В этом случае используются промышленно производимые взвеси антигенов, называемые обычно **диагностикумами**. И та и другая реакция может быть применена для постановки диагноза заболевания, только в первом случае это будет часть бактериологического метода в диагностике инфекционных заболеваний, во втором – часть серологического метода.

Для количественной оценки свойств сыворотки существует **развернутая (пробирочная, объемная) реакция агглютинации**. Применение этой реакции основано на обсужденных ранее особенностях агглютинации: хорошо фиксируемые визуально комплексы образуются только при соответствующих концентрациях реагирующих антигенов и антител.

Для постановки реакции анализируемую сыворотку разводят физиологическим раствором в зависимости от предполагаемого в ней количества анализируемых антител в 10 или 100 раз, а затем несколько раз двукратно либо сразу начинают с серии последовательных двукратных разведений. Пробирок с минимальным разведением сыворотки обычно приготавливают две – одна из них будет служить в качестве контроля на выпадение в осадок самой сыворотки. Кроме того, готовят одну пробирку, в которой будет содержаться только используемый для разведения

сыворотки физиологический раствор. Объем жидкости во всех пробирках должен быть одинаковым. Далее в каждую пробирку (кроме контрольной на выпадение в осадок сыворотки) вносят равные объемы суспензии антигена в таком же физиологическом растворе, перемешивают и помещают в термостат с температурой +37 °С на 1–4 ч. При отсутствии видимых осадков после инкубирования в термостате, как правило, оставляют пробирки при комнатной температуре до следующего дня. Учет результатов проводят визуально, отмечая, при каких разведениях сыворотки образуются осадки. Наибольшее разведение (например, 1 : 3200), при котором осадок образовался, считается показателем и называется **титром сыворотки**. Хотя такой метод не дает точных данных о количестве молекул антител конкретной специфичности, он позволяет достоверно сравнивать сыворотки между собой и эффективно использовать их в постановке различных реакций. Для промышленно производимых сывороток на упаковках или в сопроводительных документах указывается титр как основной показатель их качества, что позволяет при постановке реакций с ними правильно подобрать разведение.

Развернутые реакции агглютинации также можно применить и для качественного или количественного определения антигена в исследуемых жидкостях. В этом случае используется одно разведение сыворотки, а из содержащей антиген суспензии готовят серию разведений.

4.2. РЕАКЦИИ ПРЕЦИПИТАЦИИ

Такие реакции используются для высокодисперсных антигенов, представляющих собой отдельные молекулы. Основные отличия их от реакций агглютинации заключаются в более медленном (как правило) образовании осадка (преципитата), меньшей его плотности и способности со временем диссоциировать.

Наиболее быстрый вариант (экспресс-метод) преципитации – это **реакция кольцепреципитации**. Для ее постановки используют специальные узкие пробирки, обычно называемые преципитационными. Небольшой диаметр таких пробирок должен препятствовать смешиванию двух растворов, содержащих соответственно антиген и антитела. Необходимо, чтобы оба раствора были прозрачны и не содержали видимых взвешенных частиц. Сначала в пробирку до половины объема наливают один из растворов, а затем медленно по стенке, не допуская перемешивания с уже налитым раствором, приливают второй в таком же объеме. В результате диффузии молекул антигена и антител будут создаваться меняющиеся соотношения концентраций, и, когда они окажутся эквивалентными, образуется располагающийся на границе двух растворов осадок, обычно имеющий форму кольца, что и дало название реакции. Обычно кольцо образуется в течение 5–15 мин, но затем из-за продолжающейся диффузии концентрации выйдут из зоны эквивалентности, комплексы антиген – антитело начнут диссоциировать, и кольцо осадка может исчезнуть. По этой причине учитывать результат такой реакции следует не позже чем через час после ее постановки, что в целом считается одним из ее недостатков.

С целью избежать диссоциации образующихся осадков были разработаны варианты реакций преципитации в гелях, получившие название реакций иммунодиффузии. Используемые для таких реакций гели чаще всего готовят из агара или

агарозы в концентрациях от 1 до 2 % на веронал-ацетатном буфере с pH 6,8 и ионной силой 0,1. Нагретый гелеобразующий раствор наносят слоем равной толщины на прозрачную стеклянную или пластиковую пластинку или дно чашки Петри и после застывания в геле изготавливают лунки равной глубины и диаметра. В зависимости от варианта реакции в лунки будут вноситься растворы антигенов или антител, при диффузии которых в геле будут создаваться эквивалентные концентрации. Хотя такая диффузия будет происходить медленнее, чем в жидкостях, что удлиняет время протекания реакций, образующиеся в геле осадки сохраняются гораздо дольше. Кроме того, можно улучшить визуализацию результатов проведенной реакции путем обработки гелей раствором связывающихся с белками красителей (например, Кумасси синего).

Одним из наиболее распространенных вариантов таких реакций является **двойная радиальная иммунодиффузия по Оухтерлони** (рис. 58). Для постановки реакции в разные лунки, расположенные на расстояниях 4–10 мм друг от друга, вносят суспензии антигенов и антител. Молекулы реагентов диффундируют в гель,

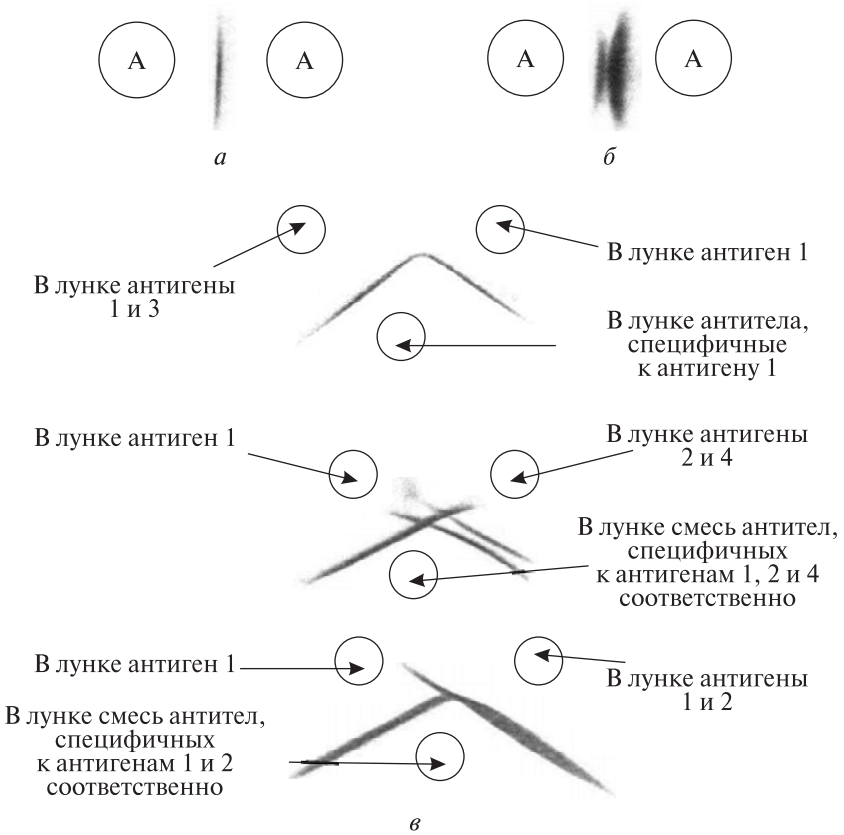


Рис. 58. Схема постановки и примеры получаемых результатов при двойной иммунодиффузии:
а – в исследуемом образце присутствует один антиген; *б* – присутствуют два антигена, способных взаимодействовать с данными антителами; *в* – использованы одна антисыворотка и два образца, анализируемые на присутствие данного антигена (по I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, 1989)

и в случае соответствия антигена и антитела в геле между лунками образуется полоска преципитата. Иммунодиффузия получила название двойной в силу того, что оба компонента движутся в геле навстречу друг другу. Результаты учитывают каждые 24 ч в течение 6–7 суток. Время образования преципитатов варьирует в зависимости от температуры инкубирования гелей (реакцию можно проводить при +4 °С, +18–20 °С или +37 °С) и от молекулярной массы антигенов.

Метод позволяет анализировать сыворотки на содержание антител различной специфичности. В этом случае вокруг одной заполняемой сывороткой лунки располагаются лунки, в которые вносятся различные антигены.

По сходной схеме возможно определить наличие в анализируемом растворе нескольких различных антигенов, но тогда анализируемый раствор вносят в центральную лунку, а лунки вокруг заполняют различными моноспецифическими сыворотками. При наличии двух или более полос между конкретными лунками делается вывод о наличии в анализируемых смесях нескольких антигенов, способных связываться с антителами сыворотки, но обладающих различной скоростью диффузии. По ширине образующихся полос преципитата можно предположительно оценивать разницу в концентрациях того или иного реагента в анализируемых смесях, однако этот метод не является истинно количественным.

Для определения количества реагирующих компонентов используется **простая радиальная иммунодиффузия по Манчини** (рис. 59). Для постановки этой реакции один из компонентов (например, антитела) вносят в гелеобразующий раствор до застывания и перемешиванием добиваются равномерного его распространения. После застывания геля в слое образуется одинаковая концентрация этого компонента в любой точке геля. После изготовления лунок их заполняют растворами, содержащими второй компонент (в нашем примере молекулы антигена). В данном случае диффундирующим считается только один, вносимый в лунки, компонент, поэтому такая иммунодиффузия и получила название простой, а не двойной. При соответствии антигенов и антител по специфичности в силу равномерной диффузии по всем направлениям (отсюда название «радиальная диффузия») преципитат образуется в зоне, представляющей окружность вокруг лунки.

При этом площадь занятой преципитатом окружности, определяемая по формуле $S = \pi d^2$, пропорциональна количеству диффундирующего компонента. Измеряя диаметр образованных преципитатом окружностей вокруг каждой из лунок и сопоставляя полученные величины с построенным заранее по результатам специально проведенного эксперимента графиком соотношения квадрата диаметра и известных концентраций одного из компонентов реакции (калибровочным графиком), можно точно определить концентрацию его в анализируемом растворе. Следует помнить, что условия проведения опытных реакций и реакций, дающих данные для построения калибровочного графика, должны быть полностью идентичными. Только в этом случае полученные в опыте данные можно считать достоверными. Наиболее часто используемыми температурами для проведения такой иммунодиффузии являются +4 °С или +18–20 °С, время учета результатов – 40–48 ч.

Определенные недостатки преципитации в гелях – длительность проведения реакций и нечеткость результатов при невысоких концентрациях антигенов. С целью преодолеть эти недостатки во второй половине XX в. были разработаны

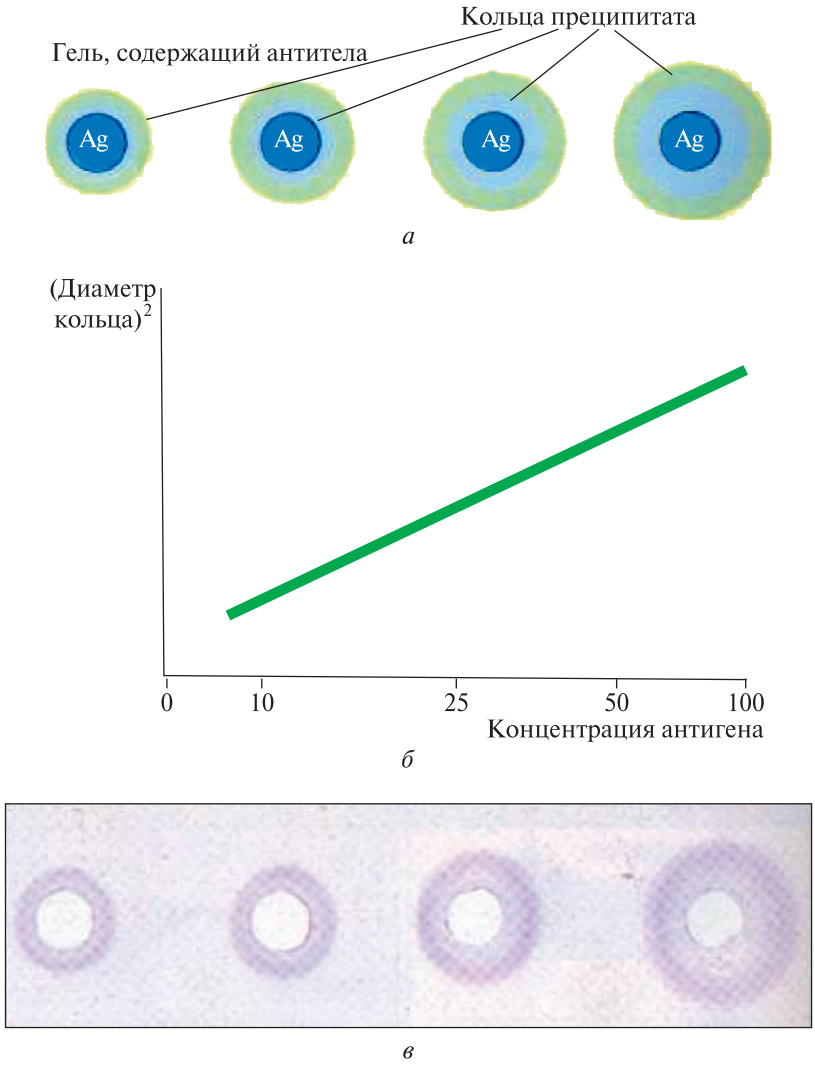


Рис. 59. Простая радиальная иммунодиффузия:
а – схема; *б* – калибровочный график; *в* – преципитат в геле
(по I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, 1989)

методы, сочетающие белковый электрофорез и иммунопреципитацию – **иммуноэлектрофорез** (рис. 60). Помимо выигрыша во времени и повышения разрешающей способности такие методы дают возможность более четко отличить белковые антигены, имеющие одинаковые антигенные детерминанты, но отличающиеся по молекулярной массе. Для этого достаточно обычного иммуноэлектрофореза. Для его постановки изготавливают гель, в котором кроме обычных стартовых лунок делают также желобок для сыворотки. Его располагают между дорожками в направлении от электрода к электроду, т. е. вдоль фронта движения белков. Гель из желобка не удаляют, чтобы не нарушать прохождение электрического тока во время фореза. Сначала в соответствующем буферном растворе проводят электрофорез образцов, анализируемых на присутствие искомого антигена.

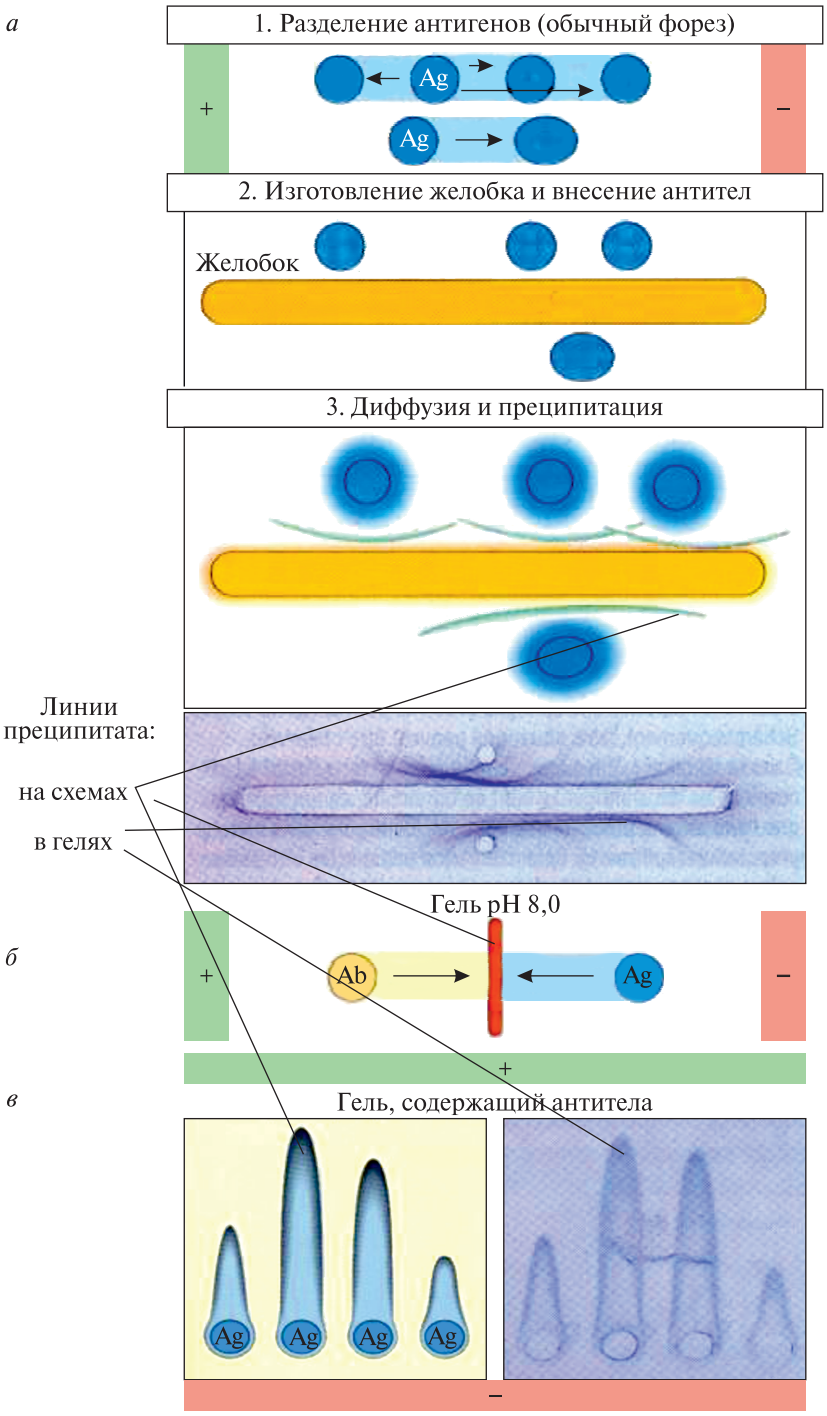


Рис. 60. Схематичное изображение вариантов иммуноэлектрофореза: *а* – обычный; *б* – встречный; *в* – ракетный (по I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, 1989). Пояснения приводятся в основном тексте

После снятия электрического поля пластинку геля переносят во влажную камеру, из желобка удаляют гель и вместо него вносят сыворотку или суспензию моноклональных антител. Результаты учитывают после инкубирования геля во влажной камере в течение 12–24 ч. В случае соответствия антигенов и антител в зоне между желобком и дорожками образуются преципитаты в виде дуг, вогнутой стороной направленных в сторону месторасположения антигена. Для лучшей визуализации гель прокрашивают красителем, связывающимся с белком. Фактически такой метод является вариантом двойной иммунодиффузии, но имеет большую разрешающую способность и дает существенный выигрыш во времени.

Для некоторых белковых антигенов возможно применить вариант иммуноэлектрофореза, еще в несколько раз ускоряющий процесс. Это так называемый **встречный электофорез (электросинерез)**. Метод основан на том, что различающиеся по аминокислотному составу белки в щелочной среде могут приобретать противоположные заряды и мигрировать при электрофорезе навстречу друг другу. Для проведения такого фореза используют буфер с pH 8,0, а в геле готовят лунки у противоположных концов (у катода и анода соответственно). В одну из лунок вносят антитела, в другую – содержащий антиген раствор. Под действием электрического поля компоненты двигаются гораздо быстрее, чем при обычной диффузии, поэтому преципитаты в центральной части геля будут образовываться в течение 1–3 ч. К тому же чувствительность электросинереза приблизительно в 10 раз выше, чем у метода Оухтерлони, т. е. можно обнаруживать антигены, присутствующие в небольших концентрациях. Недостаток метода в том, что его нельзя применять к любым антигенам.

Описанные выше варианты иммуноэлектрофореза позволяют выявить антиген, но не определить его количество. Количественным методом (фактически модификацией иммунодиффузии по Манчини) является так называемый **ракетный иммуноэлектрофорез**. Для его постановки в охлажденный до 50 °С гелеобразующий раствор вносят подогретую до такой же температуры сыворотку с таким расчетом, чтобы она составляла 1–5 % геля, перемешивают и готовят пластинку геля. После внесения в лунки антигенов проводят электрофорез, условия которого подбирают так, чтобы максимально ограничить смещение молекул антител в электрическом поле (чаще всего используют барбиталовый буфер с pH 8,6 и низкое напряжение). Время электрофореза должно обеспечить выход всех молекул антигена из лунки в гель и вхождение их в состав преципитата, обычно это происходит в течение двух часов. Преципитаты в таких условиях образуются в зонах по ходу движения антигена, которые имеют форму вытянутого конуса (ракеты). Длина зоны образования преципитата пропорциональна концентрации антигена, что дает возможность, измерив длину «ракеты» и используя специально построенный калибровочный график, определить количество антигена в пробе.

Вариантом ракетного иммуноэлектрофореза является так называемый **перекрестный электрофорез**. Для его постановки готовят обычной гель и проводят обычный электрофорез анализируемой пробы. При этом используют одну пробу и лунку располагают у одного из краев пластинки. После проведения электрофореза часть пластинки (около 4/5 от исходного размера) отрезают и удаляют, оставляя только ту часть, в которой находится дорожка первого электрофореза. Затем в ту же камеру заливают гелеобразующий раствор с сывороткой так, чтобы остав-

шийся участок пластинки объединился с новым, содержащим сыворотку, гелем. Меняют положение пластинки (или электродов) так, чтобы направление движения антигенов было перпендикулярным тому, которое было при первом форезе, и проводят второй форез в условиях, как для ракетного. Учет результатов проводят, как описано выше. В таком варианте результаты могут оказаться более точными, в силу того что при втором форезе анализируемыми образцами фактически оказываются чистые однородные белки.

Описанные ранее реакции агглютинации и преципитации были введены в практику еще в конце XIX в. и не утратили своего значения до сих пор, но уже в первые годы их применения стало понятно, что их разрешающая способность не всегда удовлетворяет исследователей. В частности, при малых концентрациях того или иного реагента образующиеся комплексы настолько невелики по размерам, что даже с применением микроскопии не могут быть фиксированы исследователем. В связи с этим постоянно проводились попытки подобрать условия для более выраженной визуализации результатов взаимодействия антиген – антитело. Одной из успешных попыток стало применение эритроцитов крови в качестве носителей антигена.

4.3. РЕАКЦИИ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Собственно феномен гемагглютинации заключается в объединении эритроцитов в видимые невооруженным глазом агрегаты и более быстром, чем оседание свободных эритроцитов, осаждении их из раствора. Помимо открытых еще К. Ландштейнером агглютининов α и β агрегирование эритроцитов могут вызывать антитела к различным эритроцитарным антигенам, лектины растительного происхождения, антигены и жгутики бактерий отдельных видов, некоторые вирусы, в том числе и вирусы человека. Такую гемагглютинацию принято называть **прямой**, или **активной** (рис. 61). Кроме этого, при закреплении на поверхности эритроцитов изначально несвойственных им антигенов возможно агрегирование и осаждение их антителами, комплементарными таким антигенам. В этом случае агглютинацию называют **непрямой**, или **пассивной**.

Осаждение на поверхность эритроцитов таких, условно говоря, чужих для них антигенов может происходить естественным путем (например, неполных антител из плазмы крови) или в результате направленного экспериментального воздействия.

В последнем случае проводят обработку эритроцитов трипсином или танином, что способствует неспецифическому закреплению на их поверхности широкого круга антигенов или гаптенов. В некоторых случаях для загрузки эритроцитов антигеном возможно применение бифункциональных реагентов (например, глутарового альдегида), которые могут образовывать ковалентные связи как с антигеном, так и с молекулами мембраны эритроцита. Такие направленно загруженные эритроциты принято называть сенсибилизированными с указанием конкретного антигена, например сенсибилизированные хлорбензолом и т. п.

Осаждение эритроцитов лучше всего наблюдать в небольших объемах, вносимых в специальные углубления (лунки) на поверхности стеклянных пластинок или полистироловых планшетов для иммунологических реакций (см. рис. 61, *в*).

Дно таких углублений имеет форму сферы, поэтому при естественном (без агглютинации) оседании эритроцитов на дне такой лунки в центре образуется плотный осадок с ровными краями, занимающий небольшую площадь (так называемая «пуговка»). Такой результат в реакциях учитывают как отрицательный. При наличии агглютинации в зависимости от ее степени осадок появляется на большей, чем «пуговка», площади и края осадка выглядят размытыми. При самой эффективной агглютинации осадок покрывает практически все сферическое дно, формируя так называемый «зонтик» (название связано со сходством наблюдаемой картины с красным перевернутым зонтом).

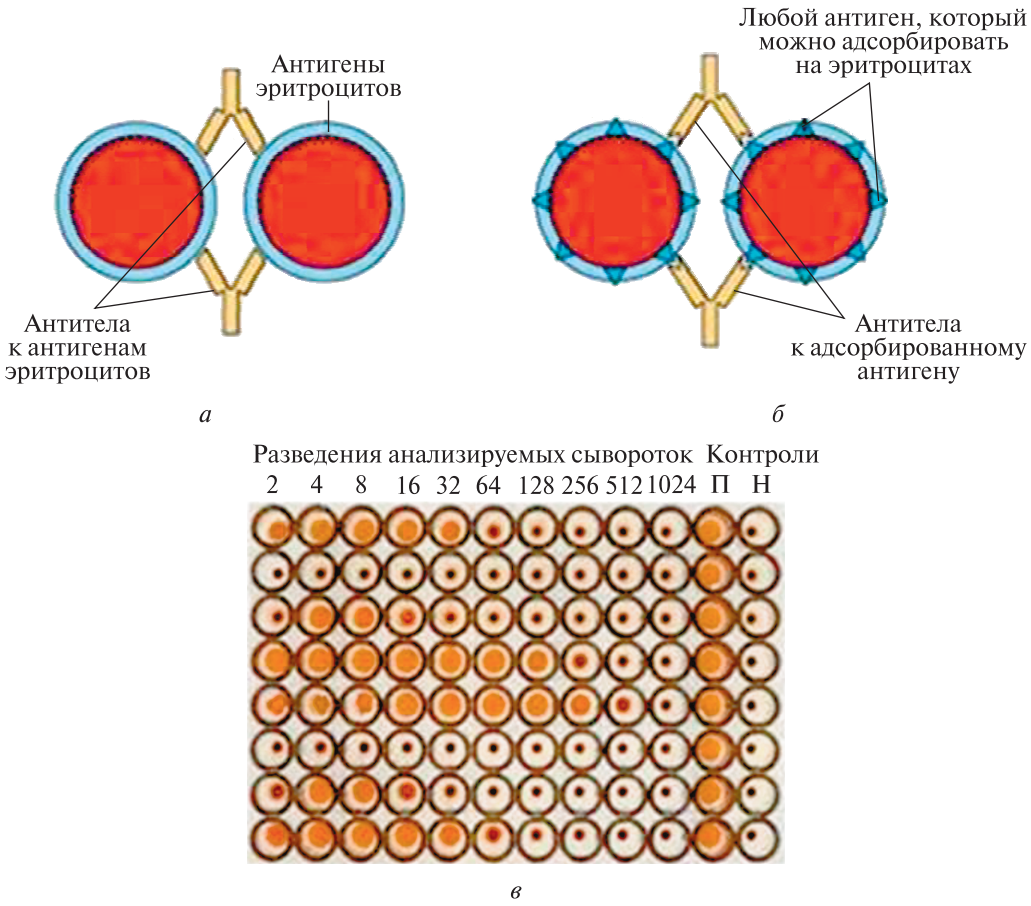


Рис. 61. Реакция гемагглютинации:
а – прямой (РГА); *б* – непрямой (РНГА); *в* – результат реакции гемагглютинации (по I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, 1989)

Одной из разновидностей реакций гемагглютинации является **реакция Кумбса**, применяемая для выявления неполных антител. Как упоминалось ранее, такие антитела закрепляются на поверхности эритроцитов естественным образом, поэтому если смешать суспензию эритроцитов с антителами, комплементарными изотипическим антигенным детерминантам иммуноглобулинов определенного

класса (антииммуноглобулинами), будет происходить их агрегирование (рис. 62). Такой вариант реакции Кумбса называется прямым и применяется для выявления уже сорбированных неполных антител. Для выявления неполных антител в плазме крови смешивают взятую от пациента сыворотку и суспензию эритроцитов другого организма, выдерживают необходимое для адсорбции неполных антител время и добавляют антииммуноглобулины. Такой тест называется непрямой реакцией Кумбса. Реакции выявления неполных антител проводят при ряде неинфекционных (гемолитическая анемия, желтуха новорожденных и др.) заболеваний и некоторых инфекционных (бруцеллёз, туляремия и др.) болезнях.

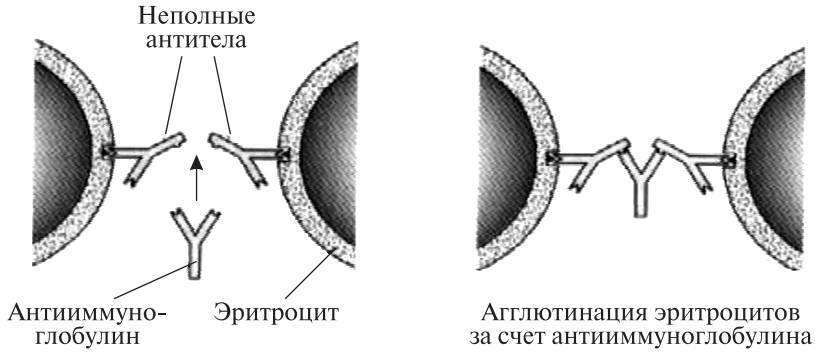


Рис. 62. Реакция Кумбса (по I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, 1989). Пояснения приводятся в основном тексте

Гемагглютинацию можно использовать для выявления определенных возбудителей болезней и антител, вырабатываемых под их воздействием. В первом случае ставится реакция прямой активной гемагглютинации. Например, для выявления в анализируемой жидкости пара- и ортомиксовирусов ее смешивают с 1 % суспензией отмытых физиологическим раствором куриных эритроцитов. Их агглютинация будет свидетельствовать о наличии вируса. Такая реакция фактически не относится к реакциям с применением антител, поскольку здесь собственно вирусы являются агглютинирующим фактором. Во втором случае используется **торможение (ингибирование) гемагглютинации**. Для ее постановки в систему прямой гемагглютинации, содержащую конкретный гемагглютинирующий вирус и куриные эритроциты, вносят анализируемую сыворотку (рис. 63, *а*).

В случае наличия в ней антител, комплементарных присутствующему в системе вирусу, вирус будет инактивирован и, следовательно, не сможет вызвать агглютинацию.

Используя торможение гемагглютинации, можно выявлять в анализируемых суспензиях присутствующий в очень небольших концентрациях антиген. В частности, для определения некоторых гормонов разработан метод РТПГА – реакция торможения пассивной гемагглютинации (рис. 63, *б*). В этом случае используют эритроциты, на поверхности которых сорбирован определенный гормон (сенсибилизированные гормоном эритроциты), и антитела, специфичные к этому гормону.

Анализируемую на присутствие такого же гормона жидкость смешивают с антителами. Параллельно в качестве контроля с таким же объемом суспензии антител смешивают эквивалентное количество физиологического раствора.

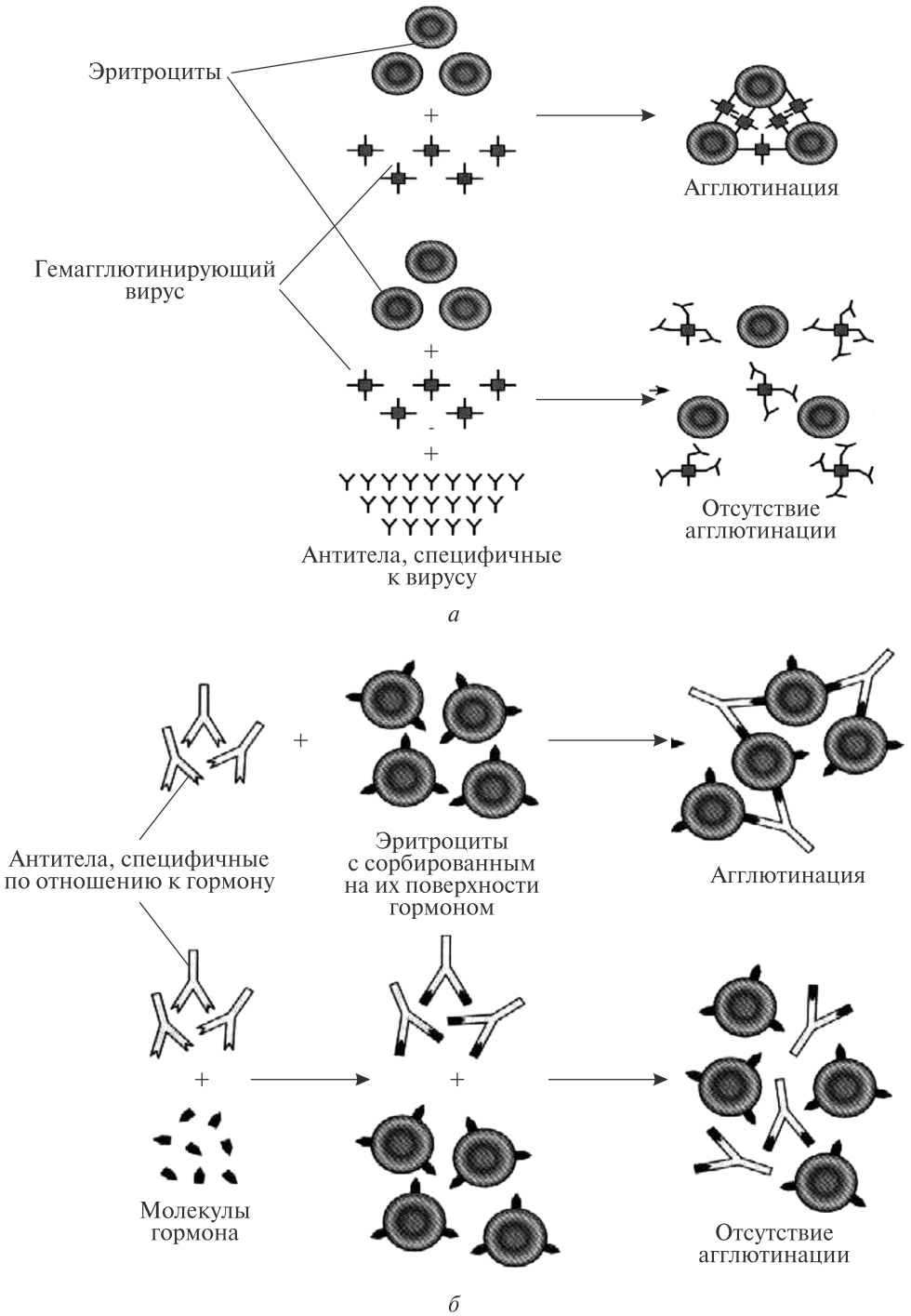


Рис. 63. Варианты реакции ингибирования (торможения) гемагглютинации:
а – тест на выявление антител против гемагглютинирующих вирусов (грипп, эпидермический паротит); *б* – определение гормонов (по D. M. Weir, J. Stewart, 1997). Пояснения приводятся в основном тексте

По истечении времени, необходимого для связывания гормона с антителами, в обе смеси добавляют суспензию сенсибилизированных гормоном эритроцитов. Если в контроле агглютинация происходит, а в опыте – нет или наблюдается снижение ее эффективности, делается вывод о присутствии гормона в анализируемой жидкости, поскольку уже связанные с гормоном антитела не могут агглютинировать эритроциты.

4.4. РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ КОМПЛЕМЕНТА

Еще одной группой методов с улучшенной визуализацией результатов реакции антиген – антитело стали реакции с применением комплемента. Как известно, его активация по классическому пути инициируется комплексами антиген – антитело. В тех случаях, когда сами комплексы не могут быть фиксированы визуально, можно оценить их наличие косвенно, например по гибели или разрушению (лизису) клеток. Если в качестве клеток-мишеней в таких реакциях используются эритроциты, лизис которых легко тестируется по выходу гемоглобина в раствор, говорят о реакциях гемолиза.

Примером реакции, в которой используются комплемент и эритроциты, является **реакция связывания комплемента** (РСК). Наибольшую известность получило ее применение в диагностике сифилиса, поскольку выявлять образующиеся в малых количествах в организме болеющих антитела против возбудителя этой болезни методами преципитации или агглютинации не удавалось. В настоящее время существует еще несколько серологических методов диагностики этой болезни, но РСК не утратила своего значения до сих пор.

Для постановки этой реакции принято готовить две системы (рис. 64). Система I представляет смесь диагностикума, содержащего антигены *Treponema pallidum* (возбудителя сифилиса), прогретой до 57 °С в течение 30 мин исследуемой сыворотки (прогревание необходимо для инактивации комплемента человека в сыворотке) и раствор комплемента (чаще всего морской свинки) в строго определенном количестве (так называемый оттитрованный комплемент). Параллельно готовят систему II (гемолитическую), которая содержит 3 % взвесь отмытых физиологическим раствором эритроцитов барана и сыворотку кролика, иммунизированного эритроцитами барана. Все компоненты обеих систем, кроме эритроцитов и анализируемой сыворотки, производятся промышленно и поставляются в лаборатории в лиофилизированном состоянии. Для проверки качества используемых растворов и условий проведения реакции каждый раз готовят контроли: 1) диагностикума – диагностикум + комплемент + физиологический раствор (вместо сыворотки); 2) комплемента – раствор комплемента + двойной объем физиологического раствора; 3) исследуемой сыворотки – сыворотка + комплемент + физиологический раствор (вместо диагностикума); 4) заведомо отрицательный – сыворотка здорового человека + диагностикум + комплемент; 5) заведомо положительный контроль – стандартная иммунная сыворотка против антигенов *Treponema pallidum* + диагностикум + комплемент.

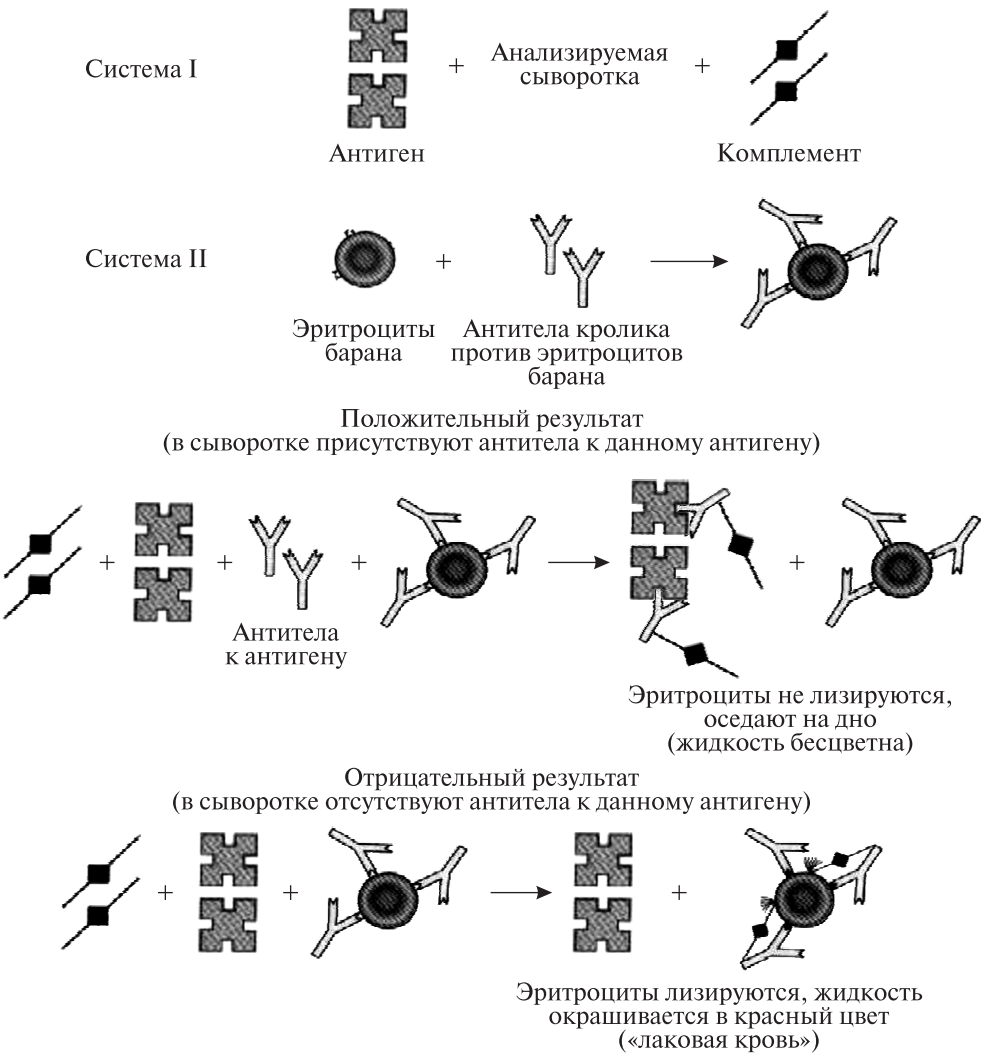


Рис. 64. Реакция связывания комплемента (по D. M. Weir, J. Stewart, 1997). Пояснения приводятся в основном тексте

После инкубирования системы I, системы II и всех контролей в течение 45 мин при +37 °С во все пробирки доливают двойной объем системы II и продолжают инкубирование при этой же температуре до полного гемолиза в контрольных пробирках 1–4 (обычно 30–40 мин). Если в опытной пробирке имеет место гемолиз, раствор становится красным и прозрачным («лаковая кровь»), результат реакции считается отрицательным. Если эритроциты не лизируются, а оседают на дно (раствор становится прозрачным, но бесцветным) – результат положительный (см. рис. 64).

Суть такого прочтения результатов заключается в следующем. При наличии в исследуемой сыворотке антител к антигенам диагностикума активация комплемента происходит еще в первой системе, и он, будучи добавлен в ограничен-

ном количестве, израсходуется. При отсутствии таких антител антиген сохраняется в исходном количестве и фактически переходит в систему II, где активируется на поверхности покрытых антителами кролика эритроцитов барана, что и приводит к их гемолизу и выходу гемоглобина в раствор.

Еще одним вариантом реакций с использованием эритроцитов и комплемента является **метод локального гемолиза (метод «бляшек»)**. Он был предложен Н. Ерне в 1963 г. и до сих пор применяется для качественного и количественного анализа продукции антител каким-либо организмом. Для его постановки (рис. 65) В-лимфоциты исследуемого организма, взятые из селезенки, лимфоузла или периферической крови, смешивают с эритроцитами, на поверхности которых сорбирован тот антиген, продукцию антител к которому необходимо определить. Полученную смесь вносят в охлажденный до 45 °С гелеобразующий раствор, перемешивают до равномерного окрашивания раствора в красный цвет и выливают на дно чашки Петри для застывания.

После застывания проводят инкубирование в течение часа при +37 °С для того, чтобы продуцируемые плазматическими клетками антитела могли связаться с антигенами. Затем на поверхность геля наносят раствор комплемента и продолжают инкубирование в тех же условиях. Через 30 мин промывают гель физиологическим раствором и фиксируют образование неокрашенных зон на красном фоне (бляшек). В центре такой зоны будет находиться продуцирующий антитела искомой специфичности В-лимфоцит (плазматическая клетка). Подсчитывая число таких бляшек, можно определить уровень развития иммунного ответа на конкретный антиген по относительному числу клеток, продуцирующих специфичные к нему антитела.

Кроме того, можно определить, какого именно класса антитела продуцируются к данному антигену. При **прямом методе** выявляются В-клетки, продуцирующие иммуноглобулины класса М. Учитывая то, что IgM имеют пентамерную структуру и за счет этого активируют комплемент эффективнее, чем IgG, при непродолжительном времени, отпущенном на адсорбцию антител на эритроцитах, бляшки будут образовываться только вокруг IgM-продуцирующих клеток.

При непрямом методе, который позволяет выявить продукцию антител других классов, необходим еще один этап. Например, нужно выявить клетки, продуцирующие IgE. Напомню, что иммуноглобулины этого класса не способны активировать комплемент, поэтому прямым методом их обнаружить невозможно. Но при **непрямом методе** после времени, отведенного на адсорбцию антител на эритроцитах, гель обрабатывают суспензией IgG, специфичных к изотипическим антигенным детерминантам ε-цепей. Такие анти-IgE-иммуноглобулины осаждаются только на тех эритроцитах, на поверхности которых уже есть IgE, и после добавления комплемента он активируется именно на них и образуется бляшка.

Третий вариант локального гемолиза **(обратный метод)** позволяет определить число клеток, продуцирующих антитела конкретного класса вне зависимости от их специфичности. Например, необходимо знать, сколько в анализируемой суспензии В-клеток, секретирующих IgA. В этом случае следует использовать эритроциты, на поверхности которых закреплены анти-IgA-иммуноглобулины класса IgG. Причем они должны быть прикреплены к мембране эритроцитов своей Fc-частью, чтобы их антигенсвязывающие участки оставались свободными.

Как упоминалось выше (см. с. 48), не связавшие антиген IgG активировать комплемент не способны, поэтому только при присоединении к ним антител класса IgA в качестве антигенов они запустят активацию комплемента. Следовательно, бляшка образуется только вокруг В-лимфоцита, продуцирующего IgA.

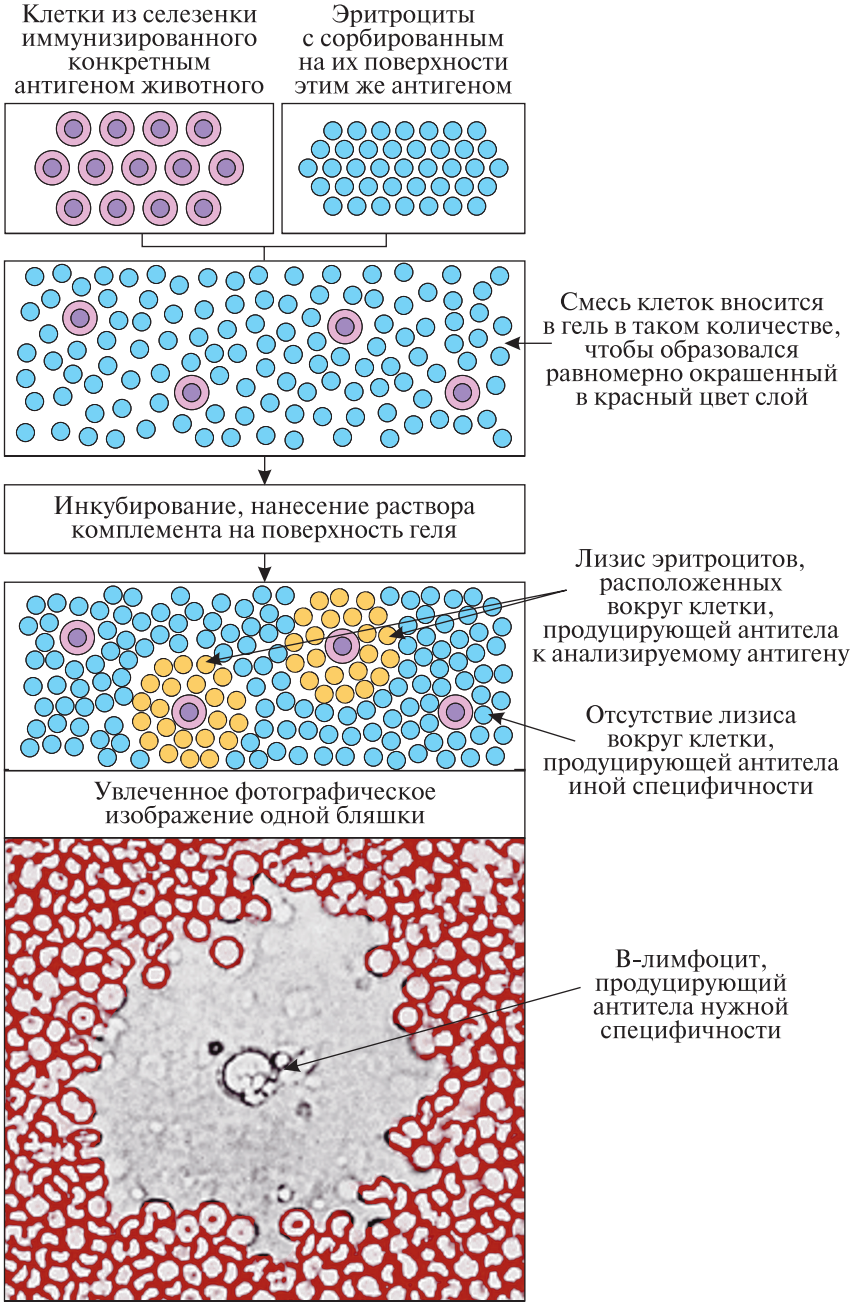


Рис. 65. Метод локального гемолиза (по I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, 1989). Пояснения приводятся в основном тексте

К группе реакций с участием комплемента относятся также **реакции лизиса**. В них используются не эритроциты, а другие клетки, например бактерии, тогда это будут **реакции бактериолиза**. Их можно применять для выявления в крови пациентов антител к конкретным возбудителям и для идентификации выделенных бактериальных культур.

В первом случае осуществляют **вариант бактериолиза *in vitro***. Для его постановки в стерильных условиях объединяют прогретую при 56 °С в течение 30 мин исследуемую сыворотку (0,4 мл), комплемент морской свинки (0,1 мл) и стандартную культуру бактерий определенного вида или штамма (0,1 мл суспензии с плотностью 250 млн кл/мл). Параллельно ставят контроль, где вместо анализируемой сыворотки вносят нормальную (сыворотку здорового человека). После инкубирования при +37 °С в течение 2 ч осуществляют высев бактерий из опытной и контрольной пробирок на плотные питательные среды с целью определения количества клеток. Учет результатов проводят после инкубирования посевов в течение 24–48 ч. При наличии в исследуемой сыворотке антител к данным бактериям их количество будет меньшим в опыте, чем в контроле. Таким же методом возможно идентифицировать бактерии, если по каким-либо причинам реакция агглютинации не дает однозначного ответа. Тогда в опытной пробирке должны быть смешаны исследуемые бактерии и определенная антисыворотка.

Недостатком этого варианта является его длительность, поэтому существует **вариант бактериолиза *in vivo***. В этом случае смесь испытуемой сыворотки и бактерий вводят внутрибрюшинно морской свинке и через 10, 30 и 60 мин отбирают перитонеальный экссудат, из которого делают фиксированный и окрашенный фуксином препарат и препарат для прижизненного исследования (раздавленная капля). Положительным результатом является обездвиживание подвижных бактерий, набухание бактериальных клеток и уменьшение их количества. Такая реакция называется **пассивным бактериолизом *in vivo***, поскольку в данном случае морская свинка играет только роль поставщика комплемента и термостата. **Активный бактериолиз *in vivo*** требует наличия иммунной по отношению к конкретному возбудителю морской свинки, в этом случае она еще будет играть роль поставщика антител. Естественно, что такой вариант применим только для идентификации бактерий. Контролями в пассивном варианте служит введение животному бактерий и нормальной сыворотки, в активном – введение бактерий неиммунной морской свинке.

Помимо реакций бактериолиза к реакциям лизиса относится и применяемая для типирования тканей на гистосовместимость **реакция цитотоксичности**. В этом случае клетками, визуализирующими реакцию антиген – антитело, являются лейкоциты. Их суспензию смешивают с сывороткой, которую исследуют на наличие антител к поверхностным антигенам клеток конкретного организма (например, белкам главного комплекса гистосовместимости). В эту же смесь добавляют краситель, не способный проникать через мембрану лейкоцита и окрашивать его цитоплазму прижизненно (например, трипановый синий). Третьим компонентом такой реакции является комплемент. Выявленное с помощью микроскопирования окрашивание клеток будет свидетельствовать о наличии антител, поскольку

только после их взаимодействия с поверхностными антигенами клетки комплемент будет активироваться, ее мембрана потеряет целостность и краситель проникнет в цитоплазму.

4.5. РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ

Эта группа реакций была введена в практику одной из первых, еще в конце XIX в., но до сих пор не утратила своей актуальности. С помощью реакций нейтрализации можно выявлять наличие антител и оценивать эффект их действия, а также идентифицировать микроорганизмы или их факторы патогенности. Особенностью реакций этой группы является использование для визуализации результатов взаимодействия антиген – антитело живых тест-систем. Под этим термином понимают целостный организм взрослого животного, куриные эмбрионы, поддерживаемые в культуре клетки животных или человека. Выбор тест-системы определяется прежде всего свойствами антигенов, которые используются в конкретной реакции.

Реакции нейтрализации могут применяться для идентификации патогенных микроорганизмов и определения их количества в анализируемых пробах. В этом случае необходимо наличие антисывороток или суспензий моноклональных антител, специфичных по отношению к конкретным видам или штаммам. Испытываемую жидкость смешивают с антителами, выдерживают необходимое для взаимодействия антиген – антитело время и вводят в живую тест-систему. В качестве контроля используют введение в такую же тест-систему смеси нормальной сыворотки и анализируемой пробы. Сравнивая состояние тест-систем в опыте и контроле, делают вывод о наличии или отсутствии нейтрализации и, соответственно, о видовой или штаммовой принадлежности патогена. Для некоторых микроорганизмов, в частности болезнетворных вирусов, реакции нейтрализации до сих пор являются фактически единственным методом их идентификации.

Практически такой же метод может быть применен для оценки иммунного ответа организма на присутствие возбудителя, но в этом случае используются стандартные штаммы микроорганизмов и сыворотки крови пациента или иммунизированного животного.

Оба варианта реакций могут быть количественными, но в этом случае необходимо соблюдать все правила постановки эксперимента (использовать положенное количество максимально стандартизированных тест-систем и необходимое количество доз испытуемых агентов) для получения показателя ДЛ50 (Dosis letalis 50). Этот показатель означает дозу исследуемого агента, которая вызывает при данных условиях опыта гибель 50 % взятых в опыт живых тест-систем. Результат количественной оценки – индекс нейтрализации, представляющий собой отношение ДЛ50 опыта к ДЛ50 контроля.

По сходному принципу осуществляются и реакции, позволяющие исследовать не микроорганизмы, а их токсины и обладающие антитоксическим действием антитела (антитоксины). В таких реакциях различают варианты *in vitro* и *in vivo*. Первый практически не отличается от реакций, описанных выше, а при втором используют в качестве опытной тест-системы иммунизированных таким токсином

животных и в качестве контрольной – интактных животных. Фактически тесты на определение уровня антитоксического иммунитета у людей (проба Дика при скарлатине или реакция Шика при дифтерии) также являются вариантом реакции нейтрализации токсинов *in vivo*.

Если реакции проводятся как количественные (т. е. с соблюдением упомянутых выше правил), то результатом их будет индекс нейтрализации.

К реакциям нейтрализации относят и такие, в которых исследуются факторы патогенности бактерий, являющиеся не токсинами, а ферментами (лецитиназами, гиалорунидазами, коллагеназами и др.), или специфичные по отношению к ним антитела. Отличительная черта этой группы реакций нейтрализации – в них не используются живые тест-системы, а для визуализации результатов взаимодействия антиген – антитело достаточно проверки воздействия фермента на его субстрат.

4.6. РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

В реакциях этой группы используются антитела или антигены, связанные с флюорохромами – веществами, способными излучать свет определенной длины волны при облучении их светом с другой длиной волны (например, ультрафиолетом). Разрешающая способность таких реакций выше, чем у всех описанных в предыдущих разделах, потому что в данном случае имеется возможность обнаруживать очень небольшие комплексы антиген – антитело с помощью люминесцентного микроскопа. Кроме того, применение конъюгированных с флюорохромом антител дает возможность обнаруживать трудно переводимые в раствор антигены, например белки наружной цитоплазматической мембраны клеток или какие-либо молекулы, прочно связанные с межклеточным веществом тканей, при микроскопировании срезов. При этом удается определить не только наличие антигенов, но и места их преимущественной локализации в анализируемых образцах, что в некоторых случаях и является главной целью исследования.

Чаще всего в подобных реакциях используют связанные с флюорохромом иммуноглобулины. В качестве хорошо связывающихся с белками флюорохромов применяют флюоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), тетраметилродаминизотиоцианат (ТРИТЦ), которые излучают в зеленой части спектра, и фикоэритрин, который при возбуждении светом такой же длины волны дает красный свет. Это позволяет при необходимости использовать «двойное окрашивание» и в одном анализе выявлять разные антигены.

Различают три основных варианта реакции иммунофлюоресценции (РИФ) (рис. 66). **Прямая иммунофлюоресценция** заключается в обработке анализируемого препарата (среза тканей или мазка, приготовленного из суспензии клеток) антителами, связанными с флюорохромами. После отмывания препарата от несвязавшихся антител его просматривают в люминесцентном микроскопе. **Непрямая флюоресценция** включает два этапа. Сначала препарат обрабатывают обычными («несветящимися») антителами конкретного вида животных. После отмывания проводят обработку конъюгированными с флюорохромом антителами, специфическими к антигенным детерминантам использованных в первой обработке антител («светящимися» антииммуноглобулинами). Отмытый после второго этапа

препарат подвергают микроскопированию. Хотя эта реакция требует большего времени на постановку, ее разрешающая способность выше, поскольку, как правило, на одно «несветящееся» антитело осаждается не одно, а несколько «светящихся». Кроме того, такой метод позволяет работать с очень разными антигенами, используя одну суспензию связанных с флюорохромами иммуноглобулинов, т. е. отпадает необходимость проводить конъюгирование с флюорохромом иммуноглобулинов каждой вновь получаемой сыворотки или суспензии моноклональных антител.

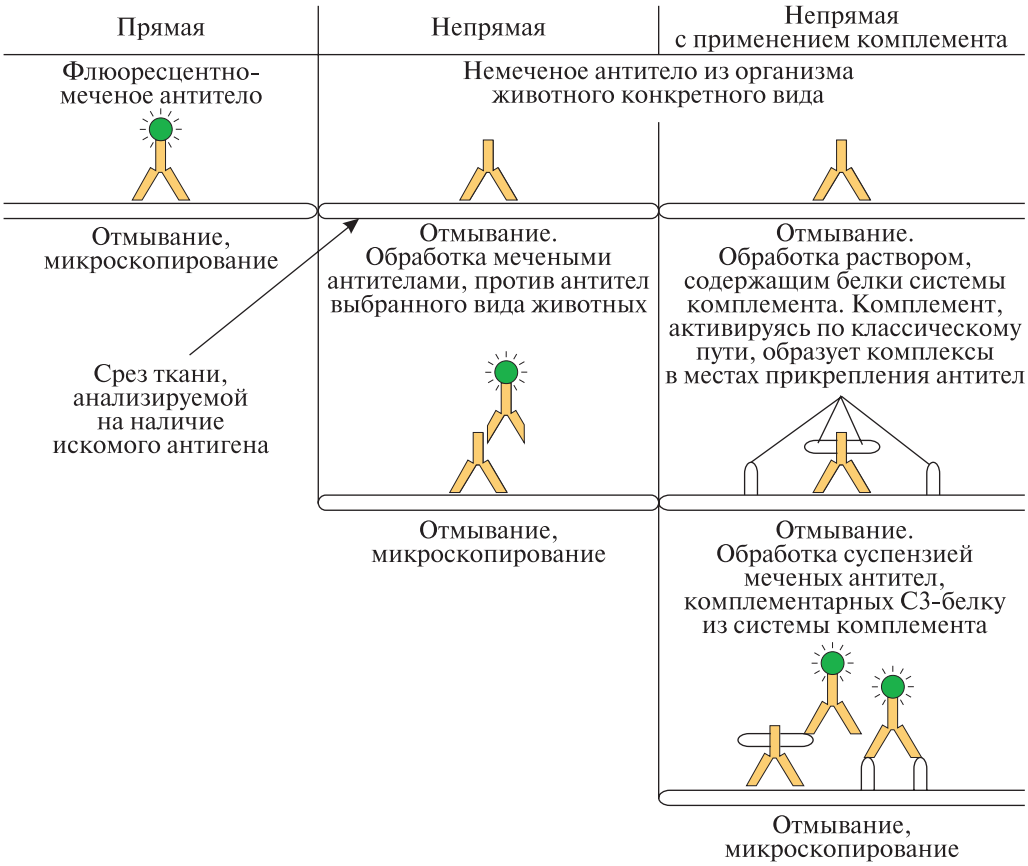


Рис. 66. Основные варианты метода иммунофлюоресценции (по I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, 1989)

Третий вариант – **непрямая иммунофлюоресценция с применением комплемента** – основан на том, что при активации по классическому пути молекулы системы комплемента образуют комплексы именно там, где имеются закрепленные иммуноглобулины. В этом случае необходимы три этапа обработки препарата: «несветящимися» антителами, комплементом и конъюгированными с флюорохромом иммуноглобулинами, специфичными по отношению к белкам системы комплемента.

Иммунофлюоресценция позволила разработать уникальный по своим возможностям метод отбора нужных клеток из смешанных суспензий (рис. 67).

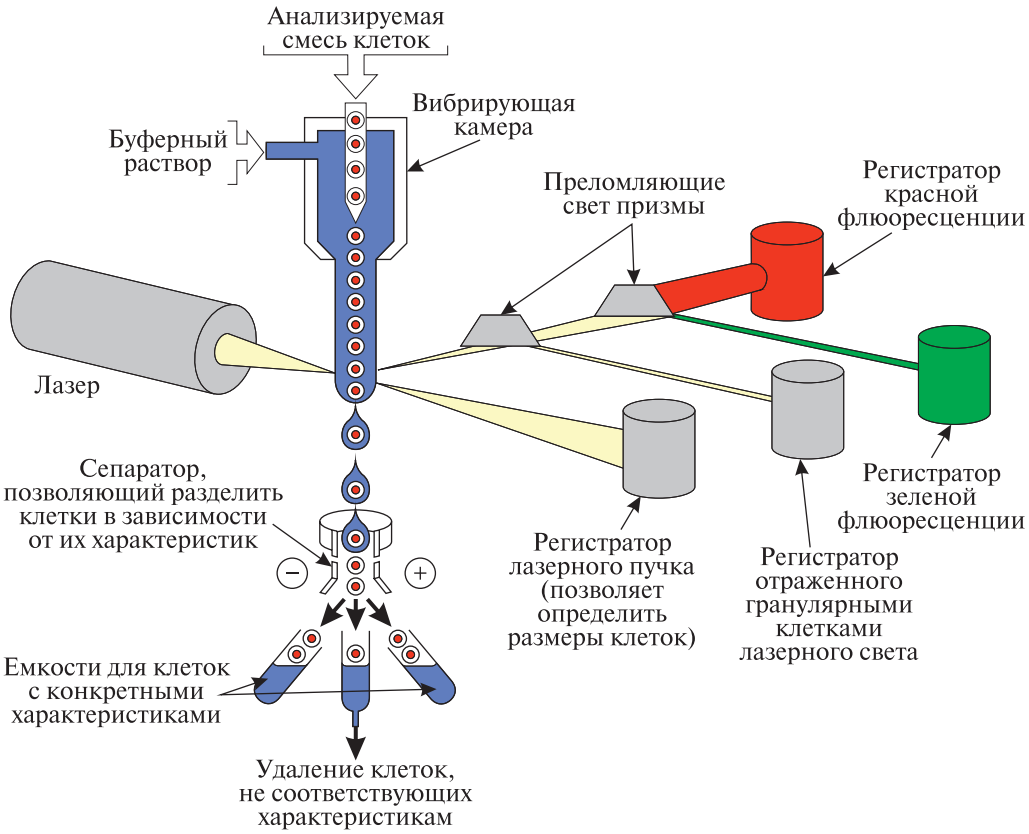


Рис. 67. Принципиальная схема работы клеточного сортера, работающего с применением флюоресцентно-меченых антител (по I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, 1989)

Такую суспензию (например, фракцию лейкоцитов крови человека) подвергают обработке иммуноглобулинами двух разных типов: одни из них комплементарны специфическому антигенному маркеру клеток определенной группы (например, Т-клеток) и мечены дающим при возбуждении зеленый свет флюорохромом, вторые – маркеру другой группы (например, В-лимфоцитов) и мечены флюорохромом, испускающим при возбуждении той же длиной волны красный свет. Затем смесь помещают в прибор FACS (от англ. fluorescence activated cell sorter), который в русскоязычном варианте чаще всего называют «лазерный проточный цитометр». Клетки в тонкой струе жидкости по одной пропускаются через луч лазера с длиной волны, возбуждающей свечение в конъюгированных с антителами флюорохромах. Сложная оптическая система прибора регистрирует сразу несколько параметров прошедшей через луч клетки: ее размеры, наличие цитоплазматических гранул и испускаемый свет. В зависимости от информации, поступившей из оптического блока в механический блок, сепаратор направит клетку с определенными характеристиками в нужный сосуд. Одновременно связанная с прибором компьютерная система регистрирует, сколько и каких клеток было проана-

лизировано, что позволяет кроме сортировки получить количественные данные о составе изучаемой суспензии.

Недостатками реакций иммунофлюоресценции являются невозможность их применения к объектам, молекулы которых могут флюоресцировать, и невысокая точность определения количеств анализируемых антигенов.

4.7. РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Эта группа реакций считается самой чувствительной и высокоточной в количественном отношении. В таких реакциях применяют радиоактивно меченые антитела или антигены. В качестве радиоактивной метки чаще всего используют хорошо связывающиеся с белками изотопы иода (I^{131} и I^{125}) для антител и изотопы водорода (H^3) и фосфора (P^{32}) для антигенов небелковой природы. Технические возможности измерения радиоактивного излучения позволяют с помощью радиоиммунологического анализа (РИА) обнаруживать в моче, крови, экссудатах антигены, присутствующие в пикограммовых количествах и не тестируемые вследствие этого химическими методами.

Одним из примеров применения РИА могут служить методики, разработанные для тестирования аллергических состояний у человека. Метод RAST (от англ. **r**adio**a**llergo**s**orbent **t**est) позволяет определить наличие и количество IgE, специфичных к конкретному аллергену, в сыворотке крови (рис. 68).

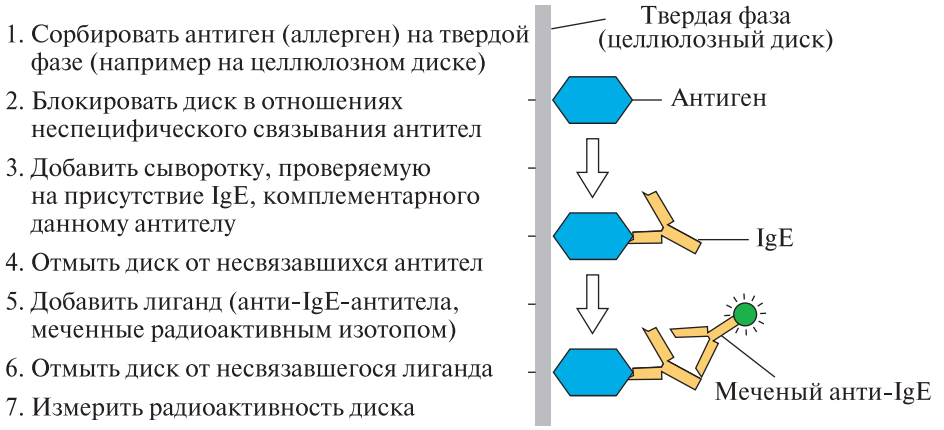


Рис. 68. Принципиальная схема метода RAST (по I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, 1989)

Для этого покрытый молекулами аллергена и защищенный от неспецифического осаждения белков твердый носитель обрабатывают анализируемой сывороткой, отмывают от не провзаимодействовавших с антигеном компонентов сыворотки и наносят на него суспензию меченых радиоактивным изотопом IgG, специфичных по отношению к IgE. После тщательного отмывания от несвязавшихся радиоактивных антител замеряют радиоактивность твердой фазы и делают пересчет на количество IgE.

Метод RIST (от англ. **r**adio**i**mmuno**s**orbent **t**est) позволяет определять общее количество иммуноглобулинов IgE независимо от их специфичности (рис. 69).

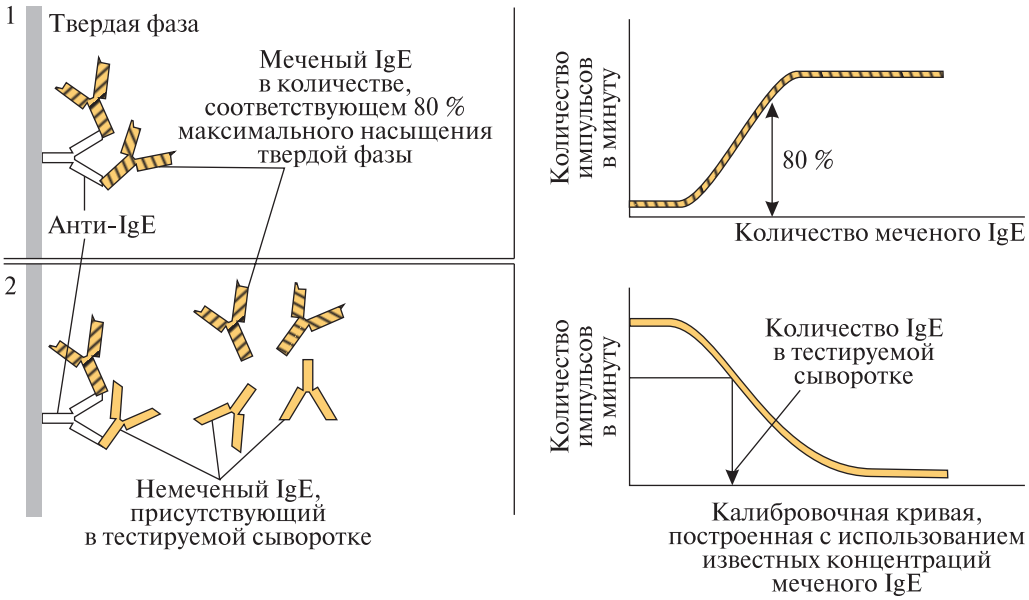


Рис. 69. Принципиальная схема метода RIST
(по I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, 1989)

В этом случае на твердом носителе закрепляется не антиген, а специфичные по отношению к иммуноглобулинам E иммуноглобулины G. Для такого твердого носителя определяют радиоактивность после обработки разными концентрациями меченых радиоактивным изотопом IgE и строят кривую, отражающую увеличение радиоактивности в зависимости от концентрации. Полученные значения радиоактивности служат точкой отсчета для проведения анализа. Для анализа смешивают тестируемую сыворотку крови с количеством радиоактивных антител, соответствующим 80 % насыщения твердой фазы при добавлении только меченых антител, и обрабатывают этой смесью носитель. В данном случае будет реализовываться так называемый принцип конкуренции. Меченые и немеченые IgE будут конкурировать за взаимодействие с закрепленными на носителе иммуноглобулинами G, что приведет к снижению радиоактивности носителя по сравнению с обработкой только радиоактивными антителами. Используя соответствующую калибровочную кривую, можно с высокой точностью определить количество нерадиоактивных IgE в анализируемой сыворотке.

В настоящее время существует много вариантов использования РИА, но их обычно применяют только в тех случаях, когда другие методы исследования не позволяют получить желаемый результат. Это связано с обязательным соблюдением мер безопасности, необходимых при работе с радиоактивными веществами, что и ограничивает широкое применение РИА.

4.8. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Реакции этой группы ненамного уступают в точности и разрешающей способности РИА, но зато безопасны. В силу этого иммуноферментный анализ (ИФА) в настоящее время получил наибольшее распространение. В основе этих реакций лежит применение антител (реже антигенов), конъюгированных с ферментами, которые способны обеспечить превращение неокрашенного вещества (хромогена) в окрашенное. Наиболее часто применяют для таких целей ферменты, сохраняющие активность в относительно широком диапазоне условий доступные и дешевые ферменты из растений (пероксидаза хрена) и бактерий (щелочная фосфатаза и β-D-галактозидаза).

Субстратом для пероксидазы является перекись водорода, которая сама по себе, естественно, не может давать окрашенных продуктов реакции. По этой причине так называемые хромогенные смеси для пероксидазы помимо H_2O_2 в определенных концентрациях содержат собственно хромоген, который, окисляясь образующимся при распаде перекиси атомарным кислородом, и будет давать окрашивание. Чаще всего в качестве хромогенов выступают вещества, продукты окисления которых имеют желтый (ортофенилендиамин и др.) или синий (тетраметилбензидин и др.) цвет, поскольку эти цвета лучше регистрируются спектрофотометрически. Недостаток применения пероксидазы – необходимость готовить субстратную смесь незадолго до применения из-за нестабильности перекиси в растворах.

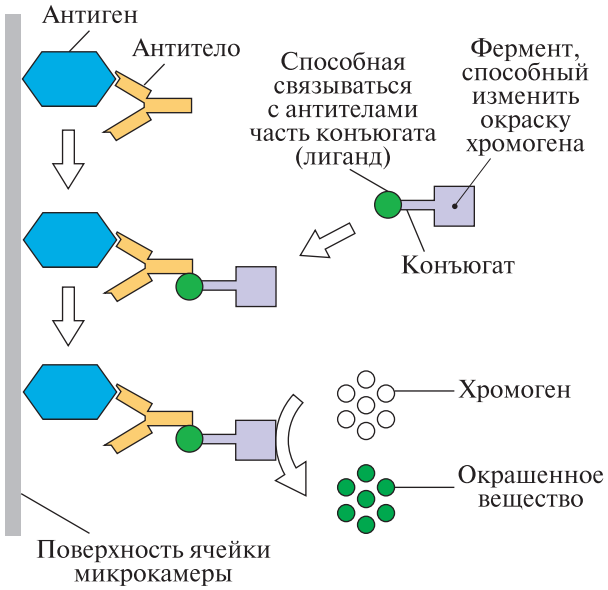
Субстратами для ферментов бактериального происхождения являются дающие синее окрашивание паранитрофенилфосфат для щелочной фосфатазы и паранитрофенил-β-D-галактозид для β-D-галактозидазы.

К преимуществам иммуноферментного анализа относятся его высокая разрешающая способность (можно обнаруживать антиген, присутствующий в нанограммовых количествах), возможность проведения реакций в очень небольших объемах и быстрота получения результатов. То, что интенсивность окрашивания раствора пропорциональна количеству фермента, делает ИФА не только качественным, но и высокоточным количественным методом, поскольку с помощью фотоколориметров или спектрофотометров можно регистрировать очень небольшие различия в интенсивности окрашивания.

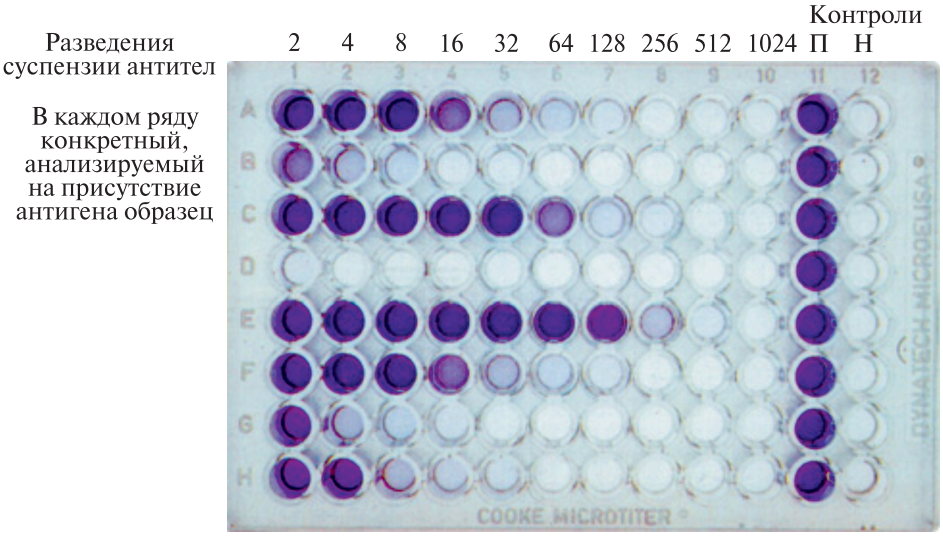
Особенностью ИФА является осуществление двух различных типов химических реакций: взаимодействия антиген – антитело и взаимодействия фермент – субстрат. Если оба типа реакций удается провести в одной и той же смеси растворов, такой вариант иммуноферментных реакций относят к гомогенному ИФА. Если для проведения иммунологических и ферментативных реакций требуются различные условия, реакции разделяют во времени, удаляя предшествующие растворы и заменяя их на последующие. Этот вариант известен как гетерогенный, или твердофазный, ИФА. Последнее название отнюдь не случайно – именно сорбируя на твердой фазе образующиеся иммунные комплексы, и удается эффективно менять одни растворы на другие. Хотя твердофазный ИФА требует большего количества этапов и, соответственно, более продолжителен в постановке, точность и возможность выявления различных по своей природе антигенов сделали его наи-

более распространенным. Подавляющее большинство применяемых в настоящее время методик ИФА базируются именно на нем.

В качестве твердой фазы используют инертные в химическом отношении материалы синтетического (полистирол, полипропилен, поливинилхлорид, нейлон,



а



б

Рис. 70. Один из вариантов твердофазного иммуноферментного анализа (на примере Enzyme linked immunosorbent assay):
а – принцип постановки; *б* – фотография микрокамеры, в которой осуществляется анализ (по I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, 1989). Пояснения приводятся в основном тексте

полиакриламид) или природного (целлюлоза и ее производные, декстраны, агароза) происхождения. В определенных вариантах ИФА в качестве твердой фазы выступают стенки или дно емкостей, в которых осуществляются реакции. Если такой вариант метода является количественным, используемый как твердая фаза материал должен быть прозрачным, что позволяет снимать показания с помощью спектрофотометров.

Одним из наиболее разработанных и точных современных вариантов твердофазного ИФА является ELISA (от англ. **e**nzyme-**l**inked **i**mmuno-**s**orbent **a**ssay), осуществляемый по изложенному на рис. 70 принципу. Для его постановки используются полистироловые прозрачные планшеты (микрокамеры для иммунологических реакций) с имеющими плоское дно лунками. Размеры планшетов, количество и объемы лунок могут различаться, но во всех случаях реакции ставятся в небольших (от 20 до 1000 мкл) объемах, что повышает экономичность метода. Среди обязательных компонентов ELISA – многоканальный автоматический спектрофотометр и приданная ему компьютерная система, позволяющая управлять работой прибора и обрабатывать полученные данные.

Фирмы-поставщики таких систем обеспечивают всеми необходимыми для выявления конкретных антигенов реагентами, а также инструкциями по проведению всех этапов анализа. Такой набор включает и растворы, необходимые для постановки в каждой серии опытов положительных и отрицательных контролей, нужных для подтверждения достоверности полученных результатов.

Собственно принцип ELISA заключается в следующем. Анализируемый раствор вносится в лунки планшета и выдерживается время, необходимое для сорбции антигена на стенки и дно лунки. Затем раствор удаляется, лунки промываются от несорбированных компонентов, и туда вносится суспензия специфичных по отношению к искомому антигену антител. После отпущенного на взаимодействие антиген – антитело времени суспензия удаляется, лунки отмываются от несвязавшихся антител и заполняются раствором конъюгата (конъюгированного с ферментом лиганда). В качестве лиганда (способного химически связываться с антителами вещества) чаще всего используются также иммуноглобулины, но уже специфичные к антителам, использованным на первом этапе (антииммуноглобулины). Через определенное время проводятся отмывание от несвязавшегося конъюгата и внесение субстратной смеси. По истечении рекомендованного разработчиками времени реакция останавливается путем добавления определенных веществ, так называемых стоп-реагентов. В качестве стоп-реагентов чаще всего используются сильные кислоты или щелочи, денатурирующие фермент, но не изменяющие окраску полученного раствора. После этого проводится автоматическое измерение интенсивности окрашивания раствора в опытных и контрольных лунках. Полученные данные обрабатываются приданной компьютерной системой, которая сообщает о наличии и количестве искомого антигена в анализируемых пробах.

Еще одним современным методом исследования, основанным на сочетании электрофореза и применении меченых тем или иным образом антител, является иммуноблотинг.

4.9. ИММУНОБЛОТИНГ (WESTERN-АНАЛИЗ)

Суть этого метода, применяемого для идентификации белков, заключается в следующем. Содержащие белки суспензии подвергают электрофорезу в соответствующем геле. Затем на гелевую пластинку накладывают пластинку из сорбирующего пористого материала (чаще всего целлюлозный или нитроцеллюлозный фильтр) и создают условия для переноса на нее белков из геля. В силу того что перенос происходит за счет естественной или усиленной тем или иным способом диффузии в направлении гель – фильтр, расположение мест сорбции белков на фильтре будет соответствовать их положению в геле после фореза. Фактически такой перенос на фильтр необходим для улучшения условий обработки анализируемых белков мечеными антителами. Манипулируя с фильтром, легче создать условия для взаимодействия антиген – антитело, легче отмывать от несвязавшихся антител и, главное, визуализировать результаты. В зависимости от желания и возможностей исследователя можно применить любой современный вариант визуализации – РИФ, ИФА или РИА (рис. 71).

В первом случае обнаружить искомый антиген можно будет, просматривая обработанный фильтр под источником света соответствующей длины волны. Нужная

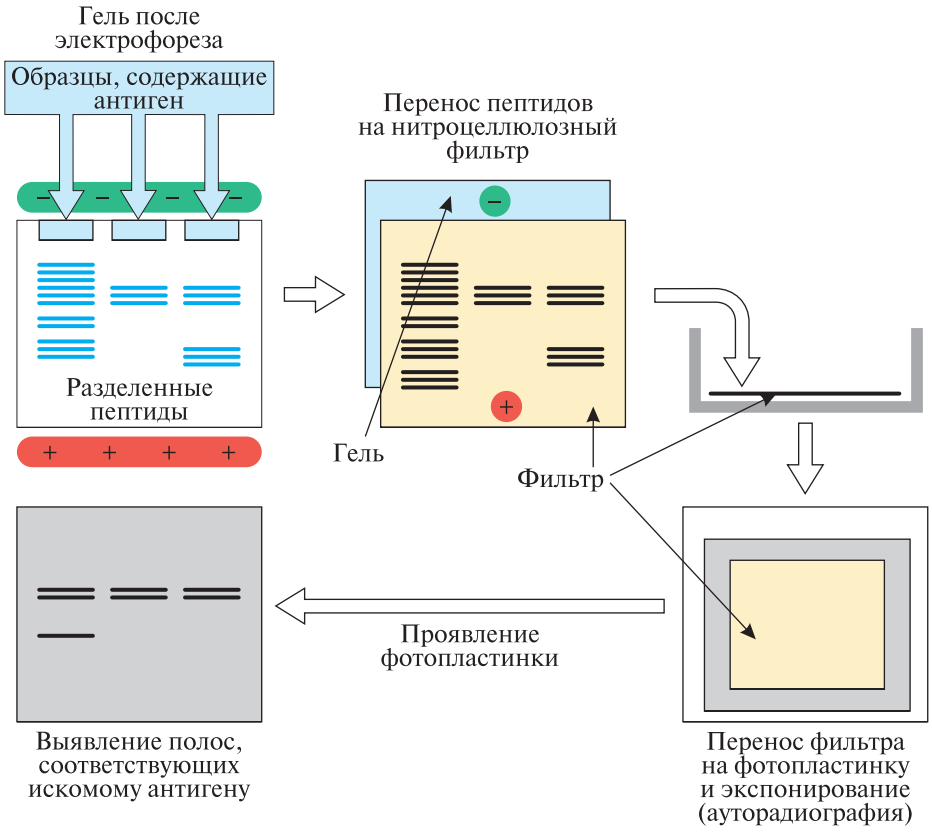


Рис. 71. Схема проведения иммуноблотинга (Western-анализа) (по I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, 1989)

полоса будет флюоресцировать. Во втором случае в месте локализации антигена на белом фильтре будет визуально регистрироваться окрашенное пятно.

Для выявления результатов при применении радиоактивно меченых антител необходимо совместить фильтр с фотопластинкой, после экспонирования и проявления которой на месте, соответствующем расположению антигена на фильтре, будет темное пятно засвеченной фотоэмульсии.

Заканчивая этот раздел пособия, хочется еще раз подчеркнуть, что выбор конкретного метода исследования с применением антител определяется спецификой проводимых исследований и возможностями их осуществления в реальных условиях. Кроме того, следует учитывать, что эти методы во многих случаях требуют тщательной подготовки и значительных финансовых затрат.

5 ИММУНОДЕФИЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА

В широком смысле иммунодефицитами можно называть любые имеющие длительный характер нарушения нормального функционирования иммунной системы, которые приводят к выраженному снижению уровня защиты от чужеродных антигенов или же к проявлениям аутоиммунных патологических состояний. Во многих случаях при таких нарушениях имеет место сочетание двух обозначенных эффектов, что делает достаточно условным существующее пока разделение на иммунодефициты и иммунопатологии.

В свою очередь, разграничение иммунодефицитов на врожденные (первичные) и приобретенные (вторичные) также не является, по сути, абсолютным. Как правило, в основе и проявляющихся от рождения, и приобретаемых в течение жизни нарушений иммунного статуса лежат изменения генетического материала, только во втором случае они обуславливают предрасположенность к развитию иммунодефицита под влиянием экзогенных или эндогенных факторов. Однако в клинической практике определенные проявления иммунодефицитов описаны как конкретные болезни еще до того, как были выяснены их причины, поэтому в медицинской литературе и клинике пока сохраняется разделение на иммунодефицитные заболевания и иммунопатологии.

С 2008 г. специальным комитетом по первичным иммунодефицитам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) они разделены на восемь групп.

К группе 1 относятся комбинированные Т- и В-клеточные иммунодефициты, которые связаны с нарушением развития лимфоидных клеток (рис. 72). Одним из проявлений иммунодефицитов этой группы является **тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИД)**, который часто называют **тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью** (ТКИН, в англ. аббревиатуре SCID – **S**evere **c**ombined **i**mmune **d**eficiency). Как показали исследования конца XX – начала XXI в., к сходным клиническим проявлениям могут приводить различные изменения на генетическом уровне.

Например, три варианта ТКИН, характеризующиеся отсутствием Т-лимфоцитов и NK-клеток со всеми вытекающими отсюда последствиями, возникают в результате мутаций, происходящих в различных областях генома.

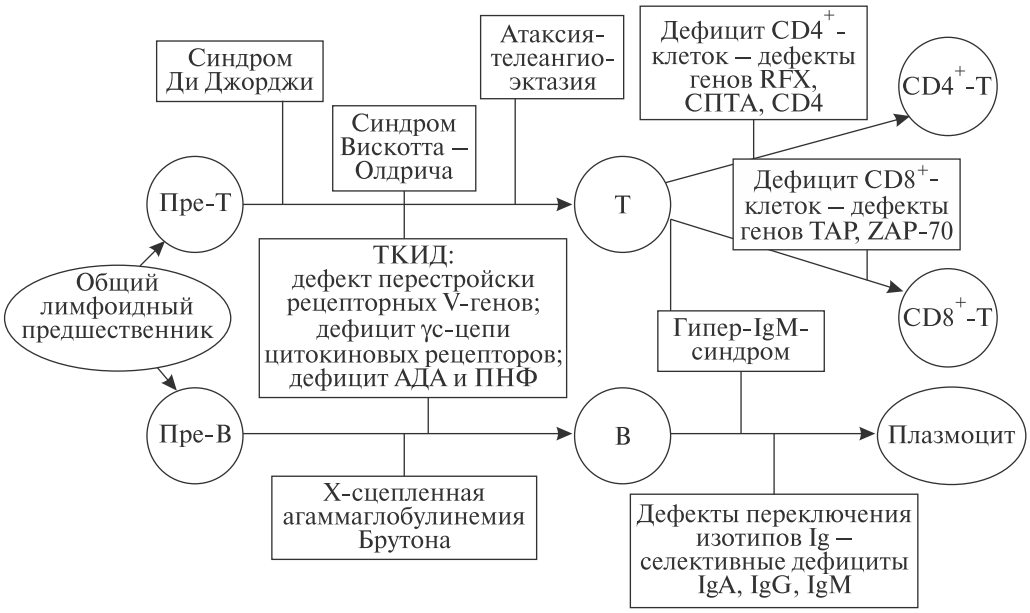


Рис. 72. Соотношение этапов развития клеток адаптивного иммунитета и генетических нарушений, приводящих к первичным иммунодефицитам (по А. А. Ярилину, 2010)

Первый вариант – **Х-сцепленная ТКИН**, связанная с дефицитом γ(c)-цепи рецепторов для интерлейкинов. Эта цепь входит в состав рецепторов для интерлейкинов IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21. Собственно к остановке развития предшественников лимфоцитов приводит отсутствие рецепторов для интерлейкина-7, и у мышей при такого рода мутации отсутствуют Т-, В- и NK-клетки. Однако у человека другие интерлейкины могут заменить действие IL-7 при развитии В-лимфоцитов, поэтому формула такого иммунодефицита у человека $T^-B^+NK^-$.

Сигнал от рецептора для IL-7 передается внутриклеточно с обязательным участием тирозинкиназы Jak3, одной из семейства Janus-ассоциированных киназ (Janus-associated family kinases), которая обладает сродством именно к γ(c)-цепи. В связи с этим еще одним вариантом ТКИН является **дефицит тирозинкиназы Jak3**. При мутациях, локализованных в кодирующем эту киназу гене JAK3, наблюдается практически такое же изменение формулы крови, как при Х-сцепленной ТКИН, однако указанный ген не находится в Х-хромосоме, поэтому проявляется этот иммунодефицит не только у мальчиков.

Третий вариант ТКИН, по клиническим проявлениям не отличимый от двух вышеописанных, связан с **мутациями в гене IL7RA**, кодирующем вторую белковую цепь (α-цепь) рецептора для интерлейкина-7. Отсутствие этого белка на поверхности предшественников лимфоцитов также не позволяет им дальше дифференцироваться, что приводит к остановке развития Т-лимфоцитов и NK-клеток.

Первичный тяжелый комбинированный иммунодефицит, приводящий к отсутствию Т- и В-лимфоцитов при неизменяющемся количестве NK-клеток, связан с **дефицитом ферментов RAG-1** и **RAG-2**. При мутациях в соответствующих генах RAG1 или RAG2 у зреющих Т- и В-лимфоцитов не осуществляются рекомбина-

ционные перестройки в кластерах V-, D- и J-генов, необходимые для формирования μ-цепей BCR и β-цепи TCR – рецепторов для распознавания антигенов. Как известно, формирование антигенраспознающих рецепторов лимфоцитов происходит поэтапно, и для перехода к следующему этапу – формированию легких цепей BCR и α-цепи TCR – необходим сигнал от уже вынесенных на наружную поверхность цитоплазматической мембраны молекул. При отсутствии такого сигнала пре-B- и пре-T-клетки останавливают свое развитие и переходят к апоптозу. Описанный в 1965 г. **синдром Оменна** имеет сходную генетическую основу – недавно установлено, что у пациентов с этим иммунодефицитом также имеются мутации в генах RAG1 или RAG2, но эффект этих мутаций не столь однозначен. Рекомбинационные процессы между V-, D- и J-генами в таких лимфоцитах частично осуществляются, что приводит к снижению числа функциональных T- и B-лимфоцитов, а не к их полному отсутствию.

Еще одним вариантом иммунодефицита с отсутствием T- и B-лимфоцитов является **дефицит ДНК-зависимой протеинкиназы.** Данный фермент необходим зреющим лимфоцитам также на этапе реаранжировки V-, D- и J-генов – он обеспечивает процесс объединения претерпевших двунитевой разрыв фрагментов ДНК в районах образования делеций. ДНК-зависимая протеинкиназа не является специализированным для происходящего в лимфоцитах процесса генетических рекомбинационных перестроек ферментом. Это подтверждается тем, что у организмов с подобными генетическими дефектами резко повышена чувствительность к радиоактивному облучению. Объяснение этому следующее: репарационные процессы, осуществляемые в поврежденных излучением участках ДНК, также идут с образованием делеций, в которых должна участвовать эта же ДНК-зависимая протеинкиназа.

Комбинированная иммунная недостаточность, при которой изменяется только T-клеточная составляющая формулы крови, связана с нарушениями развития тимуса как органа. При **синдроме Незелофа (дисгенезии тимуса)** из-за гипоплазии вилочковой железы уменьшается общее количество T-лимфоцитов и выраженность на T-лимфоцитах-эмигрантах молекул CD3 и CD4. Генетические нарушения, приводящие к подобному недоразвитию тимуса, пока точно не определены.

Ряд отклонений в развитии T-лимфоцитов связан с нарушениями происходящих в тимусе процессов формирования поверхностных молекул на зреющих предшественниках T-клеток. Одной из важнейших составляющих распознающего чужеродный антиген комплекса обоснованно следует считать состоящую из нескольких субъединиц молекулу CD3. Именно через нее при контакте TCR с фрагментом чужеродного антигена передается активирующий сигнал.

Генетическими дефектами, приводящими к **дефициту CD3**, являются мутации в генах CD3G и CD3E, кодирующих CD3γ- и CD3ε-цепи. Отсутствие или дефектность этих составляющих TCR-комплекса приводит к остановке созревания всех групп T-лимфоцитов.

Описаны также иммунодефициты, при которых нарушено развитие только $CD4^+$-T-лимфоцитов. Один из них связан с **дефицитом молекулы CD4**, определяемым мутациями в кодирующем эту молекулу гене. Лишенные нормального белка CD4 предшественники T-клеток при контакте с клетками тимуса в ходе процесса положительной селекции получают сигнал апоптоза. Практически к таким же результатам приводит и **дефицит молекул MHC-II** на поверхности клеток тиму-

са, с которыми в ходе положительной селекции должны взаимодействовать зреющие Т-клетки. Приводящие к дефициту MHC-II мутации обнаружены в генах CIITA, RFXANK, RFX5, RFXAP, и они существенно влияют не только на созревание Т-клеток с фенотипом $CD4^+$, но и на протекание связанных с участием молекул MHC-II процессов активации иммунокомпетентных клеток.

Нарушения развития $CD8^+$-клеток (Т-киллеров) связаны с **дефицитом белков TAP-1 и TAP-2**. При мутациях в генах TAP1 и TAP2 в клетках тимуса не происходит правильной «загрузки» белков MHC-I фрагментами антигенов, которые должны презентироваться в сочетании с этими белками. Из-за этого этап положительной селекции $CD8^+$-клеток не проходит должным образом, и они погибают, получив сигнал апоптоза. Процесс развития Т-киллеров прерывается и при **дефиците белка ZAP70**. Этот внутриклеточный белок представляет собой тирозинкиназу, которая передает сигналы от рецепторов на нижележащие ветви сигнальных каскадов при различных взаимодействиях клеток, в том числе и при контакте зреющих $CD8^+$-клеток с клетками тимуса. Считается, что при мутациях в гене ZAP70 при положительной селекции Т-клеток в тимусе предшественники Т-киллеров не получают останавливающего апоптоз сигнала, что и приводит к иммунодефициту с формулой $T(CD4^+\text{-}T^+\ CD8^+\text{-}T^-)B^+NK^+$.

С медицинской точки зрения к комбинированной иммунной недостаточности относят и иммунодефициты, связанные с нарушениями метаболизма азотистых оснований. ТКИН с формулой $T^-B^+NK^+$ возникает при **дефиците аденозиндезаминазы**. Мутации в гене ADA приводят к накоплению аденозина и дезоксиаденозина (блокируется их превращение в инозин и дезоксиинозин), что останавливает развитие Т-лимфоцитов. Сходный, но выраженный слабее эффект зафиксирован и при **дефиците пуриннуклеотидфосфорилазы**, обусловленном мутациями в гене PNP. В зреющих предшественниках Т-клеток не происходит превращения гуанозина в гуанин и инозина и дезоксиинозина в гипоксантин, что замедляет, но не полностью останавливает их развитие. Формула такого иммунодефицита $T^{\pm}B^+NK^+$.

Некоторые первичные иммунодефициты не рассматриваются с медицинской точки зрения как ТКИН, а классифицируются ВОЗ как группа 2 с названием «Преимущественные дефициты антител».

Одним из наиболее распространенных иммунодефицитов этой группы является **Х-сцепленная агаммаглобулинемия Брутона**. Мутации, приводящие к еще в 1952 г. описанной О. Брутоном болезни, сейчас локализованы в расположенном в Х-хромосоме гене BTK. Кодируемая этим геном тирозинкиназа btk (**B**ruton's **t**yrosine **k**inase) нужна для проведения сигнала от еще не полностью сформированного рецептора BCR, который характерен для предшественников В-лимфоцитов с фенотипом μ^+-пре-В-клетка. Сигнал, передаваемый с участием белка btk, необходим для вторичной активации генов RAG1 и RAG2 и начала реаранжировки V- и J-генов для последующего синтеза легких цепей иммуноглобулинов. При отсутствии этого сигнала развитие В-клеток останавливается, и они практически отсутствуют или содержатся в лимфоидных органах в очень малых количествах (формула иммунодефицита $T^+B^-NK^+$). Как результат этой В-лимфопении у пациентов наблюдается резко сниженное количество иммуноглобулинов всех классов.

Еще один вариант иммунодефицитов со сниженным количеством иммуноглобулинов всех классов условно называется **общей вариабельной иммунной недостаточностью (ОВИН)**. С момента первой постановки такого диагноза (1953 г.) и до насто-

ящего времени выяснилось, что причинами гипогаммаглобулинемии могут быть различные генетические изменения. В частности, на роль приводящих к ОВИН генетических нарушений претендуют мутации в генах TNFSF20, BLIMP1, ICOS. Первый из них кодирует рецептор для одного из белков семейства TNF – белка BAFF, являющегося фактором поддержания гомеостаза В-лимфоцитов. Второй выступает структурным геном внутриклеточного белка Blimp-1, который появляется в В-лимфоцитах для прекращения деления активированных в ходе иммунного ответа В-клеток и перехода их в антителопродуцирующие плазматические клетки. Ген ICOS кодирует один из индуцибельных поверхностных костимуляторов из семейства CD28, который появляется на Т-лимфоцитах во время их когнатного взаимодействия с В-лимфоцитами. Белок ICOS (от англ. **I**nducible **Cos**timulator) должен взаимодействовать с появляющимся на В-клетке лигандом для ICOS – молекулой ICOSL – для того, чтобы Т-лимфоцит начал продуцировать интерлейкин-10, необходимый для переключения продукции иммуноглобулинов с одного класса на другой. Этот же интерлейкин важен для финального этапа дифференцировки клеток активированного клона В-лимфоцитов на субклоны клеток памяти и плазматических клеток.

Считается также, что причиной ОВИН являются и мутации в гене, кодирующем белок CD19. Этот белок на поверхности зрелых В-лимфоцитов формирует комплекс с белками CD21, CD81 и CD225. Вместе с BCR этот комплекс влияет на антигензависимую активацию В-клеток, и при отсутствии CD19 резко снижается уровень гуморальных иммунных ответов на антигены.

Накопленные к настоящему времени данные позволяют предполагать, что гиппогаммаглобулинемия, не сопровождающаяся резким уменьшением количества В-лимфоцитов, может возникать как следствие нарушений сложного процесса антигензависимой активации и дифференциации В-клеток на последних этапах развития гуморальных иммунных ответов.

Помимо ОВИН, при которой снижено количество всех иммуноглобулинов, выявлены иммунодефициты, характеризующиеся отклонениями в соотношениях иммуноглобулинов различных классов. Одним из примеров таких состояний может быть **гипер-IgM-синдром** (сокращенно HIGM, от англ. **H**yper **IgM**-syndrome). У пациентов с таким диагнозом резко снижено количество антител других классов при нормальном или повышенном содержании IgM.

Главными причинами этого являются нарушения в передаче сигналов, поступающих в В-лимфоцит через пару молекул CD40 и CD154 при контакте с Т-хелперами подтипа 2. Основанием для такого объяснения развития иммунодефицитов этой подгруппы служат обнаруженные у ряда пациентов мутации.

Одни из них локализованы в расположенном в Х-хромосоме гене TNFSF5, от которого зависит образование лиганда для CD40 – молекулы CD154. Иммунодефицит с такими мутациями обозначен как HIGM1.

Х-сцепленной является также HIGM6 (HIGM-ED), в основе которой лежит отсутствие белка IKKγ (он же белок NEMO – от англ. **N**F-κB **E**ssential **Mo**dulator). Этот белок входит в состав киназы, осуществляющей фосфорилирование IκB – ингибитора активатора транскрипции NFκB. Фосфорилированный IκB отделяется от NFκB и отправляется в протеосомы для расщепления, а освободившийся NFκB проникает в ядро для активации соответствующих генов. Сигнал от молекулы CD40 передается по такому пути, поэтому при наличии нормальных молекул CD40 и CD154 костимуляции В-клеток не происходит.

Следует отметить, что второе название этого варианта – HIGM-ED – дано из-за сочетания иммунодефицита с ангидротической эктодермальной дисплазией, наследственным заболеванием, при котором наблюдается недоразвитие волосяных сумок, зубов, потовых желез и как следствие этого сухость кожи и повышенная температура тела. Вероятнее всего, нарушения в структуре Х-хромосомы могут захватывать и локус, ответственный за правильное развитие эктодермальных производных, и локус, кодирующий белок IKKγ.

Еще одно генетическое нарушение подтверждает важность взаимодействия CD40–CD154 для нормальной активации В-клеток. У пациентов с мутациями в гене, кодирующем непосредственно молекулу CD40, регистрируются изменения, сходные с теми, что характерны для HIGM1, но этот вариант обозначается как HIGM3 и наследуется аутосомно.

Другие генетические дефекты, приводящие к HIGM, также выявлены в аутосомах. Один из них, приводящий к HIGM2, связан с мутациями в гене AID, кодирующем активационно-индуцируемую цитидиндезаминазу. Этот фермент появляется в активированных В-лимфоцитах на стадии их пролиферации и дифференциации на субклоны и принимает участие в процессах переключения В-клеток с продукции иммуноглобулинов одного класса на другой. Кроме того, показано участие этой же цитидиндезаминазы в процессе гипермутагенеза, приводящего к увеличению аффинности антител. Еще одной причиной гипер-IgM-синдрома могут быть мутации в гене UNG, кодирующем урацил-N-гликозилазу, задействованную в процессах переключения классов иммуноглобулинов на более позднем, чем цитидиндезаминаза, этапе. В этом случае, обозначенном HIGM4, обеспечивающий возрастание аффинности гипермутагенез не затронут.

Из иммунодефицитов, характеризующихся изменением количества антител только одного класса, описаны **селективный дефицит IgA** и **гипер-IgE-синдром (синдром Иова)**, но генетические дефекты, приводящие к ним, пока точно не установлены.

Первый из них, вероятно, может быть обусловлен как нарушениями процесса переключения классов иммуноглобулинов, так и недоразвитием уже прошедших переключение на этот класс В-лимфоцитов. У пациентов с такой болезнью часто обнаруживаются изменения в продукции TGFβ1 – трансформирующего фактора роста, от которого зависит развитие многих типов клеток соединительных и эпителиальных тканей, но доказательств, указывающих на связь TGFβ1 с дефицитом IgA, пока не получено.

В отношении причин гипер-IgE-синдрома есть указания на то, что к развитию одного из его вариантов может иметь дефицит тирозинкиназы Tyk-2 из семейства Janus-киназ (Jak). Эта киназа задействована в сигнальных путях, идущих от рецепторов для цитокинов IL-6, IL-10, IL-12, IL-23 и интерферонов типа I, но почему ее дефицит приводит к усилению продукции IgE, остается неизвестным. Установлено также, что у некоторых пациентов с таким синдромом имеется мутация в гене STAT3, кодирующем сигнальный белок с функциями активатора транскрипции.

Группа 3 называется «Синдромы иммунодефицитов с хорошо охарактеризованными клиническими признаками». Одним из заболеваний этой группы является **атаксия-телеангиэктазия (синдром Луи – Бар)**. Первое описание такого состояния было сделано в 1941 г., но только в 1995-м удалось связать болезнь с му-

тациями в гене, расположенном в длинном плече 11-й хромосомы. Этот ген получил название ATM от наименования болезни (**A**taxia **t**elangiectasia **m**utated), но сейчас известно, что его продукт – серинтреониновая протеинкиназа, которая обеспечивает активацию белков, необходимых для репарации двунитевых разрывов в ДНК. Поэтому при дефиците этого белка в клетках, в которых в процессах их развития и функционирования должны осуществляться хромосомные перестройки, не происходит восстановления ДНК и запускается процесс апоптоза. Это и приводит к дегенеративным изменениям в нервной, кровеносной, эндокринной и других системах организма. На уровне иммунной системы из-за хромосомных перестроек при формировании антигенраспознающих рецепторов Т- и В-лимфоцитов наблюдаются отклонения в развитии этих клеток, причем при определенных вариантах синдрома Луи – Бар больше страдает Т-клеточная составляющая. Это объясняется тем, что при этих вариантах синдрома наблюдается гипоплазия или даже аплазия тимуса как органа. Уже как следствия нарушений в развитии клеток проявляется гипогаммаглобуленемия с различными вариантами дисбаланса по классам иммуноглобулинов.

Синдром Ниймеген, названный так по месту его первого выявления (описан в голландском городе Ниймеген в 1981 г.), также основан на нарушениях процессов репарации ДНК, но ген NBS1, мутации в котором приводят к болезни, расположен в 8-й хромосоме. Продуктом этого гена является белок нибрин, который входит в осуществляющий процесс репарации ДНК белковый комплекс. Последствия дефектов в гене NBS1(сейчас он переименован в NBN) для иммунной системы сходны с таковыми для синдрома Луи – Бар.

Синдром Вискотта – Олдрича описывался дважды: А. Вискоттом в 1937 г. в Германии и в 1954 г. в США Р. Олдричем, чьи исследования показали наследуемость этого отклонения по Х-сцепленному рецессивному типу. Ген, в пределах которого локализуются дающие синдром мутации, и кодируемый им белок названы по синдрому – WASP (**W**iscott – **A**ldrich **S**yndrome **P**rotein). Функционально этот белок является регулятором перестроек цитоскелета, влияя на процесс полимеризации актина. Для клеток иммунной системы связанные с перестройками цитоскелета процессы имеют особое значение, поскольку от них зависят хемотаксис, образование фагосом при фагоцитозе, слияние лизосом с фагосомами, а в индуцибельных защитных реакциях – формирование контактных комплексов при взаимодействии антигенпредставляющих клеток и Т-лимфоцитов. По этой причине в зависимости от варианта синдрома у пациентов в различных комбинациях проявляются снижение иммунного статуса, широкий спектр аутоиммунных патологических состояний, возможно развитие индуцированных вирусом Эпштейна – Барр лимфом.

Синдром Ди Джорджи, описанный впервые в 1965 г., с точки зрения его иммунологической составляющей представляет четко выраженный Т-клеточный иммунодефицит (формула $T^-B^+NK^+$). Отсутствие Т-лимфоцитов объясняется гипоплазией или полным неразвитием тимуса, причиной которых является неправильная инвагинация жаберных дуг (третьего и четвертого глоточных карманов) на зародышевой стадии. Установлено, что это отклонение в развитии определяется мутациями (или полным удалением при делеции) гена Tbx1, расположенного в 22-й хромосоме. Этот ген кодирует транскрипционный фактор Т-box1, определяющий инициацию указанного выше этапа зародышевого развития.

В группу 4 «Генетические нарушения регуляции иммунитета» попадают иммунодефициты, при которых нарушены не процессы образования и развития иммунокомпетентных клеток, а характер их функционирования.

Одним из таких иммунодефицитов является **семейный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз**, часто обозначаемый FHL (от англ. **F**amilial **H**emophagocytic **L**ymphohistiocytosis). Описаны четыре формы этого заболевания, связанные с различными нарушениями одного и того же процесса – цитотоксического действия Т-киллеров и NK-клеток на клетки-мишени. Три из них соотнесены с конкретными генами и их белковыми продуктами.

Форма FHL-2 возникает при мутациях в расположенном в 10-й хромосоме гене PRF1, кодирующем белок перфорин-1, который является одним из гуморальных факторов воздействия киллеров на мишень. Мутации в находящемся в 17-й хромосоме гене UNC13D, кодирующем белок Munc 13-4, блокируют процесс экзоцитоза, в ходе которого киллеры выделяют гуморальные факторы воздействия. Развивающаяся при этом форма иммунодефицита обозначена как FHL-3. С геном UNC13D связано еще одно нарушение нормального физиологического состояния, рассматриваемое как аутоиммунопатологическое. Это синдром повышенной активации макрофагов, в ряде случаев приводящий к системному ювенильному идиопатическому артриту.

Вариант FHL-4 представляет собой дефицит белка p14. От этого белка, предположительно, зависит правильное формирование тех компартментов эндоплазматической сети, из которых формируются везикулы, используемые для экзоцитоза. При этой форме иммунодефицита киллерные клетки не способны вовремя выделять гуморальные факторы воздействия на мишень.

Еще один иммунодефицит связан с нарушением нормального формирования внутриклеточных везикул. Это **синдром Чедиака – Хигаси** (независимо описан в 1952 г. французским медиком М. Чедиаком и в 1954 г. японским исследователем О. Хигаси), при котором в различных клетках организма формируются увеличенные везикулы (гигантские гранулы), в том числе и клетках, синтезирующих меланин. Отсюда основным внешним симптомом является приближающаяся к полному альбинизму гипопигментация кожи, волос, радужки глаз, и как следствие этого – светобоязнь и ухудшенное зрение.

На уровне иммунной системы болезнь проявляется в нарушениях функций иммунокомпетентных клеток, в жизнедеятельности которых необходимый этап – выведение из клетки каких-либо веществ. К таковым относятся фагоциты, Т-киллеры и NK-клетки, все клетки, активно экспрессирующие белки главного комплекса гистосовместимости класса II. Эти изменения объясняются мутациями в гене LYST (от англ. **Lys**osomal **t**rafficking regulator), расположенном в 1-й хромосоме и имеющем второе название CHS1 (от англ. **C**hediak – **H**igashi **s**yndrome). Продукт этого гена влияет на внутриклеточное перемещение мембранных везикул, но точная его роль пока не определена.

Отдельным заболеванием со сходными нарушениями в пигментации кожи считается и **синдром Грисцелли второго типа (GSII)**. К этому синдрому приводят мутации в расположенном в 15-й хромосоме гене MYO5A (продукт гена – миозин 5a), в гене этой же хромосомы RAB27A (продукт гена – миозин 5) и в гене MLPH, кодирующем меланофилин. Все три белка имеют отношение к внутрикле-

точному транспорту мембранных везикул, причем кодирующие их гены экспрессируются не только в меланоцитах, но и в лейкоцитах, поскольку у людей с синдромом Грисцелли наблюдается выраженный иммунодефицит.

Похожим по внешним проявлениям и по наличию иммунодефицита на вышеописанные синдромы является **синдром Германски – Пудлака.** У пациентов с этим диагнозом обнаружены нарушения в генах, расположенных в хромосомах 3, 5, 6, 10, 11, 15, 19 и 22. Такое разнообразие генов указывает на то, что процесс транспорта мембранных везикул сложен и требует участия многих функциональных и регуляторных белков (рис. 73). Изучение этого процесса активно продолжается, и приведенная на рисунке схема, несомненно, будет пополнена в ближайшие годы.

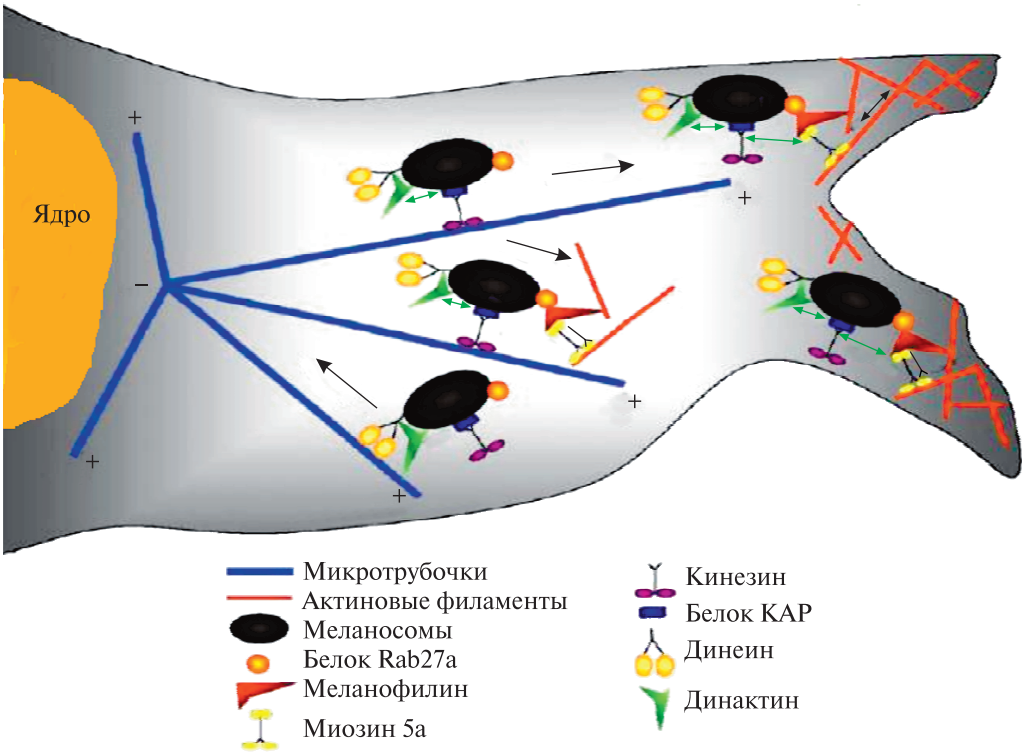


Рис. 73. Транспорт мембранных везикул на примере секреции меланина

Еще одним регуляторным иммунодефицитом является **X-сцепленный лимфопролиферативный синдром** (синдром Пуртильо, болезнь Дункан). Описаны две разновидности этого заболевания. Одна развивается при мутациях в расположенном в длинном плече X-хромосомы гене SH2D1A, кодирующем белок SAP. Этот белок входит в сигнальный путь, идущий от рецепторов семейства SLAM (**S**ygnaling **l**ymphocytic **a**ctivation **m**olecule). Такие рецепторы задействованы в процессах активации Т-лимфоцитов и NK-клеток и их взаимодействии с В-лимфоцитами. Как один из эффектов такого нарушения проявляется снижение уровня цитотоксичности киллерных клеток по отношению к клеткам-мишеням. Поэтому при инфицировании В-лимфоцитов вирусом Эпштейна – Барр не происходит их уничтоже-

ние киллерами, а начинается вызванное вирусом массовое размножение В-клеток (поликлональная лимфопролиферация). Как результат этого у больных резко снижается уровень гуморальных иммунных ответов на различные антигены (развивается дисиммуноглобулинемия, т. е. падает титр нужных для защиты от различных инфекций иммуноглобулинов).

Приблизительно к такой же клинической картине приводит и вторая разновидность Х-сцепленного лимфопролиферативного синдрома, базирующаяся на мутациях в гене ингибитора белков апоптоза XIAP (**X**-chromosome-linked **i**nhibitor of **a**poptosis **p**rotein).

На нарушениях регуляции процессов апоптоза основан еще один первичный иммунодефицит – **аутоиммунный лимфопролиферативный синдром**. Со времени первого описания таких состояний в 1967 г. и до 1976 г. этот синдром не считали иммунодефицитом, а рассматривали, исходя из клинических проявлений, как аутоиммунное заболевание. Основой для этого служили такие симптомы, как хронические гиперплазии лимфоидной ткани в лимфатических узлах, селезенке, печени, а также анемия, тромбоцитопения и нейтропения, аутоиммунный гепатит, тиреоидит, гломерулонефрит. Однако выяснение причин этих различных аутоиммунных проявлений показало, что они связаны с нарушениями апоптоза лимфоцитов, который должен происходить и на определенных стадиях их развития, и в процессах их функционирования (рис. 74).

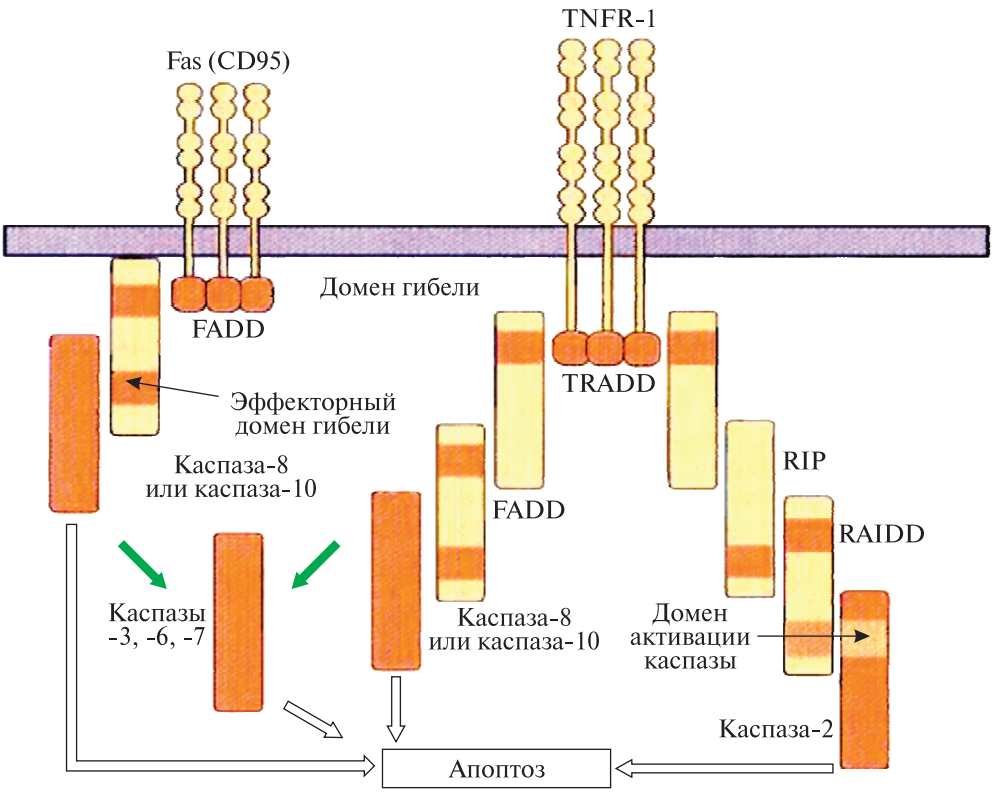


Рис. 74. Одна из схем развития апоптоза, учитывающая участие каспазы-8 и каспазы-10 (по Л. В. Ковальчук, Л. В. Ганковская, Р. Я. Мешкова, 2011)

Апоптоз нарушается из-за дефектов либо в гене TNFRSF6, кодирующем белок CD95 (Fas-рецептор – белок, воспринимающий внешние сигналы апоптоза), либо в гене, кодирующем белок CD178, более известный как Fas-лиганд (FasL).

Имеются данные о наличии у некоторых пациентов с данным синдромом мутаций в генах, кодирующих каспазу-8 или каспазу-10. Каспазы (цистеин-аспарагиновые протеазы) осуществляют передачу сигналов от рецепторов на поверхности клетки (в частности, Fas-рецептора), т. е. фактически участвуют в запуске внутриклеточных процессов, приводящих клетку к гибели.

Отсутствие или дефектность каспаз предотвращает апоптоз даже при нормальном состоянии внешних рецепторов сигналов апоптоза и их лигандов, имеющихся на других клетках. И в этом случае получается тот же результат – не удаляются те клетки, присутствие которых уже нежелательно для организма.

На уровне иммунной системы изменения связаны с гиперпролиферацией лимфоцитов и, вероятно, как следствие этого, гипериммуноглобулинемией, а также накоплением во вторичных лимфоидных органах $CD3^+CD4^-$ $CD8^-$ Т-клеток – «недозрелых» лимфоцитов.

Одним из наиболее тяжелых связанных с нарушениями регуляции иммунных процессов иммунодефицитом является **X-сцепленный синдром дисрегуляции иммунитета, полиэндокринопатии и энтеропатии**, сокращенно **IPEX-синдром** (**I**mmune disregulation, **p**olyendocrinopathy, **e**nteropathy **X**-linked syndrome). Развивающиеся при этом состоянии тяжелые поражения эндокринных органов, кишечника и половой системы – результат множества различных аутоиммунных процессов. У пациентов с таким синдромом повышена также чувствительность к пищевым и ряду других аллергенов, реализующаяся по типу гиперчувствительности первого типа (имеет место гипериммуноглобулинемия Е).

В это же время защита от возбудителей инфекционных заболеваний падает до крайне низкого уровня, что и приводит носителей синдрома к смерти, чаще всего в первый год жизни. Считается, что данное заболевание является следствием мутации в гене FOXP3, продукт которого необходим для правильного развития особой группы $CD4^+$Т-лимфоцитов – регуляторных клеток T_{REG}. Эти клетки также известны как Т-лимфоциты с фенотипом $CD4^+$ $CD25^+$ $FOXP3^+$, и от них зависит сдерживание активности лимфоцитов, обладающих рецепторами к собственным антигенам организма, и уровня пролиферации лимфоцитов при ответах на чужеродные антигены – одним из проявлений IPEX-синдрома является так называемая TCR-гиперотвечаемость на антигены. Фактически при этом синдроме имеет место выраженный дисбаланс всех индуцибельных проявлений иммунной системы, что и делает организм высокочувствительным к инфекционным заболеваниям. У таких пациентов безопасные для большинства людей с нормальным иммунным статусом так называемые оппортунистические патогены вызывают септические состояния с высоким процентом летальности.

Близок по своему характеру к IPEX-синдрому **синдром APECED** (от англ. **A**utoimmune **p**oly**e**ndocrinopathy with **c**andidiasis and **e**ctodermal **d**ystrophy) – аутоиммунная полиэндокринопатия с кандидозом и эктодермальной дистрофией, но основными железами, поражаемыми при этом заболевании, являются щитовидная железа, паращитовидные железы и надпочечники. Эти поражения связыва-

ют с отсутствием продукта гена AIRE (от англ. **A**uto**i**mmune **r**egulator), от которого зависит представление клетками тимуса органоспецифических антигенов зреющим Т-клеткам в ходе отрицательной селекции. При этом в периферические органы иммунной системы попадают клетки с TCR, узнающими клетки органов эндокринной системы, т. е. снижается порог иммунотолерантности. Уровень иммунитета к патогенам существенно падает, что приводит к рецидивирующим или хроническим поражениям покровов организма оппортунистическими патогенами, в частности грибами рода *Candida*.

Помимо вышерассмотренных отклонений в развитии и функционировании клеток адаптивного иммунитета известны генетические нарушения в системе конститутивных факторов защиты (врожденного иммунитета). По классификации 2008 г. часть из них попадает в группу 5 «Врожденные дефекты фагоцитов». Наиболее значимые из них следующие.

Тяжелая врожденная нейтропения, или **SCN** (от англ. **S**evere **c**ongenital **n**eutropenia), может возникать на основе нескольких мутационных изменений. Наиболее часто обнаруживаются мутации в локализованном на 19-й хромосоме гене ELA2, продуктом которого является эластаза 2 нейтрофилов. Эта эластаза представляет собой сериновую протеазу, накапливающуюся в первичных лизосомах на стадии промиелоцита. Точная роль данного фермента остается невыясненной, однако предполагается, что промиелоциты с мутантной нейтрофильной эластазой подвергаются ускоренному апоптозу в костном мозге.

Более редки мутации в кодирующем фактор активации эластазы 2 гене GFII, при которых не только не созревают нейтрофилы, но и наблюдается снижение количества Т- и В-лимфоцитов. Еще один редко встречающийся вариант SCN связан с лежащим в 1-й хромосоме геном GCSFR, кодирующим рецептор для гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ). Эти пациенты не отвечают улучшением состояния на введение помогающего другим больным с SCN человеческого Г-КСФ.

Циклическая нейтропения, или **CN** (от англ. **c**yclic **n**eutropenia), тоже связана с мутациями в гене GFII, но проявление этих мутаций дает изменение количества нейтрофилов с интервалом приблизительно в три недели. При таком варианте нейтропении количество нейтрофилов в течение 3–6 дней может быть снижено практически до нуля, но затем возвращается к норме, а через 20 дней снова наблюдается падение численности клеток этой группы. В период резкого падения числа основных фагоцитов у пациентов (детей первого года жизни) резко возрастает риск развития инфекционных заболеваний.

X-сцепленная нейтропения, или **XLN** (от англ. **X**-**l**inked **n**eutropenia), с мутациями гена WASP – гена, пораженного у больных с синдромом Вискотта – Олдрича. Вместе с тем у больных с XLN не отмечается тромбоцитопении и других признаков синдрома Вискотта – Олдрича. Предполагается, что мутация при XLN ведет к постоянной активации белка WASP. Однако непосредственно патогенез этого варианта нейтропении неизвестен.

Связанные не с развитием, а с нарушениями способности фагоцитов к миграции иммунодефициты имеют общее название **«дефициты адгезии лейкоцитов»**, или **LAD (от** англ. **L**eukocyte **a**dhesion **d**eficiency). Как известно, лейкоциты в процес-

се своей жизнедеятельности проникают через стенки капилляров, для чего используют находящиеся на их поверхности специфические молекулы – интегрины и селектины (рис. 75).

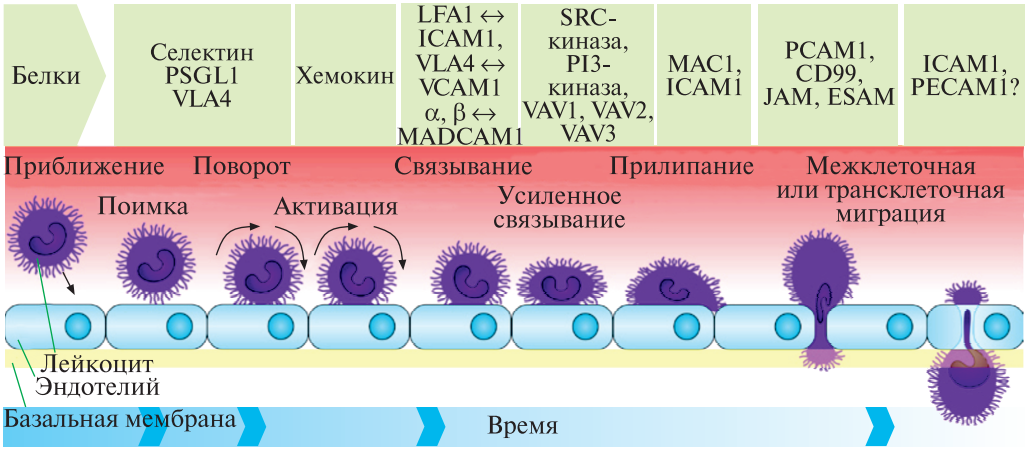


Рис. 75. Процесс диапедеза лейкоцитов и участвующие в нем белки

За счет последних осуществляется остановка движущегося в кровотоке лейкоцита вблизи стенки капилляра и переход его в стадию качения по поверхности эндотелиального слоя. Под воздействием хемокинов происходит активация лейкоцита на экспрессию интегринов, за счет которых осуществляется адгезия лейкоцита на внутренней стенке капилляра (перекатывание прекращается). Затем адгезия усиливается и инициируется процесс проникновения лейкоцита из плазмы крови в тканевую жидкость органа.

Этот процесс нарушается вследствие мутаций в генах, кодирующих факторы адгезии. К настоящему времени идентифицированы три варианта таких нарушений, условно обозначенных как LAD-I, LAD-II и LAD-III.

LAD-I-синдром обусловлен нехваткой или отсутствием на поверхности лейкоцитов молекул CD18, которые являются β2-субъединицей ряда интегринов. Кодирующий этот белок ген CD18 локализован в 22-й хромосоме. При этом варианте LAD не происходит прочного связывания лейкоцита с клеткой эпителия, которое должно осуществляться за счет комплементарного взаимодействия LFA-1 (CD11a/CD18) лейкоцита и ICAM-1 молекулы эндотелиоцита.

При LAD-II на мембране клеток эндотелия нет кодируемой геном SLEX молекулы CD15s, являющейся рецептором для L-селектина лейкоцитов, из-за чего не осуществляется стадия качения.

В варианте LAD-III нарушен второй этап трансмиграции – активация хемокинами процесса образования эффективных интегринов. Это происходит в результате мутаций в гене GCPR, кодирующем G-белок, связанный с рецепторами хемокинов.

Хроническая гранулематозная болезнь (ХГБ) – еще один первичный иммунодефицит, связанный с нарушениями функций фагоцитирующих клеток. В процессе фагоцитоза, на стадии первичной фаголизосомы, реализуются кислород-

зависимые механизмы инактивации фагоцитированного объекта, основным из которых является так называемый «кислородный взрыв». Образование инициирующих кислородный взрыв надпероксидных анионов O_2^- происходит при активации NADPH-оксидазы фагоцитов (Phox) – фермента, состоящего в активном состоянии из 4 субъединиц – gp91 (флавицитохром b558, основной компонент NADPH-оксидазы, обеспечивающий образование $O_2^{-)}$, p22, p47 и p67 (вспомогательные белки, необходимые для перехода gp91 в активное состояние). Ген CYBB, кодирующий gp91, локализован в Х-хромосоме, ген для p22 – в 6-й хромосоме, для p47 – в 1-й, для p67 – в 7-й. Мутации в любом из генов приводят к утрате способности фермента выполнять свою функцию, но чаще всего ($^2/_3$ случаев) болезнь проявляется у мальчиков.

Нейтрофилы пациентов с ХГБ обладают нормальным хемотаксисом, у них не нарушены этапы адсорбции антигена и формирования фагосомы, что обеспечивает успешное фагоцитирование клеток возбудителей инфекционных заболеваний, но далее проявляется эффект незавершенного фагоцитоза – длительное выживание патогена в организме и, как следствие этого, медленное протекание обычно острых инфекций, множественные рецидивы, поражения кожи, лимфатических узлов, легких, печени и других органов.

Еще два первичных иммунодефицита могут приводить к рецидивирующим инфекционным заболеваниям практически на этой же основе – отсутствии эффективного киллинга фагоцитированного возбудителя. Это связано, как и при ХГБ, с дефектами генов, кодирующих необходимые для реализации кислородного взрыва ферменты. В частности, **дефицит глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы**, являющийся результатом мутаций локализованного в Х-хромосоме гена G6PD, ограничивает накопление в нейтрофилах восстановленной формы НАДФ, без которой невозможно образование надпероксидного аниона и, следовательно, запуск кислородного взрыва. **Дефицит миелопероксидазы** возникает как результат мутаций лежащего в 17-й хромосоме гена MPO. Миелопероксидаза необходима для формирования в ходе кислородного взрыва одного из окислителей органических соединений – гипохлорит-ионов OCl^-.

В группу 6 по классификации ВОЗ 2008 года под названием «Дефекты врожденного иммунитета, связанные с рецепторами и сигнальными молекулами» попадает часть иммунодефицитов, описанных выше как влияющие на факторы адаптивного (индуцибельного) иммунитета. Речь идет о мутациях в генах, кодирующих белки, задействованные в передаче сигналов от различных рецепторов. В частности, отсутствие белка IKKγ влияет не только на активацию лимфоцитов, но и на хемотаксис фагоцитирующих клеток и их активацию через рецепторы для распознавания образов опасности, например, так называемые толл-подобные рецепторы TLR (см. рис. 8). То же самое можно говорить и об отсутствии IκB – ингибитора активатора транскрипции NFκB – или же самого белка NFκB.

Как отдельные, затрагивающие преимущественно фагоцитирующие клетки и не приводящие к эктодермальной дисплазии дефициты рецепторных и сигнальных молекул, рассматривают **дефицит белка IRAK4** (ген расположен в 12-й хромосоме), **дефицит TLR3** (ген – в 4-й хромосоме), **дефицит белка UNC-93B** (ген – в 11-й хромосоме, его продукт является трансмембранным белком эдоплаз-

матического ретикулюма, важным для передачи сигналов от эндосомных рецепторов TLR3, TLR7, TLR9).

Естественно, что все вышеописанные иммунодефициты, основанные на нарушениях формирования мембранных везикул и выведении с помощью них из клетки каких-либо эффекторов (синдром Грисцелли, синдром Германски – Пудлак и др.), сказываются и на деятельности фагоцитирующих клеток. В частности, при этих иммунодефицитах у нейтрофилов, эозинофилов и макрофагов снижена эффективность процессов внеклеточного цитолиза.

Кроме фагоцитоза существенным фактором конститутивной защиты (врожденного иммунитета) является система комплемента. Дефекты в ее функционировании также относят к врожденным иммунодефицитам (группа 8 по классификации ВОЗ 2008 года).

У человека выявлены дефициты практически всех основных белков системы комплемента (табл. 15). Большинство из них сопровождаются состояниями, рассматриваемыми как аутоиммунные заболевания.

Таблица 15

Иммунодефициты, связанные с системой комплемента

Затронутый дефицитом этап	Дефектный белок	Ген (хромосома)	Симптоматика
Классический путь активации	C1q	C1QA, C1QB, C1QC (1)	Системная красная волчанка, ревматоидный синдром, повышенная частота инфекционных заболеваний
	C1r	C1r (12)	
	C1s	C1s (12)	
	C4	C4A, C4B (6)	
	C2	C2 (6)	
Альтернативный путь активации	Фактор D	CSD (6)	Повышенная частота нейссериозов
	Фактор P	PFC (X)	
Лектиновый путь активации	MBL	MBL	Повышенная частота гноеродных заболеваний
	MASP2	MASP2	Повышенная частота гноеродных заболеваний, системная красная волчанка
Все три пути активации	C3	C3 (19)	Повышенная частота гноеродных заболеваний, гломерулонефриты и другая иммунокомплексная патология
Сборка атакующего мембрану комплекса	C5	C5 (9)	Системная красная волчанка, повышенная частота нейссериозов
	C6	C6 (5)	
	C7	C7 (5)	
	C8α	C8A	
	C8β	C8B	

Окончание табл. 15

Затронутый дефицитом этап	Дефектный белок	Ген (хромосома)	Симптоматика
Регуляция активации комплемента	Ингибитор C1 (C1EI)	C1NH (11)	Наследственный ангионевротический отек
	Фактор I	CFI (4)	Рецидивирующие гноеродные инфекции
	Фактор H	CFH (1)	Гемолитико-уремический синдром, мембранопролиферативный гломерулонефрит
Регуляция активации комплемента	CD46	CD46	Гемолитико-уремический синдром, гломерулонефриты
	CD59	CD59	Повышенная частота гноеродных заболеваний
	CD18	ITGB2	Некротические проявления, омфалиты (воспаления пупочной ранки), LAD-I-синдром

Несмотря на описанное выше разнообразие наследственных дефектов, все первичные иммунодефициты имеют общие черты, проявляющиеся на клиническом уровне.

Очевидно, что, исходя из названия, основным проявлением должна быть повышенная инфекционная заболеваемость. Она, как правило, характеризуется более тяжелым протеканием конкретных болезней, переходом их в хроническую форму с часто проявляющимися рецидивами и во многих случаях становится причиной смерти. Спектр поражающих людей с иммунодефицитами микроорганизмов отличается наличием в нем значительного числа патогенов, относящихся с точки зрения медицинской микробиологии к оппортунистическим – вызывающим заболевания у человека только при существенном снижении уровня защитных реакций организма.

Еще одной особенностью инфекционной заболеваемости людей с иммунодефицитами является преимущественное поражение органов и систем, непосредственно контактирующих с окружающей средой. Причем прослеживается зависимость частоты поражений от площади контактирующей поверхности и одновременно от вероятности попадания возбудителей на эту поверхность: чаще всего возникают заболевания дыхательной системы, на втором месте – слизистая ротовой полости, кожа и ее производные (ногти), на третьем – пищеварительный тракт.

Второй, но не всегда клинически проявляющейся чертой первичных иммунодефицитов выступает наличие патологий аутоиммунного происхождения, аллергических состояний и иногда злокачественных новообразований лимфопролиферативного характера.

Аутоиммунные заболевания, т. е. повреждения тканей и органов организма его же собственной иммунной системой, конечно, являются результатом нарушений нормального развития и функционирования клеток иммунной системы. Хотя точных сведений о развитии многих иммунопатологий и причинах их возникновения

пока еще недостаточно, в конце XX – начале XXI в. сформировалось определенное представление о молекулярно-биологических и цитогенетических основах некоторых таких состояний. Условно **аутоиммунные патологии** можно делить на органоспецифические и системные.

Одним из наиболее часто встречающихся органоспецифических аутоиммунных заболеваний является **инсулинзависимый сахарный диабет типа I**. Предположительно 5–10 % населения земного шара имеют проявления этой болезни, при которой дендритные клетки процессируют белки β-клеток островков Лангерганса и представляют их $CD4^+$-Т-лимфоцитам. Если среди наивных Т-клеток имеются специфичные к таким антигенам (чаще всего это белок p40 и декарбоксилаза глютаминовой кислоты), то развиваются клоны Т-хелперов подтипа 1. Накопление Тх1 в островках Лангерганса и продукция ими γ-интерферона приводит к активации тканевых макрофагов поджелудочной железы, которые выделяют губительно действующие на β-клетки активные формы кислорода и азота, а также IL-1β. Установлено, что на β-клетках поджелудочной железы имеются рецепторы для этого интерлейкина, присоединяясь к которым он вызывает гибель клеток по пути апоптоза.

Параллельно с этим дендритные клетки, процессируя те же антигены по пути объединения их фрагментов с белками MHC-I, вызывают образование клонов специфичных по отношению к β-клеткам Т-киллеров. Оказываясь в островках Лангерганса совместно с Тх1, эти киллеры попадают под действие выделяемого Т-хелперами IL-2 и дифференцируются в цитотоксические лимфоциты. Они присоединяются к β-клеткам и вызывают их гибель через рецептор апоптоза CD95 (Fas-рецептор) и за счет выделения перфоринов.

Аутоиммунные заболевания щитовидной железы связаны не с поражающим действием клеток иммунной системы, а с появлением в организме аутоантител к белкам клеток щитовидной железы. Одно из таких заболеваний – тиреотоксикоз (он же болезнь Грейвса, он же базедова болезнь) – проявляется в гиперпродукции гормонов щитовидной железы, которая является следствием прикрепления аутоантител к рецептору тиреотропного гормона (он вырабатывается гипофизом) на клетках щитовидной железы.

Второе заболевание – микседема – представляет собой гипотиреоз. Причиной снижения продукции гормонов является взаимодействие аутоантител с различными белками на поверхности клетки и некоторыми белками цитоплазматической локализации, однако механизм ингибирования активности клеток щитовидной железы пока не определен.

При третьем заболевании – тиреоиодите Хашимото – вызывающий продукцию антител аутоантиген точно установлен. Это внутриклеточный белок тиреоглобулин. Причины выработки антител к нему и механизм, приводящий к гипотиреозу, пока неизвестен.

Определенную аутоиммунопатологию связывают и еще с одной железой внутренней секреции – надпочечниками. Это **болезнь Аддисона**, которая развивается вследствие воздействия на железу аутоантител, специфичных к антигенам клеток коры надпочечников. Чаще всего (более 60 % случаев) выявляются антитела к 21-гидроксилазе – основному ферменту стероидогенеза. Механизмы разруше-

ния клеток или снижения продукции ими ферментов под воздействием факторов иммунной системы точно не описаны.

К аутоиммунным заболеваниям нервной системы относится **рассеянный склероз**. Считается, что причиной этой болезни является нарушение толерантности в отношении антигенных составляющих миелина. Установлено, что в качестве аутоантигенов могут проявить себя основной белок миелина, протеолипидный протеин, связанный с миелином гликопротеин, миелиновый олигодендроцитный гликопротеин. Предполагается, что и некоторые другие компоненты миелинового слоя также могут вызывать иммунный ответ. Иммунные ответы развиваются по пути формирования специфичных к миелину клонов Тх1.

Проникновение этих клеток в периваскулярное пространство вблизи оболочки аксонов и выработка Т-хелперами 1 TNFα и IFNγ приводит к активации клеток эндотелия и резидентных периваскулярных макрофагов (фагоцитирующих клеток микроглии). Они, в свою очередь, выделяют хемокины, которые привлекают из кровотока еще больше макрофагов и Т-лимфоцитов. По всей вероятности, взаимная активация и приводит к развитию в этих участках нервной системы воспалительных процессов и формированию основных морфологических проявлений рассеянного склероза – бляшек в нервной ткани. Развитая форма бляшек (острые активные бляшки) представляет собой периваскулярные муфты, образованные мигрирующими из посткапиллярных венул Т-лимфоцитами, активированными макрофагами и клетками микроглии. Большая часть этих активированных клеток вырабатывает приводящие к диемиелинизации вещества, а разрушение миелиновой оболочки постепенно приводит к повреждению мембраны аксона. По мере увеличения количества таких бляшек в нервной системе нарастают и симптомы заболевания.

В патогенезе **ревматоидного артрита**, как предполагается, ведущую роль играют антитела к коллагену II, цитруллиновым белкам и ряду других аутоантигенов. С их участием в синовиальной оболочке (слой эндотелиальных клеток и подлежащей рыхлой неоформленной волокнистой соединительной ткани, выстилающей полость сустава) образуются иммунные комплексы, активирующие систему комплемента и индуцирующие образование цитокинов местными мононуклеарными клетками. Образованию иммунных комплексов способствует и так называемый ревматоидный фактор – аутоантитела, специфичные к Fc-частям IgG. Их появление в больших количествах, которое может быть связано с некоторыми инфекционными заболеваниями, усиливает воспаление иммунокомплексного типа. Из-за развивающегося воспаления в синовиальной жидкости появляется много нейтрофилов, а также увеличивается количество иммунных комплексов и провоспалительных цитокинов. Это приводит к гиперплазии синовиальной оболочки, которая нарастает на суставные поверхности, что влечет за собой разрушение хряща и кости. Существенный вклад в разрушение сустава вносят активные формы кислорода и ферменты лизосом, выделяемые нейтрофилами и макрофагами. Предполагается, что на определенных этапах развития артрита к патогенезу подключаются Т-хелперы типа 1, которые, выделяя провоспалительные цитокины, дополнительно активируют макрофаги и нейтрофилы.

Аутоиммунное поражение кожных покровов – **псориаз** – развивается тогда, когда по каким-либо причинам дендритные клетки захватывают и процессируют белки кератиноцитов. Попадая в ближайший лимфатический узел, они индуцируют развитие иммунного ответа по типу Т-хелперов 1 и активируют соответствующие аутореактивные Т-киллеры. Выходящие из лимфоузла в кровоток активированные клетки обоих типов приобретают кожный лимфоцитарный антиген (CLA) и хемокиновые рецепторы (CCR4, CCR10), что определяет их миграцию в кожу. $CD4^+$ Т-клетки мигрируют преимущественно в дерму, а $CD8^+$ Т-клетки – в эпидермис. Оказавшись в коже, Т-лимфоциты продуцируют TNFα и IFNγ, активируют местные макрофаги и запускают процесс воспаления. Проходящие через очаг воспаления дендритные клетки вновь захватывают антигены разрушающихся в ходе воспаления кератиноцитов, мигрируют в лимфоузел, и повторяется процесс запуска новых иммунных ответов, что влечет за собой увеличение площади поражения кожи.

Сходный механизм предполагают и для еще одного аутоиммунного кожного заболевания – **витилиго**. Здесь также в пораженных участках кожи обнаруживаются в значительных количествах Т-хелперы 1 и Т-киллеры, причем на клетках обоих типов хорошо выражены молекулы CLA, специфически направляющие их в ходе миграции в кожу. Но в отличие от псориаза Т-киллеров здесь больше, чем Т-хелперов, и именно они вызывают цитолиз меланоцитов. Проверка их специфичности показала, что они узнают антигены синтезирующих меланин клеток, чаще всего Melan-A/MART1.

Однако патогенез при витилиго связан также и с аутоантителами к антигенам меланоцитов и ферментам, участвующим в синтезе меланина. Считается, что к цитотоксическому действию Т-киллеров добавляется определяемый иммуноглобулинами комплементзависимый лизис меланоцитов, а также их гибель под действием NK-клеток, имеющих рецепторы для иммуноглобулинов.

Поражения мышечного аппарата – **миастения гравис**, – связанные с иммунной системой, выражаются в быстро наступающей усталости всех поперечно-полосатых мышц, за исключением сердечной. При выраженной форме это не только усталость часто используемых мышц конечностей, но и мимических мышц лица, мышц, обеспечивающих жевание и речевое общение, глазодвигательных мышц. При этом усталость не сопровождается болевыми ощущениями, т. е. по сути своей не является реальной мышечной усталостью.

В настоящее время установлено, что это состояние возникает при выработке антител к рецепторам для ацетилхолина никотинового типа (AchR). При взаимодействии таких антител с рецепторами мышечной клетки, расположенными в синапсе между нервной и мышечной клетками, блокируется передача сигнала на возбуждение.

Поскольку около 70 % больных с диагнозом миастения гравис имеют еще и изменения в тимусе (чаще – гиперплазия, реже – опухоль, еще реже – атрофия части тимуса), предполагается связь миоидных клеток тимуса (располагаются в мозговом веществе, имеют сходные с саркомерами мышечных клеток внутриклеточные структуры), на поверхности которых есть ацетилхолиновые рецепторы, с появлением аутоантител, дающих симптомы миастении.

Болезнь Крона представляет собой поражение стенок кишечника, вызванное избыточным воспалением слизистой оболочки и подстилающих слоев. В пораженных участках регистрируется скопление лимфоидных клеток и активных форм других лейкоцитов, продуцирующих провоспалительные интерлейкины, что влечет за собой гибель клеток эпителия под воздействием, вероятно, комплекса иммунных реакций. Считается, что в основе этой аутоиммунопатологии лежит генетическая предрасположенность, но из генов, причастных к этому заболеванию, пока идентифицирован только один – NOD2 (нынешнее его название CARD15). Этот ген расположен в 16-й хромосоме и кодирует белок, содержащий домен активации каспазы – **ca**spase **r**ecruitment **d**omain-containing protein 15. Ранее продукт этого гена был идентифицирован как цитозольный рецептор мурамил-дипептида, возникающего при распаде муреина бактериальных клеточных стенок. При мутациях в этом гене нарушается регуляция процесса выработки провоспалительных цитокинов, в результате чего их образуется больше, чем при обычном варианте воспаления.

Среди системных иммунопатологических состояний наиболее тяжелым по протеканию является **системная красная волчанка (СКВ)**. При этом заболевании наблюдаются поражения различных органов и систем вследствие запуска в них аутоиммунных воспалительных процессов. Причиной таких воспалений, вероятнее всего, служат аутоантитела, отличающиеся широким разнообразием. У больных с волчаночными синдромами описано уже более 100 вариантов антител к различным аутоантигенам, как к белковым, так и липидным (фосфолипидам, кардиолипину и др.), но преобладают среди них антитела к двунитевым молекулам ДНК.

Предполагается, что ключевыми в запуске волчаночных поражений являются антитела к поверхностным антигенам клеток, которые инициируют активацию комплемента по классическому пути, а также вызывают гибель клеток под воздействием фагоцитов, Т-киллеров и NK-клеток. На этом этапе фактически реализуется механизм, характерный для гиперчувствительности типа II.

Выделяющиеся при гибели клеток продукты стимулируют развитие воспалительной реакции и одновременно развитие иммунных ответов на различные аутоантигены. Причем преобладают среди таких иммунных ответов ответы гуморального типа, развивающиеся по пути образования клонов Т-хелперов 2 и далее клонов, продуцирующих аутоантитела В-лимфоцитов. Одним из факторов, направляющих иммунные ответы по этому пути, считают α-интерферон (IFNα), который появляется в избыточных количествах из-за ускоренного апоптоза клеток в месте развивающегося воспаления. Предполагается, что происходящий в местах волчаночных поражений апоптоз служит также причиной появления аутоантител не только к поверхностным антигенам, но и к антигенам органоидов, а также молекулам, содержащимся внутри органоидов.

Объясняющая этот эффект гипотетическая схема такова. Образующиеся при ускоренном апоптозе остатки клеток захватываются активированными дендритными клетками, и поскольку не все еще молекулы в таких продуктах апоптоза деструктированы, эти молекулы попадают в процессинг подобно чужеродным ан-

тигенам. В результате появляются антигенпредставляющие клетки, способные запустить иммунный ответ против аутоантигенов.

При выраженных волчаночного типа поражениях количество аутоантител различной специфичности нарастает, что не только усиливает поражение по варианту гиперчувствительности типа II, но и приводит к образованию большого количества свободных иммунных комплексов в кровотоке. Не удаляемые вовремя иммунные комплексы неспецифически оседают на стенках капилляров, что добавляет симптомы ангиопатии (васкулита). При осаждении таких комплексов в определенных органах, например в почках, развиваются их поражения уже по механизму гиперчувствительности типа III. Сочетание аутоиммунных поражений различного характера делает прогрессирующую СКВ одним из тяжелейших иммунопатологических состояний с высоким уровнем летальности.

Очевидно, что системная красная волчанка представляет комплексное поражение организма, в основе которого лежит дисрегуляция механизмов иммунотолерантности. Однако каковы первопричины таких изменений, еще предстоит выяснить.

К системным иммунопатологиям относят также **склеродермию**. Она развивается при появлении в организме аутоантител к белкам клеток и межклеточного вещества соединительной ткани. В частности, среди таких антител доминируют аутоантитела к фибриллину-1. Именно с их действием связывают формирование одного из основных симптомов склеродермии – фиброза. Фиброзом называют разрастание соединительной ткани в каких-либо органах с образованием рубцов, ведущее в конечном итоге к нарушению функций органа. Показано, что антитела к фибриллину-1 активируют фибробласты в плане их хемотаксического перемещения, усиливают синтез фибробластами веществ межклеточного матрикса. В то же время стартовыми процессами для развития склеродермических поражений становятся повреждения стенок капилляров и запуск воспаления в каком-либо органе. В процессе воспаления могут возникать и усиливаться иммунные ответы на антигены соединительной ткани, приводящие к образованию специфических Т-хелперов типа 2 и клонов В-лимфоцитов, продуцирующих антитела.

В ходе такого воспаления в соединительной ткани тканевые макрофаги наряду с провоспалительными цитокинами продуцируют трансформирующий фактор роста β (TGFβ), привлекающий фибробласты. В дополнение к этому сходным действием обладают вырабатываемые Т-хелперами 2 интерлейкины IL-4 и IL-13 и выделяемый макрофагами хемокин MCP-1. Все это сочетается с описанным выше действием аутоантител, разнообразие и количество которых, очевидно, возрастает в ходе начавшегося процесса. Такая пока еще в значительной мере гипотетическая схема развития склеродермии базируется на том, что T_H1-цитокины (IFNγ, TNFα) подавляют, а не стимулируют фиброз.

К системным аутоиммунным состояниям относят и **синдром Шегрена**, хотя он первоначально развивается как поражение слезных и слюнных желез (так называемый «сухой синдром»), но затем могут проявляться и поражения мышц, сосудов, почек, нервной системы. Основой для рассмотрения этого синдрома как иммунопатологии является большое количество Т- и В-лимфоцитов в пораженных тканях и наличие широкого спектра аутоантител. Среди таких антител, кроме ан-

тител к антигенам клеток эпителия слюнных и слезных желез, выявлены антитела к антигенам клеток поджелудочной железы, печени, клеток эпителия желудка, клеток почечных канальцев, к кардиолипину. При прогрессировании заболевания возможно появление симптомов, характерных для ряда других иммунопатологий (васкулит, кожные высыпания, гломерулонефрит, мышечные поражения и т. д.), что говорит о возможном сходстве иммунных механизмов, вызывающих поражение, с характерными для уже изученных синдромов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Галактионов, В. Г. Иммунология : учебник / В. Г. Галактионов. – М. : Акад., 2004. – 787 с.

Ковальчук, Л. В. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии : учебник / Л. В. Ковальчук, Л. В. Ганковская, Р. Я. Мешкова. – М. : ГЕОТАР-Медиа, 2011. – 640 с.

Ройт, А. Основы иммунологии : учебник / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл ; пер. с англ. – М. : Мир, 1991. – 327 с.

Ройт, А. Основы иммунологии / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл ; пер. с англ. – М. : Мир, 2000. – 456 с.

Хаитов, Р. М. Иммунология : учебник / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатьева, Г. И. Сидорович. – М. : Медицина, 2000. – 432 с.

Ярилин, А. А. Иммунология : учебник / А. А. Ярилин. – М. : ГЕОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.

Ярилин, А. А. Основы иммунологии : учебник / А. А. Ярилин. – М. : Медицина, 1999. – 608 с.

Cruse, *J. M*. Illustrated Dictionary of Immunology. Third Edition / J. M. Cruse, R. E. Lewis. – Boca Raton : CRC Press, 2009. – 820 p.

Essential of Clinical Immunology. Sixth Edition / H. Chapel, M. Haeney, N. Snowden. – Wiley Blackwel, 2014. – 377 p.

KUBY Immunology. Seventh Edition / J. A. Owen [et al.]. – N. Y. : W. H. Freeman and Company, 2013. – 832 p.

Parham, *P*. The Immune system. Forth Edition / P. Parham. – Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2015. – 625 p.

Roitt, *I*. Immunology. Second Edition / I. Roitt, J. Brostoff, D. Male. – Churchill Livingstone, 1989. – 562 p.

Weir, *D. M*. Immunology. Eighth Edition / D. M. Weir, J. Stewart. – Churchill Livingstone, 1997. – 362 p.

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

Б

Бенасерраф Барух *8*, *9*, *10*
Беринг Эмиль фон *6*, *7*, *43*, *158*
Бёрнет Фрэнк Макфарлейн *8*, *9*
Бетлер Брюс *8*, *11*
Борде Жюль *8*, *9*, *43*

В

Вотерхауз Бенджамин *6*

Д

Джанеуэй Чарльз *56*
Дженнер Эдвард *5*, *6*, *94*
Доссе Жан *8*, *9*, *10*
Доэрти Питер *8*, *10*

Е

Ерне Нильс *8*, *10*, *202*

К

Кабат Элвин *158*
Кёллер Георг *8*, *10*, *185*, *186*
Китасато Шибасабуро *6*, *7*, *43*, *158*
Кох Роберт *4*, *6*, *7*, *146*

Л

Ландштейнер Карл *8*, *9*, *196*
Левенгук Антони ван *6*

М

Медавар Питер Брайн *8*, *9*
Меджитов Руслан *57*
Мечников И. И. *7*, *9*
Мильштейн Цезарь *8*, *10*, *185*, *186*

П

Панет Джозеф *18*
Пастер Луи *4*, *6*, *7*
Пиллемер Луис *49*
Пирке Клеменс *147*
Портер Родни *8*, *10*, *158*, *160*
Портье Поль *146*
Пфейффер Рихард *9*

Р

Рише Шарль *8*, *9*, *146*, *147*

С

Сахаров Г. П. *146*
Смит Т. *146*
Снелл Джордж Девис *8*, *9*, *10*

Т

Тизелиус Арне *158*
Тонегава Сусуму *8*, *10*

Х

Хоум Френсис *5*
Хоффман Жюль *8*, *11*

Ц

Цинкернагель Рольф *8*, *10*

Ш

Штейнман Ральф *8*, *11*

Э

Эдельман Джеральд *8*, *10*, *158*, *160*
Эрлих Пауль *7*, *43*

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

авидность антител *177*
агглютинация *179*, *189–190*
агранулоциты (незернистые лейкоциты) *14*
аденоиды *13*
адоптивный перенос гиперчувствительности *148*
адъювант Фрейнда неполный *182*
адъювант Фрейнда полный *182–183*
адъюванты *182*
активационно индуцируемая цитидиндезаминаза (AID) *136–137*, *221*
активационные последовательности ITAM *131*
активация системы комплемента *47–52*
активности системы комплемента *54*
алармины *59–60*
аллергены *146*, *156*
аллергия *8*, *146*
аллоантигены *155*
аллоантитела (гомоантитела) *172*
альвеолярные макрофаги *102*
альтернативный путь активации системы комплемента *50–51*
аминоптерин (*4*-аминоптероилглутаминовая кислота) *186*
анатоксины *95*
анафилаксия *8*, *146*
анафилактический шок *147*
анафилотоксины *55*
ангиопатия (васкулит) *236*
антиген *151–152*
антигенная детерминанта *153*
антигенная специфичность *157*
антигенная формула *156*
антигенные детерминанты иммуноглобулинов *171*
антигенность *152*
антигенраспознающий рецепторный комплекс Т-лимфоцитов *107*
антигены неполные (гаптены) *153*
антигены полные *153*
антигенпредставляющие клетки (АПК) *101–103*
антигенсвязывающие участки иммуноглобулина (CDR) *161–162*
антигенная детерминанта *153*
антисыворотки *183*, *189*
антитела (иммуноглобулины) *6*, *14*, *158–176*
антитела нормальные *50*
антитела моноклональные *10*, *185–188*
антитела поликлональные *183*
антитоксины *6*, *158*
апоптоз *88–90*
ассоциированные с опасностью молекулярные образы (DAMPs) *59–60*
атаксия-телеангиэктазия (синдром Луи-Бар) *221–222*
атакующий мембрану комплекс *49*
аттенюация *6*, *94*
аутоантигены *155*
аутоантитела *172*, *231–236*
аутоиммунные заболевания *231–236*
аутоиммунные заболевания щитовидной железы *232*

аутоиммунные патологии органоспецифические *231–235*
аутоиммунные патологии системные *235–236*
аутоиммунный лимфопролиферативный синдром *225*
аутофагия *130*
аффинная хроматография для улучшения поликлональных сывороток (антител) *184*
аффинность (аффинитет) антител *177*
ацетилмурамидаза (лизоцим) *16*, *18*, *38*
ацидоз при воспалении *26*

Б

базедова болезнь (болезнь Грейвса, тиреотоксикоз) *232*
базофилы *13*, *28*, *32*, *148–149*
бактериолиз *in vitro* *204*
бактериолиз *in vivo* активный *204*
бактериолиз *in vivo* пассивный *204*
бактерицидные вещества в секретах слизистых оболочек *18*
бактерицидный эффект компонентов желчи *18*
бактерицидный эффект пищеварительных ферментов и соляной кислоты *18*
белая пульпа селезенки *144–145*
белки альтернативного пути активации комплемента *47*
белки атакующего мембрану комплекса *47*
белки GAPs (RGSs) *91*
белки главного комплекса гистосовместимости *8–9*, *124–128*
белки классического пути активации комплемента *45–47*
белки LUBAC *90*
белки MHC I *112*, *126–128*, *139*
белки MHC II *112*, *124–125*
белки острой фазы воспаления *26*
белки семейства Jaks *83–84*
белки системы комплемента *14*, *44–47*
белки STAT *84–85*
белки теплового шока *60*
белок-носитель *153*
белок ACT1 *87*
белок AIRE *113*
белок Akt *131*, *135*
белок AP-1 *77*, *131*
белок ASC *62*
белок BAD *131*, *135*
белок BAFF *220*
белок BAX *131*, *135*
белок Bcl-10 *83*
белок Blimp-1 *220*
белок BLNK *135*
белок Btk *135*
белок C1q *45*
белок CD2 *130*, *139*
белок CD3 *106*, *107–109*, *130*, *219*
белок CD4 *106*, *111–112*, *129*, *136*, *219*
белок CD8 *106*, *111–112*, *139*
белок CD9 *31*
белок CD11 (LFA-1) *130*, *139*, *228*
белок CD11b/CD18 *34*
белок CD11c/CD18 *34*
белок CD14 *30*, *31*
белок CD15s *228*
белок CD16 *30*, *31*, *34*
белок CD18 *228*, *231*
белок CD19 *119*, *220*
белок CD21 *30*, *34*, *119*, *220*
белок CD23 *31*
белок CD25 *105*
белок CD28 *129*, *131*, *136*, *139*
белок CD32 *30*, *31*, *34*
белок CD33 *34*
белок CD35 *30*, *31*, *34*, *53*
белок CD36 *34*
белок CD40 *136*, *220*, *221*
белок CD44 *105*
белок CD45 *131*
белок CD46 *53*, *231*
белок CD54 (ICAM-1) *129*, *139*, *228*
белок CD55 *53*
белок CD56 *41*
белок CD58 (LFA-3) *129*, *139*

белок CD59 *53*, *231*
белок CD64 *30*
белок CD79α (Igα) *119*, *135*
белок CD79β (Igβ) *119*, *135*
белок CD80 *129*, *136*, *139*
белок CD81 *220*
белок CD86 *129*, *136*, *139*
белок CD95 (Fas-рецептор) *140*, *226*
белок CD99 *228*
белок CD117 *105*
белок CD152 (CTLA-4) *132–133*
белок CD154 (CD40L) *133*, *136*, *220*
белок CD160 *34*
белок CD178 (FasL, Fas-лиганд) *226*
белок CD225 *220*
белок cFLIP *90*
белок ERAP *127*
белок ERp57 *127*
белок FADD *90*
белок HLA-DM *125*
белок HMGB1 *60*
белок ICOS *220*
белок IL-18BP *66*
белок IκB *78*, *220*, *229*
белок IL-1RAcP *85*
белок IRAK1 *81*
белок IRAK4 *81*
белок IRF7 *81*
белок LAT *131*
белок Lyn *135*
белок MAVS *83*
белок MyD88 *79*
белок NEMO (белок IKKγ) *79*, *220*, *229*
белок NFAT *75*
белок NOD1 *61*
белок NOD2 *61*
белок PDK *131*, *135*
белок PTX3 *26–27*
белок Ras *75*, *131*, *135*
белок RIG-1 *83*
белок RIP1 *83*, *90*
белок S (витронектин) *44*, *47*, *53*
белок SOS *76*, *131*, *135*
белок Syk *135*
белок TAB *81*
белок TAK1 *81*, *90*
белок TANK *81*
белок TAP-1 *125–127*, *219*
белок TAP-2 *125–127*, *219*
белок TBK1 *81*, *125–127*
белок TRADD *83*, *89*
белок TIRAP *80*
белок TRAF2 *89*, *90*
белок TRAF3 *81*
белок TRAF6 *81*
белок TRAM *80*
белок TRIF *79*
белок TTP *87*
белок VAV *131*, *135*
белок WASP *222*
белок ZFP36 *87*
береговые макрофаги лимфоузла *143*
β2-микроглобулин *127*
β-селекция созревающих Т-лимфоцитов *111*
болезнь Аддисона *232*
болезнь Грейвса (базедова болезнь, тиреотоксикоз) *232*
болезнь Дункан (синдром Пуртильо, Х-сцепленный лимфопролиферативный синдром) *224*
болезнь Крона *234–235*
брадикинин *24*

В

вакцина *6*, *94*
вакцинация *6*, *94–95*
вакцины гетерологичные *94*
вакцины гомологичные *94*
вакцины живые *94*
вакцины комплексные *96*
вакцины убитые *95*
вакцины химические *95*
валентность антигена *153*
вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина (V_L) *159*, *161–162*
вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H) *159*, *161–162*

васкулит (ангиопатия) *235*
взаимодействие антиген – антитело *176–180*
видовая антигенная специфичность *157*
вилочковая железа (тимус) *104*
витилиго *234*
витронектин (белок S) *44*, *47*, *53*
В-клеточная зона лимфоузла *143*
В-клеточная зона пейеровой бляшки *23*
В-клеточная зона селезенки *145*
В-клеточный рецептор (BCR) *115–119*
В-лимфоциты *99*, *103*, *115–123*
В1-лимфоциты *122*
В2-лимфоциты (фолликулярные В-лимфоциты) *116*, *121*
В-лимфоциты маргинальной зоны (MZ-B-клетки) *116*, *122–123*
воспаление *24–27*
врожденные дефекты фагоцитов *227–230*
встречный электрофорез (электросинерез) *195*
вуалевые клетки афферентной лимфы *102*

Г

β-D-галактозидаза *211*
гаптеноспецифичность *157*
гаптены (неполные антигены) *153*
ГАТ-среда *186*
гемагглютинация *196–200*
гемолитико-уремический синдром *231*
генез В-лимфоцитов *115–123*
генез Т-лимфоцитов *103–115*
гены, кодирующие цепи иммуноглобулинов *173–176*
гены, кодирующие цепи Т-клеточных рецепторов *109–110*
герминативный центр (вторичный фолликул) *136*, *143*
гетероантигены *155*
гетероантитела *172*
гетероспецифичность антигенная *157*
гибридомы для получения моноклональных антител *185–188*
гидроксил-радикал *36*
гипервариабельные участки (CDR) цепей иммуноглобулинов *162*
гипер-IgE-синдром (синдром Иова) *221*
гипер-IgM-синдром (HIGM) *220–221*
гиперчувствительность замедленного типа *16*, *138*, *151–152*
гиперчувствительность немедленного типа *16*, *146–151*
гиперчувствительность типа I *148–149*
гиперчувствительность типа II *149–150*, *235*
гиперчувствительность типа III *150*, *235*
гиперчувствительность типа IV *150–151*
гипогаммаглобулинемия *220*
гипоксантин *186*
гипоксантин-гуанидинфосфорибозилтрансфераза (ГГФРТ) *186*
гипоксия при воспалении *26*
гипоиодит-анион *36*
гипотиреоз *232*
гипохлорит-анион *36*
гистамин *24*
гистатины *19*
гистосовместимости комплекс *9*
гистосовместимости система *9*
главный комплекс гистосовместимости *9*
гомоантигены *155*
гомоантитела *172*
гранзимы *42*
гранулизины *42*
гранулоцитарно-моноцитарная клетка *28*
гранулоцит-моноцит колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) *64*
гранулоциты (зернистые лейкоциты) *13*
группа генов ISG (интерферонстимулируемые гены) *85*
групповая антигенная специфичность *157*
гуморальная теория иммунитета *7*

Д

двойная радиальная иммунодиффузия по Оухтерлони *191–192*
дендритные клетки *29–30*, *103*
дерма (кожа) *17*
дисгенезия тимуса (синдром Незелофа) *218*
дефензины α, β и θ *18*, *37*
дефицит аденозиндезаминазы *219*
дефицит белка IRAK4 *229*
дефицит белка UNC-93B *229*
дефицит белка p14 *223*
дефицит белка ZAP70 *219*
дефицит белков TAP-1 и TAP-2 *219*
дефицит глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы *229*
дефицит ДНК-зависимой протеинкиназы *218*
дефицит миелопероксидазы *229*
дефицит молекул MHC-II *218–219*
дефицит пуриннуклеотидфосфорилазы *219*
дефицит CD3 *218*
дефицит CD4 *218*
дефицит тирозинкиназы Jak3 *217*
дефицит TLR3 *229*
дефицит ферментов RAG-1 и RAG-2 *217–218*
дефициты адгезии лейкоцитов (LAD) *227*, *231*
диагностикумы *189*
диацилглицерол (DAG) *74*
дисбактериозы *21*
дифференцировочные антигены (CD-антигены) *156–157*
домен CARD *61–62*
домен CBAD *87*
домен DD (домен смерти, домен гибели) *89*, *225*
домен PYD *62*
домен SEFIR *87*
домен TILL *87*
домен TIR *79*, *85*, *87*

Е

ELISA (**e**nzyme-**l**inked **i**mmuno-**s**orbent assay) *213*
естественные (нормальные) антитела *172*
естественные киллеры (натуральные киллеры, NK-клетки) *38*, *40–43*

Ж

жгутиковые антигены (H-антигены) *156*
железы потовые *17*
железы сальные *17*

З

защитные механизмы индуцибельные (приобретенные, приспособительные) *15–16*
защитные механизмы конститутивные (врожденные, природные) *15–16*
защитный эффект секрета потовых желез *17*
защитный эффект секрета сальных желез *17*
зона эквивалентности в реакциях агглютинации (преципитации) *179*

И

изоантигены *155*
изоантитела *172*
изотипы (классы) иммуноглобулинов *165*
иммунитет *4*, *5–8*, *93–98*
иммунитет видовой (врожденный) *93–94*, *98*
иммунитет естественный активный (постинфекционный) *97*, *98*
иммунитет естественный пассивный (плацентарный) *98*
иммунитет искусственный активный *94*, *98*
иммунитет искусственный пассивный *97*, *98*

иммунитет приобретенный (индивидуальный) *94*
иммунная система *13*
иммунная система слизистых (ИСС) (англ. аббр. MALT) *22–23*
иммунная система слизистых (ИСС) желудочно-кишечного тракта (GALT) *23*
иммунная система слизистых (ИСС) дыхательных путей (BALT) *23*
иммунные антитела *172*
иммуноблотинг (Western-анализ) *214–215*
иммуногенетика *10*
иммуногенность *152*
иммуноглобулины (антитела) *6*, *14*, *158–176*
иммуноглобулины класса A (IgA) *23*, *167*, *168*
иммуноглобулины класса D (IgD) *120–121*, *171*
иммуноглобулины класса E (IgE) *148–149*, *170–171*
иммуноглобулины класса G (IgG) *140–141*, *149–150*, *166–167*
иммуноглобулины класса M (IgM) *119–121*, *140–141*, *167–180*
иммунодефициты, связанные с системой комплемента *230–231*
иммунодефициты человека *216–231*
иммунодиффузия *190–193*
иммунокомплексная гиперчувствительность *150*
иммунологическая память *137*, *138*, *140*
иммунологическая толерантность *9*, *113*
иммунологический синапс *42*, *129*
иммунология *4*
иммунология инфекционная *8*
иммунология неинфекционная *8*
иммунный ответ антителопродуцирующего типа *100*
иммунный ответ вторичный *140–142*
иммунный ответ клеточного типа *100*, *138–140*
иммунный ответ первичный *140–142*
иммунопротеосомы *125*
иммуноферментный анализ (ИФА) *211–213*
иммуноферментный анализ гетерогенный (твердофазный) *211–212*
иммуноферментный анализ гомогенный *211*
иммуноферментный анализ ELISA *213*
иммунофлюоресценция непрямая *206–207*
иммунофлюоресценция непрямая с применением комплемента *207*
иммунофлюоресценция прямая *206–207*
иммуноэлектрофорез *193–196*
инвариантная цепь *124–125*
ингибитор C1-эстеразы (C1EI) *52*
ингибитор NF-κB (IκB) *78*
индивидуальная антигенная специфичность *156*
инсулинзависимый сахарный диабет типа I *231–232*
интердигитальные клетки *102*
интерлейкины *14*, *63–64*
интерлейкин-1 (IL-1) *25*, *61*, *64–65*
интерлейкин-2 (IL-2) *133*, *139*
интерлейкин-4 (IL-4) *66*, *133*, *139*
интерлейкин-5 (IL-5) *66*, *133*
интерлейкин-6 (IL-6) *25*, *70*, *134*
интерлейкин-7 (IL-7) *117*, *217*
интерлейкин-8 (IL-8) *25*, *68–69*, *91*
интерлейкин-10 (IL-10) *134*, *220*
интерлейкин-12 (IL-12) *133*
интерлейкин-13 (IL-13) *66*, *133*
интерлейкин-17 (IL-17) *70*, *134*
интерлейкин-18 (IL-18) *25*, *61*, *66*, *133*
интерлейкин-21 (IL-21) *134*
интерлейкин-22 (IL-22) *134*
интерлейкин-28A (IL-28A) *67*
интерлейкин-28B (IL-28B) *67*
интерлейкин-29 (IL-29) *67*
интерлейкин-33 (IL-33) *66*
IL-18-связывающий белок (IL-18BP) *66*

интерферон γ (IFNγ) *67*, *133*, *139*
интерфероновые рецепторы *83*
интерфероны *16*, *25*, *67–68*
интерфероны α *67*
интерфероны β *67*
интерфероны λ *67*
интерфероны типа I *67*
интерфероны типа II *67*
интерфероны типа III *67*
интраэпителиальные лимфоциты (IEL) *105*, *114*
инфламмасомы *61–63*
IPEX-синдром (X-сцепленный синдром дисрегуляции иммунитета, полиэндокринопатии и энтеропатии) *226*
истощение сывороток *183–184*

К

каллидин *24*
калнексин *117*, *127*
калретикулин *127–128*
кальмодулин *75*, *135*
кальциневрин *75*, *135*
капсульные антигены (K-антигены) *156*
каркасные участки вариабельных доменов иммуноглобулинов *162*
каспаза-1 *62*
каспаза-3 *90*, *225*
каспаза-6 *225*
каспаза-7 *90*, *225*
каспаза-8 *90*, *225–226*
каспаза-10 *225–226*
каспазосвязывающий домен (CARD) *62*
каспазы *62*, *90*
каталаза *36*
кателицидины *19*
катепсин G *37*
катионные белки *37*
кинины *24*
кислородный (дыхательный) взрыв *35–36*, *228–229*
кислородзависимая инактивация микроорганизмов фагоцитами *35–36*
кислороднезависимая инактивация микроорганизмов фагоцитами *37–38*
классический путь активации системы комплемента *47–49*
классы (изотипы) иммуноглобулинов *165*
классы хемокинов *69*
клетки иммунологической памяти *137*, *140*
клетки Лангганса *102*
клетки Лангерганса *102*
клетки Панета *18*
клетки плазматические *137*
клетки типа инородного тела *102*
клетки тучные *14*
клональная селекция незрелых B-лимфоцитов *120*
кожа (дерма) *17*
коллектины *52*
комбинированные T- и B-клеточные иммунодефициты *216–219*
комплексные антигены *155*
комплемент *9*, *14*, *43–55*
комплемента система *9*, *14*, *43–55*
константный домен легкой цепи иммуноглобулина (C_L) *159*
константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина (C_H) *159*
концевая дезоксинуклеотидтрансфераза (TdT) *110*
корецепторы *129*
корпускулярные антигены *155*
костимуляция *129*
красная пульпа селезенки *144–145*
красный костный мозг *13*, *28*, *103*, *115*
ксеноантигены *155*
ксеноантитела (гетероантитела) *172*
купферовские клетки (клетки Купфера) *101*

Л

лактоферрин *37–38*
легкие цепи иммуноглобулинов (L-цепи) *118*, *158*, *165–166*

лейкотриены *25*
лейкоциты *13*, *28*
лейкоциты зернистые (гранулоциты) *13*, *28*
лейкоциты незернистые (агранулоциты) *13*, *28*
лектиновый путь активации системы комплемента *27*, *52*
лизосомы фагоцитов *35*
лизоцим (ацетилмурамидаза) *16*, *18*, *38*
лимфатический узел *13*, *142–143*
лимфокины *14*
лимфотоксин α (фактор некроза опухолей β) *66*
лимфоциты *13*, *28*, *99–100*
липидные рафты *72*

М

макрофаги *28*, *99–100*, *101–103*
макрофаги альвеолярные *102*
макрофаги перитонеальные *101*
макрофаги тканевые *29*, *101–103*
маннозосвязывающий белок *26*, *27*
MAP-киназы *76*
MAP-киназные сигнальные пути *76*
MAP-киназные каскады *76*, *131*, *135*
медиаторы воспаления *24*
мембранный иммуноглобулин D (mIgD) *120–121*
мембранный иммуноглобулин M (mIgM) *119–121*
мембранный кофакторный белок (МКБ) *53*
мембранопролиферативный гломерулонефрит *230*
метод локального гемолиза (метод «бляшек») *202–203*
метод RAST *209*
метод RIST *210*
миастения гравис *234*
миграция лимфоцитов *142–146*
миелобласт (гранулоцитарная клетка) *29*
миеломные ГАТ-чувствительные В-лимфоциты *186–187*
миелопероксидаза *36*, *229*
микробиота нормальная *20*
микрофаги *28*, *31*
микседема *232*
миндалины *13*
М-клетки эпителия кишечника *23*
мозговое вещество лимфоузла *142–143*
мозговое вещество тимуса *104*
монобласт (моноцитарная клетка) *28*
моноклональные антитела *185–188*
моноцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (М-КСФ) *29*
моноциты *13*, *29*
мультивалентные антигены *153–154*

Н

НАДФ-оксидаза фаголизосомная *36*, *228–229*
наивные Т-киллеры *138*
наивные Т-хелперы (Т-хелперы подтипа 0) *129*
наследственный ангионекротический отек *230*
нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETs) *39*
натуральные (естественные) киллеры (NK-клетки) *28*, *40–43*, *234*
незавершенный фагоцитоз *38*
незрелые В-лимфоциты *116*, *119*
нетоз *39*
нейтрофилы *13*, *31*, *39–40*, *227*
неполные антитела *172*, *197–198*
непроницаемость покровов *16–24*
непрямая (пассивная) гемагглютинация *196*
непрямая иммунофлюоресценция *206–207*
непрямая иммунофлюоресценция с применением комплемента *207*
NKT-клетки *114*
нормальные (естественные) антитела *50*, *172*

О

образы (паттерны) патогенности (PAMPs) *57*
общая вариабельная иммунная недостаточность (ОВИН) *219–220*
оксид азота *37*
омфалиты (воспаления пупочной ранки) *231*
опсонизация *34*
опсонины *34*
органы иммунной системы вторичные (периферические) *13*
органы иммунной системы первичные (центральные) *13*
ориентировочная реакция агглютинации *189*
оспопрививание *6*
отртофенилендиамин (ОФД) *211*

П

паракортикулярный (глубокий корковый) слой лимфоузла *143–144*
паранитрофенил-β-D-галактозид *211*
паранитрофенилфосфат *211*
паратоп *161–163*, *177*
партикулированные антигены *155*
пассивная (непрямая) гемагглютинация *196–197*
пассивный перенос анафилаксии *148*
патогенассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs) *57*
патологическая антигенная специфичность *157*
паттернраспознающие рецепторы (PRRs) *57*
паттерны (образы) опасности (DAMPs) *60*
паттерны (образы) патогенности (PAMPs) *57*
пейеровы бляшки *13*, *22*, *23*
пенетрация при воспалении *25*
пентраксины *26–27*
пептид CLIP *125*
пептидсвязывающая щель *124*, *127*
первичный распознающий репертуар *113*
перекись водорода *35*, *36*, *211*
переключение классов иммуноглобулинов (CSR) *136–137*
перекрестная толерантность *128*
перекрестное представление антигена *128*
перекрестное примирование *128*
перекрестный иммуноэлектрофорез *195–196*
перитонеальные макрофаги *101–102*
периферическое формирование толерантности *121*, *130*
периферический супрамолекулярный комплекс (pSMAC) *129*
пероксидаза *36*
пероксидаза хрена *211*
пероксинитриты *37*
перфорины *42*
перфорин-1 *223*
плазматические клетки (плазмоциты) *137*
плазмоцитомы *185*
плазмин *25*
поливалентные антигены *153–154*
поликлональные антитела *183*
полиэтиленгликоль (ПЭГ) *186*
поляризующие цитокины *133–134*
последовательность ITAM *82*
последовательность GAS *85*
последовательность ISRE *85*
пре-В-клетка ранняя *118*
пре-В-клетка поздняя *118*
преимущественные дефициты антител *219–221*
пре-про-В-клетки *116–117*
пре-Т-клетки *105*
преципитация *178–179*, *190–196*
прививка *97*
про-В-клетка ранняя *117*
про-В-клетка поздняя *118*
провоспалительные цитокины (интерлейкины) *63–64*

пропердин (фактор P) *47*, *50*
простагландины *25*
простая радиальная иммунодиффузия по Манчини *192–193*
протеаза ICE *61–62*
протеинкиназа B *91*
протеинкиназа C *91*
протектин (белок CD59) *53*
процессинг антигена *123–128*
прямая (активная) гемагглютинация *196–197*
прямая иммунофлюоресценция *206–207*
псориаз *233*
пути активации системы комплемента *47–52*

P

радиоиммунологический анализ (РИА) *209–210*
развернутая (пробирочная, объемная) реакция агглютинации *189*
ракетный иммуноэлектрофорез *195*
рассеянный склероз *232–233*
растворимые антигены *155*
растворимые PRRs *60–61*
реакции агглютинации *189–190*
реакции бактериолиза *204*
реакции гемагглютинации *196–200*
реакции иммунофлюоресценции (РИФ) *206–209*
реакции нейтрализации *205–206*
реакции преципитации *190–196*
реакции с участием комплемента *200–205*
реакция кольцепреципитации *190*
реакция Кумбса *197–198*
реакция локального гемолиза (метод «бляшек») *202–203*
реакция связывания комплемента (РСК) *200–202*
реакция торможения (ингибирования) гемагглютинации (РТГА) *198–200*
реакция цитотоксичности *204–205*
реаранжировка генов α-цепей TCR *110–111*
реаранжировка генов β-цепей TCR *109–110*
реаранжировка генов легких цепей иммуноглобулинов *118–119*, *173–174*
реаранжировка генов тяжелых цепей иммуноглобулинов *117–118*, *175–176*
ревматоидный артрит *233*
ревматоидный синдром *230–231*
ревматоидный фактор *233*
регуляторные белки системы комплемента *47*, *52–53*, *230–231*
регуляторные Т-лимфоциты (T_{REG}) *105*, *114–115*, *144*, *226*
редактирование рецептора *120*
рекомбиназы RAG1 и RAG2 *109*, *117*, *118*, *120*, *174*, *217–218*
рецепторы для интерлейкинов семейства IL-1 *85*
рецепторы для интерферонов *83*
рецепторы для хемокинов *90–91*
рецепторы семейства NLRs *61*, *82*, *83*
рецепторы семейства RLRs *61*,*82*, *83*
рецепторы суперсемейства TNFR *89*

C

C1-эстераза (активированный C1) *47–49*
C3-конвертаза альтернативного пути активации системы комплемента *50*
C3-конвертаза классического пути активации системы комплемента *49*
C4-связывающий белок (C4bp) *47*, *52*
C5- конвертаза альтернативного пути активации системы комплемента *50*
C5- конвертаза классического пути активации системы комплемента *49*
секреторный иммуноглобулин A (sIgA) *167*, *168*
селезенка *13*, *144–145*
селективный дефицит IgA *221*
семейный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (FHL) *223*

семейства MAP-киназ *76*
семейство IL-1 *64–65*
серин-треониновые киназы *72*
серовар *156*
серогруппа *156*
серотип *156*
серодиагностика *189*
серотипирование *156*, *189*
серотонин *24–25*
серпин (ингибитор C1-эстеразы) *52*
синглетный (атомарный) кислород *36*
синдром APECED *226–227*
синдром аутоиммунной полиэндокринопатии (APS1) *113*
синдром Вискотта – Олдрича *222*
синдром Германски – Пудлака *224*
синдром Грисцелли второго типа (GSII) *223*
синдром ДиДжорджи *222*
синдром Иова (гипер-IgE-синдром) *221*
синдром Луи-Бар (атаксия-телеангиэктазия) *221–222*
синдром Незелофа (дисгенезия тимуса) *218*
синдром Ниймеген *222*
синдром Оменна *218*
синдром Пуртильо (X-сцепленный лимфопролиферативный синдром, болезнь Дункан) *224*
синдром Шегрена («сухой» синдром) *236*
синдром Чедиака – Хигаси *223*
система H2 *9*
система HLA *9*
система комплемента *13*, *16*, *43–55*
системная красная волчанка (СКВ) *150*, *230–231*, *235–236*
склеродермия *236*
С-лектиновые рецепторы *34*, *60*, *81*
С-лектины фагоцитов *34*, *60*
слизистые оболочки *17–24*
сложные антигены *155–156*
созревание аффинности *136*
соматические антигены (О-антигены) *156*
соматические гипермутации (SHM) *136*
сортировка клеток с помощью флюоресцентно-меченных антител *207–208*
сосудистая реакция *25*
спермин *20*
С-реактивный белок (протеин) *26*
стадиоспецифичность антигенная *157*
стволовые лимфоидные клетки *105*
стволовые миелоидные клетки *28*
субкапсулярный корковый слой лимфоузла *143*
субкапсулярный корковый слой тимуса *106–107*
супероксид-анион (надпероксидный анион) *36*
супероксиддисмутаза *36*
суперсемейство белков факторов некроза опухолей (TNFSF) *66*
сурфактанты *20*
«сухой» синдром (синдром Шегрена) *236*
схема получения моноклональных антител *187*
сыворотки *6*, *97*, *183–184*
сывороточный амилоидный протеин *26*
сывороточный иммуноглобулин А *167*, *168*

Т

тапасин *127–128*
теория иммунитета гуморальная *7*
теория иммунитета фагоцитарная *7*
теория клеточного иммунитета *7*
тетраметилбензидин (ТМБ) *211*
тетраметилромадинизотиоцианат (ТРИТЦ) *206*
тимидин *186*
тимидинкиназа *186*
тимозины *144*
тимопоэтин *144*
тимулин *144*
тимус (вилочковая железа) *13*, *104*

типоспецифичность антигенная *157*
типы (формы) антигенной специфичности *157*
типы легких цепей иммуноглобулинов *165–166*
типы тяжелых цепей иммуноглобулинов *165*
TIR-домен *79*, *85*, *87*
тиреоидит Хашимото *232*
тиреотоксикоз (базедова болезнь, болезнь Грейвса) *232*
тирозинкиназа Lck *131*
тирозинкиназа Tyk-2 *221*
тирозинкиназа ZAP-70 *131*
тирозинкиназы сигнальных путей *72*
титр сыворотки *190*
тканевые макрофаги *29*
Т-киллеры *105*, *114*, *138*, *233*, *234*
Т-клеточная зона лимфоузла *143*
Т-клеточная зона пейеровой бляшки *23*
Т-клеточная зона селезенки *145*
Т-клеточный рецептор (TCR) *106–108*
Т-лимфоциты *99*, *103–115*
Т-лимфоциты-эмигранты *114*
Т1-незрелые В-лимфоциты *116*, *120*
Т2-незрелые В-лимфоциты *116*, *120–121*
Т3-клетки *121*
толерогены *156*
толл-подобные рецепторы (TLRs) *57–59*, *229*
точка эквивалентности в реакциях агглютинации (преципитации) *179*
транзиторные В-клетки *120*
трансплантационные антигены *156*
трансформирующий фактор роста β (TGFβ) *134*, *221*, *235*
трехкооперативное клеточное взаимодействие *100*
тримерные формы G-белков *91*
тучные клетки *13*, *28*, *32–33*
Т-хелперы *100*, *105*, *114*, *129*, *133–139*
Т-хелперы 0 (наивные Т-хелперы) *129*
Т- хелперы подтипа 1 *133*, *137–138*, *139*, *150–151*, *233*, *234*
Т-хелперы подтипа 2 *133–134*
Т-хелперы 17 *105*, *133*, *139*
Т-хелперы фолликулярные (T_{FH}) *134*, *136*
тяжелая врожденная нейтропения (SCN) *227*
тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИД) *216–219*
тяжелая комбинированная иммунная недостаточность (ТКИН) *216–219*
тяжелые цепи иммуноглобулинов (Н-цепи) *158–161*

У

убиквитин *74*
убиквитинлигаза cIAP1 *90*
убиквитинлигаза cIAP2 *90*
узел лимфатический *13*, *142–143*
улучшение качества поликлональных сывороток (антител) *183–185*
условия взаимодействия антиген – антитело *177–178*

Ф

Fab-часть молекулы иммуноглобулина *160*
Fc-часть молекулы иммуноглобулина *160*
фаголизосомная НАДФ-оксидаза *36*
фаголизосомы *35*
фагосома *34–35*
фагоцитарная теория иммунитета *7*
фагоцитоз *16*, *28–40*
фагоцитоз незавершенный *38*
фагоциты *28–40*
фаза взаимодействия в реакции антиген – антитело *178*
фаза проявления в реакции антиген – антитело *178*
фазы воспаления *24–27*
фактор B *47*, *50*
фактор D *47*, *50*,
фактор I *47*, *52*

фактор P (пропердин) *47*, *50*
фактор гомологичной рестрикции (ФГР) *53*
фактор некроза опухолей α *25*, *66*, *89*
фактор некроза опухолей β (лимфотоксин α) *66*
фактор роста и созревания B-лимфоцитов (IL-7) *117*
фактор роста T-лимфоцитов (IL-*2*) *133*
фактор созревания и роста B-лимфоцитов (IL-7)
фактор транскрипции AP-1 *73*, *77*, *135*
фактор транскрипции Bcl-6 *134*
фактор транскрипции FOXP3 *134*, *226*
фактор транскрипции GATA-3 *133*
фактор транскрипции NFAT *73*, *75*, *131*, *135*
фактор транскрипции NFκB *73*, *78*, *90*, *131*, *135*, *220*
фактор транскрипции PAX5 *117*
фактор транскрипции RORγ *134*
фактор транскрипции T-Bet *133*
фактор, ускоряющий диссоциацию (ФУД) *53*
факторы транскрипции C/EBPs *88*
фибриллин-1 *235*
фикоэритрин *206*
флюоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ) *206*
флюоресцентно-меченные антитела (иммуноглобулины) *206–209*
флюорохромы *206*
фолликул вторичный (герминативный центр) *136*, *143*
фолликул первичный *136*, *143*
фолликулярные B-лимфоциты (B2-лимфоциты) *121*
фолликулярные дендритные клетки *136*
фолликулярные T-хелперы (T_{FH}) *136*, *144*
формирование толерантности периферическое *121*, *130*
формирование толерантности центральное *113*, *120*
фосфатидилинозитол-бифосфат (PIP_2) *74*
фосфатидилинозитол-трифосфат (PIP_3) *74*
фосфатидилинозитол-3-киназа (PI_3K) *74*, *135*
фосфолипаза C (PLC) *74*, *131*
фосфолипаза Cβ (PLCβ) *91*
функции доменов иммуноглобулинов *163–165*
функции иммуноглобулинов *172–173*
функциональная антигенная специфичность *157*

Х

хемокины *68–69*, *91–92*
хемокиновые рецепторы *90–91*
холодовые антитела *178*
хромогены *211*
хроническая гранулематозная болезнь (ХГБ) *228*
X-сцепленная агаммаглобулинемия Брутона *219*
X-сцепленный лимфопролиферативный синдром (синдром Пуртильо, болезнь Дункан) *224*
X-сцепленная нейтропения (XLN) *227*
X-сцепленный синдром дисрегуляции иммунитета, полиэндокринопатии и энтеропатии (IPEX-синдром) *226*
X-сцепленная ТКИН, связанная с дефицитом γ(c)-цепи рецепторов для интерлейкинов *217*

Ц

центральное формирование толерантности *113*, *120*
центральный супрамолекулярный комплекс (cSMAC) *129*
циклическая нейтропения (CN) *227*
цитокиновая сеть *70–71*
цитокины *14*, *63–67*
цитотоксическая гиперчувствительность *149*
цитотоксические T-лимфоциты (CTL) *138*

цитотоксические Т-лимфоциты подтипа 1 (Tc1) *139–140*
цитотоксические Т-лимфоциты подтипа 2 (Tc2) *139–140*

Ш

шарнирный участок иммуноглобулина *159*

Щ

щелочная фосфатаза *211*
щель Бьоркмана *127*

Э

эйкозаноиды *25*
электросинерез (встречный электрофорез) *195*
эозинофилы *13*, *28*, *31*
эпидермис *16*
эпителиоидные клетки *102*
эпитоп *153*, *177*

Я

Янус-киназы (Jak-киназы) *84–85*, *217*
Jak-STAT сигнальные пути *84–85*, *86*

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 3

КРАТКИЙ ИСТОРИЧЕСКИЙ ОЧЕРК РАЗВИТИЯ ИММУНОЛОГИИ 5

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ .. 13

1. ФАКТОРЫ ЗАЩИТЫ ВНУТРЕННЕЙ СРЕДЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ОТ ЧУЖЕРОДНЫХ АГЕНТОВ 15

1.1. Конститутивные факторы защиты 16
1.1.1. Непроницаемость покровов 16
1.1.2. Воспаление 24
1.1.3. Фагоцитоз 28
1.1.4. Естественные киллеры (NK-клетки) 40
1.1.5. Система комплемента 43

2. ВОСПРИЯТИЕ И ПЕРЕДАЧА ИНФОРМАЦИИ В ПРОЦЕССАХ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА 56

3. ИММУНИТЕТ К ИНФЕКЦИОННЫМ БОЛЕЗНЯМ 93

3.1. Развитие иммунного ответа на тимусзависимые антигены 98
3.1.1. Характеристика антигенпредставляющих клеток 101
3.2. Генез и характеристика Т-лимфоцитов 103
3.3. Генез и характеристика В-лимфоцитов 115
3.4. Взаимодействие клеток в ходе развития первичного иммунного ответа 123
3.5. Значение миграции лимфоцитов для развития иммунных ответов 142
3.6. Гиперчувствительность 146
3.7. Общие свойства антигенов 151
3.8. Химическое строение, функции и классификация антител 158
3.8.1. Генетические основы многообразия антител 173
3.8.2. Взаимодействие антигена и антитела 176

4. ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ. ПРИНЦИПЫ ПОСТАНОВКИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ *IN VITRO* 181

4.1. Реакции агглютинации 189
4.2. Реакции преципитации 190
4.3. Реакции гемагглютинации 196
4.4. Реакции с участием комплемента 200

4.5. Реакции нейтрализации 205
4.6. Реакции иммунофлюоресценции 206
4.7. Радиоиммунологический анализ 209
4.8. Иммуноферментный анализ 211
4.9. Иммуноблотинг (Western-анализ) 214

5. ИММУНОДЕФИЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА 216

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 238

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ 239

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ 240

Учебное издание

Песнякевич Александр Георгиевич

ИММУНОЛОГИЯ

Учебное пособие

Редактор *М. К. Чернякевич*
Художник обложки *Т. Ю. Таран*
Технический редактор *Л. В. Жаборовская*
Компьютерная верстка *С. Н. Егоровой*
Корректор *Л. С. Мануленко*

Подписано в печать 13.12.2018. Формат 70×100/16. Бумага офсетная.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 20,64. Уч.-изд. л. 23,7. Тираж 350 экз. Заказ 658.

Белорусский государственный университет.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/270 от 03.04.2014.
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Республиканское унитарное предприятие
«Издательский центр Белорусского государственного университета».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/63 от 19.03.2014.
Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.