

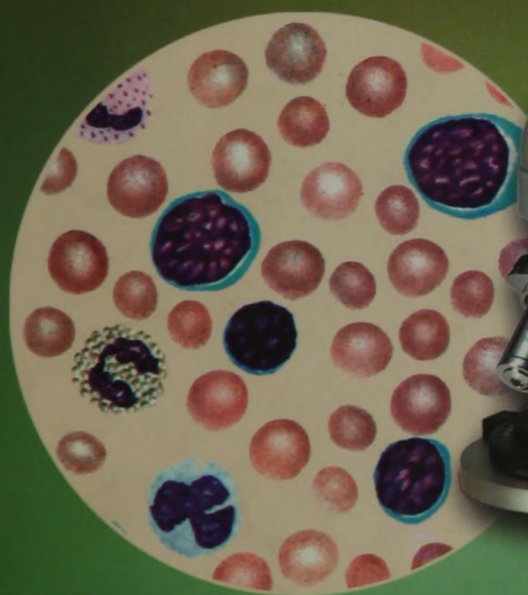


УЧЕБНИК

В.Н.Кисленко, Н.М.Колычев

# ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

## ЧАСТЬ 2. ИММУНОЛОГИЯ



«КолосС»



**МЕЖДУНАРОДНАЯ АССОЦИАЦИЯ «АГРООБРАЗОВАНИЕ»**



**В. Н. КИСЛЕНКО, Н. М. КОЛЫЧЕВ**

# **ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ**

**Часть 2. ИММУНОЛОГИЯ**

Допущено Министерством сельского хозяйства Российской Федерации в качестве учебника для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности 111201 «Ветеринария»



**МОСКВА «КолосС» 2007**

УДК 575:636(075.8)  
ББК 28.674я73  
К44

Редактор *Е. В. Ярных*

Рецензенты: академик РАСХН, профессор *А. С. Донченко*; член-корреспондент РАСХН, профессор *Ф. И. Василевич*; зав. кафедрой эпизоотологии и ветсанэкспертизы, доктор ветеринарных наук, профессор *И. И. Гуславский*

**Кисленко В. Н., Кольчев Н. М.**  
К44 **Ветеринарная микробиология и иммунология. Часть 2. Иммунология.** — М.: КолосС, 2007. — 224 с.: ил. — (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений).  
ISBN 978—5—9532—0405—7 (Ч. 2)  
ISBN 978—5—9532—0403—3

В учебнике изложены современные представления об антигенах, в том числе об антигенах микроорганизмов, о защитных механизмах макроорганизма (иммунная система, клетки, осуществляющие иммунный ответ, антитела, клеточные рецепторы для них и комплемент, иммунный ответ организма), о регуляции иммунного ответа, иммунодефицитах и прикладной иммунологии.

Для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Ветеринария».

УДК 575:636(075.8)  
ББК 28.674я73

ISBN 978—5—9532—0405—7 (Ч. 2)  
ISBN 978—5—9532—0403—3

Издательство «КолосС», 2007

---

## ВВЕДЕНИЕ

●

Современное представление об иммунитете неразрывно связано с развитием концепции о биологической индивидуальности, т. е. о существовании индивидуальных структурных различий между населяющими Землю микро- и макроорганизмами на молекулярном уровне. Соматические и молекулярные различия организмов обусловлены уникальным строением нуклеиновой кислоты, что выражается неповторимой структурой молекул поверхностных мембран клеток и их метаболитов (например, экзотоксинов). Эти молекулы являются как бы отметинами особого устройства ДНК или РНК у данной клетки и сохраняются до тех пор, пока нуклеиновая кислота остается неизменной. Поскольку в определенном одно- или многоклеточном организме имеется всего одна нуклеиновая кислота или она всегда однотипна, каждый микро- или макроорганизм обязательно должен быть наделен генетически однородным набором подобных структур. Поэтому любое внедрение микробов или их метаболитов в макроорганизм, появление в нем собственных мутировавших клеток, по существу, представляет покушение на биологическую индивидуальность последнего и сопровождается специфической защитной реакцией организма. При этом клетки, органические соединения или отдельные молекулы, несущие на себе признаки генетической чужеродности, отождествляют с *антигенами*, а защитную реакцию, направленную на поддержание генетического постоянства макроорганизма — с *иммунитетом* (от лат. *immunitas* — освобожденность).

Специфическая реакция организма на антигенное раздражение называется *иммунным ответом*, в результате которого в организме вырабатываются специфические *антитела* и формируются специфически *сенсibilизированные лимфоциты*. Они соответственно нейтрализуют или разрушают индуцировавшие их антигены. Поэтому иммунную реакцию относят к *индуцибельным защитным механизмам* макроорганизма.

Несмотря на важную роль специфических механизмов защиты, выживание отдельных организмов и целых видов животных вряд ли было бы возможным без наличия уже готовых противомикробных факторов в интактном макроорганизме. Такие врожденные защитные механизмы хозяина называют *конститутивными*, а со-



ставляющие их клеточные и гуморальные компоненты — *факторами естественной резистентности*. Конститутивные механизмы также осуществляют надзор за генетическим постоянством внутренней среды и участвуют преимущественно в разрушении и выведении из организма антигенов, причем им присуща уже групповая специфичность.

Однако невосприимчивость макроорганизма обусловлена не только названными защитными механизмами. Во многих случаях определяющее значение имеет отсутствие в организме животного определенного вида необходимых для возбудителя ростовых веществ или рецепторов для их токсических метаболитов, причем данная видовая особенность животных передается по наследству.

Следовательно, невосприимчивость животных к инфекционным болезням можно подразделить на *врожденную*, обусловленную наследуемыми факторами, препятствующими размножению патогенных микробов или реализации их токсических свойств, и *приобретенную*, обусловленную системой иммунитета. Факторы естественной резистентности, очевидно, играют важную роль при обоих типах невосприимчивости, поскольку каждый из них сопряжен с необходимостью дезинтеграции и элиминации (удаления) антигенов.

Приобретенный иммунитет принято подразделять на активный и пассивный. В первом случае невосприимчивость приобретается в результате переболевания (*естественный активный иммунитет*) или вакцинации животных (*искусственный активный иммунитет*), а во втором — в результате передачи потомству материнских антител (*естественный пассивный иммунитет*) или введения животному иммунной сыворотки (*искусственный пассивный иммунитет*). Активно приобретенный иммунитет длится несколько месяцев или лет, тогда как пассивный сохраняется несколько недель.

Если невосприимчивость сопровождается полной элиминацией возбудителя из организма, иммунитет называют *стерильным*; в случае сохранения невосприимчивости, пока в организме персистирует (сохраняется) возбудитель, иммунитет называют *нестерильным*.

---

# Глава 1

## АНТИГЕНЫ



*Антигены* (от лат. *anti* — против и *genus* — происхождение, род, племя) — генетически чужеродные вещества, способные вызывать в организме специфические иммунные реакции и взаимодействовать с продуктами этих реакций.

Первоначально термин «антиген» применяли для обозначения любой молекулы, индуцирующей образование В-лимфоцитами специфических *антител*. Однако теперь этот термин имеет более широкий смысл, означая любую молекулу, которую могут специфически распознавать элементы системы приобретенного иммунитета, т. е. В-лимфоциты или Т-лимфоциты, либо и те, и другие.

Молекулы антител связываются не со всей поверхностью инфекционного агента. В соответствии со своей специфичностью каждая из них взаимодействует с одним из многих видов антигенных молекул на поверхности микробов. Против одного возбудителя может синтезироваться несколько различных по специфичности антител, связывающихся с разными антигенами на его поверхности. Антитела взаимодействуют с определенной областью молекулы антигена, названной *эпитопом*. Один антиген может иметь несколько различных или повторяющихся эпитопов (рис. 1). Антитела специфичны именно к эпитопам, а не ко всей молекуле антигена.

Таким образом, формируется разнообразие антител, достаточное для связывания всех тех различных антигенов, с которыми организм может столкнуться в течение жизни.

### 1.1. РАСПОЗНАВАНИЕ АНТИГЕНА — ОСНОВА ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА

В распознавании антигенов участвуют помимо антител и В-клеток также Т-клетки, но эти последние распознают антигены в виде небольших полипептидных фрагментов, локализованных вначале внутриклеточно, а затем представленных на клеточной поверхности. За этот процесс ответственна специализированная группа так называемых МНС-молекул, кодируемых набором генов главного комплекса гистосовместимости (от англ. major histocompatibility complex).

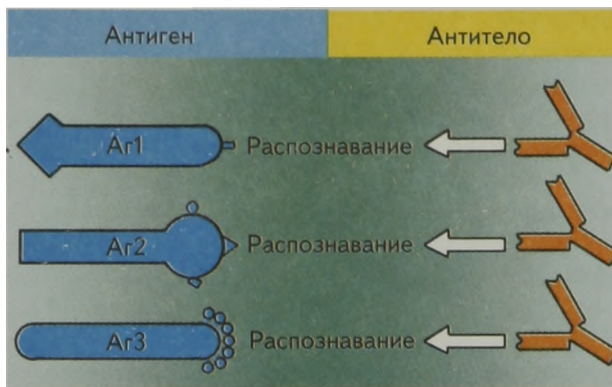


Рис. 1. Антигены.\*

Молекулы, вызывающие образование антител, называются антигенами. Каждая молекула антигена имеет набор антигенных детерминант, называемых эпитопами. Эпитопы одного антигена (Ag1) обычно отличаются от эпитопов другого (Ag2). Некоторые антигены (Ag3) имеют повторяющиеся эпитопы. Стереохимическая конфигурация эпитопов распознается антителами и Т-клеточными рецепторами, т. е. факторами приобретенного иммунитета. Каждая молекула антитела распознает не всю молекулу антигена, а один ее эпитоп. Даже самые простые по строению микроорганизмы обладают множеством различных антигенов белковой, липидной или углеводной природы

Эпитопы одного антигена (Ag1) обычно отличаются от эпитопов другого (Ag2). Некоторые антигены (Ag3) имеют повторяющиеся эпитопы. Стереохимическая конфигурация эпитопов распознается антителами и Т-клеточными рецепторами, т. е. факторами приобретенного иммунитета. Каждая молекула антитела распознает не всю молекулу антигена, а один ее эпитоп. Даже самые простые по строению микроорганизмы обладают множеством антигенов белковой, липидной или углеводной природы.

Т-клетки распознают посредством своих антигенспецифических рецепторов (ТкР) пептидные фрагменты антигена, связанные с этими МНС-молекулами (рис. 2).

Важно запомнить, что антиген — это инициатор и движущая сила всех реакций приобретенного иммунитета. Иммунная система возникла для распознавания и разрушения чужеродных антигенов, а также устранения источника их образования — бактерий, инфицированных вирусом клеток и т. п. Когда антиген элиминирован, иммунный ответ прекращается.

Вещества, которые вызывают иммунные реакции и взаимодействуют с их продуктами, называют *полноценными антигенами*; вещества, взаимодействующие лишь со специфическими продуктами организма, называют *неполноценными антигенами*, или *гаптенами*.

Антигенами для организма могут быть собственные клетки с измененным геномом и образуемые ими молекулы; клетки друго-

\* Здесь и далее приведены рисунки по А. Ройт, М.: Мир, 2000.

го животного, растительного организма и синтезируемые ими вещества; микроорганизмы, продукты их метаболизма или распада, а также синтетические органические молекулы. По химической природе они могут быть белками, полипептидами, полисахаридами, липополисахаридами или нуклеиновыми кислотами.

Однако лучшими антигенными свойствами обладают вещества белковой природы и имеющие большую молекулярную массу. Из всех известных антигенов наилучшими считаются глобулины сыворотки крови животных. При этом важно учитывать *чужеродность антигенов*. Чем больше выражено генетическое родство между животными, тем хуже проявляются антигенные свойства их веществ. Белки сыворотки бычьей крови, например, не антигенны для крупного рогатого скота, слабо антигенны для мелкого рогатого скота и обладают выраженными антигенными свойствами для лошадей, кроликов, птиц и животных других видов.

Антигенность, таким образом, зависит от природы, молекулярной организации и степени родства генетически чужеродных ве-



Рис. 2. Распознавание антигена Т-клеткой.

Т-клетки распознают антигены, вначале локализованные внутриклеточно, а затем появляющиеся на поверхности других клеток, например вирусные пептиды из инфицированных клеток. Распознавание происходит путем специфического связывания с антигенными пептидами, презентированными на клеточной поверхности МНС-молекулами — продуктами генов главного комплекса гистосовместимости (МНС). Распознавание уникального комплекса антигенный пептид + МНС-молекула Т-клетки осуществляют посредством своих антигенспецифических рецепторов (ТкР). В отличие от В-клеток, распознающих определенный участок молекулы антигена, Т-клетки распознают эпитоп, образованный аминокислотными остатками антигенного пептида и МНС-молекулы

ществ и служит их качественной характеристикой. Обычно говорят о большей, меньшей или слабой способности таких веществ вызывать иммунный ответ организма.

Независимо от природы по физическому состоянию антигены подразделяют на корпускулярные (частицы) и растворимые (молекулярно-дисперсные). Те и другие обязательно имеют концевые структуры, обычно выступающие над поверхностью молекулы антигена, — антигенные детерминанты. Участки детерминант, специфически связывающиеся непосредственно антителами, называют *гаптенной группой*, которые в зависимости от свойств окружающей среды структурно могут оформляться по-разному, удерживаясь на носителе силами Ван-дер-Ваальса.

Гаптены, являясь неантигенными молекулами, при соединении с белком определяют его специфичность: при введении в организм животного конъюгированного с белком гаптена специфические антитела образуются именно к последнему, а не к носителю. Подобным образом синтезируются антитела к неантигенным веществам, с которыми контактирует организм (сульфаниламидные препараты, антибиотики, пикриловая кислота, фенолфталеин и др.), что приводит к развитию *аллергии*. По-видимому, в большинстве случаев роль *аллергенов* (антигенов, вызывающих аллергию) выполняют *гаптены*.

Растворимые антигены содержат более или менее однородные, а корпускулярные антигены, как правило, — разнородные антигенные детерминанты. Но количество их на полноценном антигене всегда большое, поэтому их считают поливалентными.

## 1.2. АНТИГЕНЫ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

По специфичности их подразделяют на видовые, групповые, органические и стадийноспецифические.

*Видовая специфичность* антигенов лежит в основе иммунных реакций и позволяет дифференцировать животных различных видов. Видоспецифические свойства антигенов используются в судебной экспертизе, при идентификации хозяев крови, ветсанэкспертизе для определения фальсификаций мяса и мясопродуктов путем применения антивидовых сывороток. Максимально видоспецифическими свойствами обладают сывороточные белки. Поэтому лечебные сыворотки и тканевые вакцины стремятся получать на видоидентичных животных, а при введении животным чужеродных лечебно-профилактических препаратов учитывают возможные последствия антигенного несоответствия вводимых белков.

*Групповая специфичность* характеризует антигенные различия животных по полисахаридам эритроцитов, белкам сыворотки крови, поверхностным антигенам ядерных соматических клеток. Ан-



тигены, обуславливающие внутривидовые различия индивидуумов или групп особей между собой, называют *изоантигенами* (например, групповые эритроцитарные антигены, трансплантационные антигены). Наличие группоспецифических антигенов учитывается при переливании крови, пересадке органов и тканей, а также используется в селекционной работе в качестве естественных генетических маркеров.

*Органоспецифичность* связана с неодинаковой антигенностью обычно изолированных от иммунной системы органов, таких, как мозг, хрусталик глаза и сперматозоиды. При нарушении гистогематобарьеров антигены этих органов могут иммунизировать собственный организм, поэтому их называют *аутоантигенами*. В результате аутоиммунизации происходит повреждение органов и нарушение их функций. Часто регистрируют также случаи бесплодия скота из-за выработки в организме самок антител к семени определенных производителей. Чем чаще самку осеменяют таким производителем, тем выше в ее организме титр антител к его спермиям и тем меньше шансов на оплодотворение. Чтобы избежать подобных ситуаций, предназначенных для осеменения самок проверяют на наличие антител к конкретной сперме.

При раковых, лучевых, ожоговых, холодовых, медикаментозных поражениях, микробных инфекциях и интоксикациях могут развиваться аутоиммунные процессы, обусловленные появлением в организме антигенов с патологической специфичностью.

*Стадиейспецифические* антигены возникают в процессе эмбриогенеза и четко характеризуют определенный этап внутриутробного развития животного, отдельных его паренхиматозных органов. Эти антигены поступают в кровотоки матери и вызывают образование антител. По этим антителам можно определить глубину стельности, протекание дифференцировки эмбриональных тканей, а также тератогенные свойства вводимых беременным животным веществ.

В некоторых случаях присутствие в крови взрослых животных стадиейспецифических антигенов используют в качестве показателя функционального состояния отдельных внутренних органов. Например, при раке печени в сыворотке крови появляются альфа-фетопротеины, обычно синтезируемые фетальной печенью.

### 1.3. АНТИГЕНЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Антигены бактерий по локализации подразделяют на капсульные, соматические, жгутиковые и антигены экзопродуктов.

*Капсульные*, или *K-антигены*, являются внешними постоянными структурами поверхности микробной клетки. По химическому строению их идентифицируют в основном как полисахариды,

хотя прежнее подразделение К-антигенов эшерихий на L- и В-термолабильные антигены допускало и белковую природу этих структур. Их основу у пневмококков составляют повторяющиеся сахара — D-глюкоза, D-галактоза и L-рамноза.

В антигенном отношении капсульные полисахариды неоднородны. У пневмонийных стрептококков, например, различают более 80 серологических вариантов (сероваров), что широко используется в диагностической и лечебно-профилактической работе. К более однородным К-антигенам полисахаридной природы относят Vi-антигены энтеробактерий, бруцелл, франциселл; белково-полисахаридной природы — V—W-антигены иерсиний; белковой природы — М-протеин стрептококков группы А, протеин А стафилококков, К-88 и К-99 антигены эшерихий.

Из других внешних структур, обладающих антигенными свойствами, можно назвать корд-фактор микобактерий, полипептидные капсулы сибиреязвенного микроба, но из-за непостоянства их не относят к капсульным антигенам.

*Соматические*, или *О-антигены*, представляют собой боковые полисахаридные цепи липополисахаридов стенки грамотрицательных бактерий (эндотоксина), выступающие над поверхностью микробной клетки. Завершающиеся различными концевыми сахарами и оформленные по-разному, стерически они, по существу, представляют антигенные детерминанты. У сальмонелл насчитывают около 40 таких детерминант, до четырех на поверхности одной клетки. По их общности сальмонелл объединяют в О-группы. Однако специфичность О-антигена сальмонелл связана с дидезоксигексозами (паратозой, колитозой, абеквзой, тивелозой и аскарилозой), уникальные С-концевые участки которых наиболее удалены от поверхности клетки и непосредственно связываются с активными центрами антител.

Белковая часть О-антигена (вернее, эндотоксина) ответственна за антигенные связи энтеробактерий, т. е. за неспецифические серологические реакции.

Соматическими эти антигены назвали, когда еще не знали точной их локализации. Фактически и К-, и О-антигены являются поверхностными, с той лишь разницей, что К-антиген всегда экранирует О-антигены. Поэтому для обнаружения О-антигена взвесь исследуемых бактерий подвергают предварительной температурной обработке.

*Жгутиковые*, или *H-антигены*, имеются у всех подвижных бактерий. Они представляют собой термолабильные белковые комплексы жгутиков, обладающие у многих энтеробактерий двумя наборами детерминант — специфической (первой) и неспецифической (групповой, или второй) фазой.

Полная антигенная формула грамотрицательных бактерий записана в последовательности О : Н : К. Антигены при этом являются наиболее стабильными маркерами определенных возбудите-

лей, благодаря чему удается сделать серьезный эпизоотологический или эпидемиологический анализ.

Антигены *экзопродуктов* включают метаболиты бактериальной клетки белковой природы, среди которых наиболее изучены экзотоксины. Антигенные свойства экзотоксинов характеризуются высокой специфичностью и сохраняются после обработки формальдегидом в невысоких концентрациях. Обработанный подобным образом экзотоксин называют *анатоксином*, который используют в качестве вакцинного препарата.

Однако для экзотоксинов многих микробов характерна антигенная неоднородность. На этом основании экзотоксины *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Staphilococcus aureus* подразделяют на сероварианты.

Антигенными свойствами обладают также бактериальные споры. Они содержат антиген, общий вегетативной клетке, и собственно споровый антиген.

Таким образом, постоянные, временные структуры и формы бактерий, а также их метаболиты обладают самостоятельными антигенными свойствами, характерными, однако, для определенных видов микроорганизмов. Поскольку все они являются маркерами особого устройства ДНК у данного вида бактерий, часто на поверхности микробной клетки и в ее метаболитах содержатся общие антигенные детерминанты.

Последний факт имеет важное значение для совершенствования способов идентификации микроорганизмов. Так, например, вместо трудоемкой, дорогостоящей и не всегда воспроизводимой реакции нейтрализации для определения сероваров ботулинического микроба можно применять экспресс-метод, основанный на выявлении поверхностных детерминант при помощи реакции иммунофлюоресценции.

В отличие от антигенов другого происхождения среди бактериальных антигенов выделяют так называемые *протективные*, или *защитные*, антигены. Выработанные к этим антигенам антитела защищают организм от данного микроба. Протективными свойствами обладают капсульные антигены пневмококков, М-протеин стрептококков, А-протеин стафилококков, белок второй фракции экзотоксина сибиреязвенных бацилл, белковые молекулы нижних слоев стенки некоторых грамотрицательных бактерий и др. Очищенные протективные антигены не обладают пирогенными, алергизирующими свойствами, хорошо сохраняются и поэтому приближаются к идеальным вакцинным препаратам.

Протективные антигены обуславливают иммуногенность микробных антигенов. Антигены не всех микроорганизмов способны создавать одинаково выраженный иммунитет. Для повышения иммуногенности в ряде случаев антиген смешивают с *адьювантами* — неспецифическими стимуляторами иммуногенеза минеральной или органической природы. Чаше с этой целью используют

гидроокись алюминия, алюминиево-калиевые квасцы, ланолин, вазелиновое масло, липополисахарид бактерий, антигены бордетелл и др. Наиболее популярным у исследователей является адъювант Фрейнда, состоящий из вазелинового масла, ланолина (неполный адъювант) и липополисахаридов микобактерий туберкулеза (полный адъювант).

Сущность адъювантного действия названных препаратов заключается в сдерживании поступления смешанного с ними антигена в организм, что пролонгирует его иммунизирующее действие, снижает реактогенность, а в некоторых случаях вызывает бласттрансформацию. Однако при изготовлении антисыворотки для иммунохимического анализа, особенно с целью установления природы антигенов или антигенных связей, использования микробных адъювантов избегают, поскольку они снижают специфичность антисыворотки. Происходит это за счет гетерогенности, или гетерофильности, антигенов, т. е. антигенной общности микробов различных таксономических групп, тканей растений, животных и человека.

В основе антигенного родства, вероятно, лежит схожесть строения липидов или полисахаридов организмов отдаленных видов. Например, форсмановский антиген обнаружен в эритроцитах коз, овец, лошадей, морских свинок, кур. Эритроциты имеют антигенную связь с бактериями практически всех семейств, большая часть которых, в свою очередь, вступает в перекрестные серологические реакции с клетками тканей млекопитающих, птиц, рыб, червей, растений.

Благодаря наличию общих антигенных детерминант микробы легче преодолевают защитные барьеры организма и размножаются в нем, вызывая локальные или системные поражения. У некоторых патогенных микроорганизмов (например, холерного вибриона) эта черта сильно выражена и прямо коррелирует с их вирулентностью. Часто гетерогенность обуславливает перекрестные серологические и аллергические реакции, что приводит к искажению результатов диагностических исследований.

**Контрольные вопросы и задания.** 1. Дайте определение антигену. 2. Что называют эпитопом? 3. Каким путем и посредством чего происходит распознавание антигена? 4. Назовите основные отличия полноценных антигенов от неполноценных? 5. На какие группы подразделяют антигены животного происхождения? 6. Назовите антигены бактериальной клетки. 7. Дайте определение протективных антигенов и адъювантов.

---

## Глава 2

# ЗАЩИТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МАКРООРГАНИЗМА

●

### 2.1. ЕСТЕСТВЕННАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ

Сразу после рождения, а часто и в период внутриутробного развития организм животного атакуют мириады микробных антигенов, но на образование специфических факторов защиты нужно время. Поэтому поддержание генетического статуса организма осуществляется не только эффекторами иммунитета, т. е. сенсибилизированными лимфоцитами и специфическими антителами. В процессе эволюции у животных выработались специализированные системы защиты, существующие в организме в готовом виде с самых ранних этапов онтогенеза и имеющие более универсальный механизм разрушения микробов, причем универсальность их действия основана на общности точек первичного приложения и не является беспредельной. Точки первичного приложения представлены определенными структурами, которые повторяются у ряда микроорганизмов, часто далеко не родственных друг другу. Благодаря этому складывается впечатление о неспецифическом действии этих противомикробных факторов. Однако при более внимательном анализе механизма их действия выявляется определенная закономерность, позволяющая с уверенностью говорить о наличии у них групповой специфичности. Одни из них, например, избирательно дезинтегрируют грамотрицательные, другие — грамположительные бактерии, третьи преимущественно подавляют развитие в организме микробов, являющихся факультативными внутриклеточными паразитами. Поэтому под *естественной резистентностью* можно понимать врожденные внутренние механизмы поддержания генетического постоянства организма, обладающие широким диапазоном противомикробного действия.

Различают клеточные и гуморальные факторы естественной резистентности.

*Клеточные факторы* естественной резистентности участвуют в защите организма путем фагоцитоза и подразделены И. И. Мечниковым на макро- и микрофаги.

Клеточная система, включающая «профессиональные» макрофаги, обозначается теперь как система *моноклеарных фагоцитов* и состоит из промоноцитов, моноцитов и собственно макрофагов. Моноклеарные фагоциты, включенные в эту систему, берут на-



чало от костномозговых предшественников, транспортируются в периферическую кровь как моноциты. Затем через капиллярные стенки выходят в ткани, где становятся тканевыми макрофагами — гистиоцитами, купферовскими клетками, альвеолярными, свободными и фиксированными макрофагами лимфатических узлов, костного мозга, микроглии, серозных полостей и остеокластами.

Микрофаги представлены гранулоцитами — обычно зрелыми нейтрофилами и реже — эозинофилами.

Процесс фагоцитоза протекает стадийно: направленное перемещение клеток к объекту фагоцитоза (хемотаксис), захватывание и переваривание объекта фагоцитоза.

Хемотаксис осуществляется под действием пептидов фильтрата культур бактерий, комплемента (C3a, C5a, C5b67) и иммуноглобулинов классов G и M, полученных под воздействием SH-зависимой протеазы нейтрофилов (лейкогресин). Направленная миграция клеток в ответ на действие пептидов объясняется связыванием их с рецепторами клетки и последующим расщеплением под влиянием пептидазы. Мононуклеары, участвующие в реакции гиперчувствительности замедленного типа и других клеточных реакциях, передвигаются к объекту фагоцитоза под влиянием хемотаксических факторов, вырабатываемых лимфоцитами.

Кроме участия в хемотаксисе комплемент и иммуноглобулины стимулируют фагоцитоз путем *опсонизации* микробов (от лат. *orsono* — готовить в пищу). Под действием опсонических факторов изменяется поверхность микробных клеток и усиливается прикрепление (аттракция) их к внешней мембране фагоцитов. Различают два основных опсонических фактора сыворотки крови — термостабильный IgG и термолабильный C3. Комплемент в состоянии опсонизировать грамотрицательные бактерии в R-форме при отсутствии иммуноглобулинов. Специфические иммуноглобулины опсонизируют микробы самостоятельно, нормальные — в синергизме с C3. Усиливающийся эффект комбинированного воздействия объясняется также тем, что C3 определяет связывание частиц с фагоцитами, а IgG стимулирует их поглощение и разрушение.

Для распознавания и захватывания чужеродного материала на поверхностной мембране имеются рецепторы для Fc-фрагмента IgG и C3. Первый непосредственно взаимодействует с IgG, второй — с иммунными комплексами, образованными иммуноглобулинами всех классов. Опсонины связываются с поверхностью частиц и прикрепляют их к рецепторам фагоцитов. Это взаимодействие генерирует сигнал, который передается внутриклеточно и приводит к вытягиванию псевдоподий, примыкающих к прикрепленным частицам. Прикрепленные к частице филоподии формируют мембрану, покрывающую частицу, и она оказывается внутри клетки.

Переваривание начинается после умерщвления захваченных микробов. Фагоцитарная вакуоль сливается с лизосомами, образуя *фагосомы*. Под действием гидролитических ферментов совершается дезинтеграция частиц. В результате происходит так называемый *завершенный фагоцитоз*. При *незавершенном фагоцитозе* патогенные микроорганизмы не погибают, сохраняют способность к размножению и разрушению фагоцитировавшей клетки.

После обработки гидролазами моноклеаров иммуногенность антигена резко повышается. Образующаяся метаболически стабильная форма антигена в виде комплексов с РНК фагоцитов обеспечивает продолжительную стимуляцию Т- и В-лимфоцитов и иммунологическую память. Причем превращение антигена в иммуноген происходит эффективнее в клетках с более низкой концентрацией гидролаз, быстро и полно «перевариваемый» антиген не индуцирует образования антител, и фагоцитоз заканчивается фазой неспецифической защиты.

Неспецифическая фаза иммунитета проявляется самостоятельной способностью макрофагов разрушать или подавлять рост микроорганизмов внутри клеток, что определяет течение инфекционных болезней, вызываемых факультативными внутриклеточными паразитами — микобактериями туберкулеза, паратуберкулеза, лепры, бруцеллами, франциселлами, листериями, сальмонеллами, микоплазмами, нокардиями и др. Причем макрофаги иммунизированных этими микробами животных проявляют более высокую выживаемость и защитную активность не только к гомологичным, но и к гетерологичным бактериям. Например, проведен широкий производственный опыт, доказывающий реальную возможность профилактирования псевдотуберкулеза овец вакцинным штаммом БЦЖ. Эта непосредственная гуморальными факторами макрофагальная защита в данном случае носит групповой характер и не относится к внеклеточным микробам-паразитам.

Фагоциты, утилизируя антиген, не только освобождают организм от чужеродного материала, но и переводят его в формы, необходимые для индукции специфического иммунного ответа. Кооперируясь с Т-клетками, макрофаги участвуют в осуществлении ими функции клеточного иммунитета и при запуске В-клетками активизируют их вспомогательную функцию по выработке специфических антител. Т-клетки и иммуноглобулины, в свою очередь, становятся активаторами фагоцитоза. Таким образом, фагоцитоз как бы замыкает круг реакций, осуществляемых клеточными и гуморальными факторами иммунитета.

Интегрирующую роль фагоцитоз выполняет и в неспецифической защите. Захватывая и переваривая антигены, различные по происхождению и свойствам, зачастую без посредничества сывороточных белков, фагоциты осуществляют роль клеточного фактора естественной резистентности. Функционируя в таком виде,

они вместе с тем синтезируют ряд растворимых продуктов, которые вместе с иммуноглобулинами составляют гуморальные факторы естественной резистентности, обладающие важными защитными свойствами.

*Гуморальные факторы* естественной резистентности включают естественные, или нормальные, иммуноглобулины, лизоцим, бета-лизины, комплемент, пропердин и ряд других веществ, обладающих противомикробным действием.

Как и специфические иммуноглобулины IgG, IgM и IgA, естественные иммуноглобулины можно характеризовать с учетом более их низкой *аффинности* и большей зависимости от литических факторов естественной резистентности. Они служат источником хемотаксических пептидов, являются опсопинами, входят в рецепторный аппарат лимфоцитов и фагоцитов и в комбинации с комплементом вызывают лизис микроорганизмов.

*Лизоцим* — фермент с мурамидазной активностью. Его специфическая активность проявляется в гидролизе  $\beta$ -(1-4)-гликозидной связи полиаминосахаридов клеточной стенки микроорганизмов. Абсорбируясь на мукопептиде клеточной стенки, лизоцим расщепляет его с освобождением N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамина. В результате нарушается осмотическое равновесие и наступает гидролиз микробной клетки. Поскольку мукополипептид у грамположительных бактерий составляет фактически единственный слой стенки, лизоцим самостоятельно лизирует преимущественно грамположительные микроорганизмы. Поэтому последние используют в качестве тест-микробов при определении лизоцимной активности. Особенно популярным в этом отношении является *Micrococcus lysodeikticus*. Грамотрицательные микробные клетки лизоцим лизирует только в синергизме с комплементом, который, расширяя отверстия в липополипептидных слоях, обеспечивает доступ лизоциму к его субстрату.

Лизоцим синтезируется макро- и микрофагами, но первые выделяют его постоянно в процессе жизнедеятельности, вторые — лишь после разрушения. Попадая в лимфо-. кровоток и экскре-ты, лизоцим фактически насыщает все биологические жидкости организма. Например, у крупного рогатого скота он содержится в околоплодной жидкости, молозиве, содержимом тонкого кишечника, в сыворотке крови, в секретах слизистой оболочки глаз, носовой полости, потовых желез и других экскретах. Однако наибольшая концентрация регистрируется в околоплодной жидкости, затем в первых порциях молозива.

Лизоцим используют для консервирования черной икры, лечения желудочно-кишечных заболеваний у молодняка, мастита у коров, а лизоцимный показатель — в качестве критерия состояния фагоцитарной системы организма.

*Бета-лизины* играют вспомогательную роль в литическом дей-

ствии лизоцима. Они вырабатываются тромбоцитами и действуют на грамположительные микроорганизмы.

*Комплемент* состоит из девяти компонентов (C1...C9) глобулиновой природы и рассматривается как комплекс проэнзимов, требующих активации. Синтезируется комплемент преимущественно мононуклеарными фагоцитами. Первый компонент представлен тремя субъединицами (C1<sub>q</sub>, C1<sub>r</sub>, C1<sub>s</sub>). Под действием иммунного комплекса макромолекула C1 активируется путем последовательного включения в реакцию C1<sub>q</sub>, C1<sub>r</sub> и C1<sub>s</sub>, последний из которых и катализирует образование C3-конвертазы — фермента, расщепляющего третий компонент комплемента.

В реакции иммунного гемолиза показано, что стабилизированная ионами Ca<sup>2+</sup> макромолекула C1 физически связывается с мембраной сенсibilизированных гемолизинами эритроцитов (EA), образуя с нею комплекс EAC1, который присоединяет C4. С комплексом EAC14 реагирует C2, образуя активатор для C3 в виде C4b2a. При этом важную роль играют катионы магния и кальция. Последние два компонента фиксируют C3 и при взаимодействии с C1̄ (горизонтальная надбуквенная черта обозначает активированную форму фрагмента) расщепляют его молекулу на связанный с эритроцитами (b) и свободный (a) продукты.

Сочлененный с клеткой C3b является участком связывания C5, который расщепляется C5-конвертазой, образованной взаимодействием активированных компонентов C4̄, C2̄ и C3̄. К фиксированному на эритроцитах C5 присоединяются C6 и C7. Получившийся трехмолекулярный комплекс образует связь для одной молекулы C8, с которой посредством абсорбции связываются три молекулы C9. Терминальные компоненты, начиная с присоединения C5b, формируют трансмембранные каналы в эритроцитах, образование которых завершается после погружения в мембрану C9. В результате в эритроците образуются отверстия, через них из клетки выходят низкомолекулярные вещества, а внутрь поступает вода, которая повышает внутриклеточное осмотическое давление, что в конечном итоге приводит к разрыву клеточной оболочки.

Аналогичный повреждающий механизм отмечают и при взаимодействии комплемента с микроорганизмами, сенсibilизированными иммуноглобулинами.

Каскад ферментативных реакций, приводящий к последовательной активации всех компонентов комплемента, начиная с первого, называют *классическим путем активации комплемента*, т. е. в этом случае обязательна фиксация ранних компонентов комплемента. Однако добавление к сыворотке ЛПС бактерий, полисахаридов зимозана, инулина, пневмококка, полимера флагеллина вызывает усиленную активацию (фиксацию) поздних компонентов — C3... и т. д. Такой обходной путь, характеризующийся активацией поздних компонентов комплемента начиная с C3,



называется *альтернативным*. В настоящее время выделяют несколько вариантов альтернативного пути активации комплемента, который наблюдается только в отсутствии катионов кальция.

В защите от инфекции эффективно именно сочетание классического и альтернативного путей активации комплемента, связь которых осуществляется через С3b. Например, активация комплемента под действием липида А эшерихий происходит по классическому, а под действием полисахарида ЛПС этих же бактерий — по альтернативному пути. Не случайно поэтому фагоциты и В-лимфоциты имеют рецепторы именно для С3, а не для других компонентов комплемента.

Многие сельскохозяйственные животные (свиньи, лошади, рогатый скот) имеют слабоактивные ранние компоненты, поэтому фиксация их комплемента и, следовательно, проявление им литической активности почти всецело зависят от альтернативного пути активации. Для этого у животных данных видов существует особый природный альтернативный механизм, который называется *пропердиновым путем активации комплемента*.

Комплемент принимает участие в защите организма, выводя из него аллергены посредством комплексообразования и образования анафилатоксина, который представляет собой субкомпоненты С3 и С5 комплемента. Анафилатоксин увеличивает порозность капилляров, чем и способствует выведению аллергенов и иммунных комплексов из кровотока. Для этого один только С3 или С5 высвобождает гистамин из базофилоцитов быстрее, чем это происходит под действием аллергена. Причем процесс этот не сопровождается разрушением гранул базофилоцитов, они секретируют гистамин.

Таким образом, защитная функция комплемента обусловлена участием его компонентов в хемотаксисе, иммуноадгезии (прилипанию), лизисе сенсibilизированных клеток и анафилаксии. Следовательно, система комплемента функционирует синергично с системами клеточного и гуморального иммунитета.

*Пропердин* (от лат. *perdo* — губить, разрушать) открыт и описан в 1954 г. Он представляет собой белок, мигрирующий в бета-глобулиновой области. Находится в крови в виде предшественника, переход которого в пропердин связан с конформационными изменениями в молекуле белка. Под действием добавленных к сыворотке полисахаридов (ЛПС, зимозана, инулина) или IgA пропердин активируется и превращает С3-проактиватор (С3РА) в энзим, способный активировать С3 с образованием С3b. В этом и заключается сущность альтернативного пути активации комплемента.

Для синтеза превращающей С3-конвертазы необходимо наличие в сыворотке комплекса С3РА с С3b. Последний образуется под действием С3b-независимого или иницирующего фермента (IF).

Появившийся С3b соединяется с С3РА и делает его доступным



для расщепления и активации СЗРА-конвертазой. В результате появляется активный комплекс С3bBb, способный расщеплять С3 как в жидкости, так и на поверхности клеток и частиц.

Для предотвращения спонтанной активации альтернативного пути в сыворотке имеется регуляторный белок С3bINA. Путем расщепления С3bBb-конвертазы инактивирующее действие С3bINA усиливается  $\beta$ ИН-белком. Нативный пропердин, наоборот, стабилизирует С3/С5-конвертазу путем уменьшения скорости ее разрушения, в результате чего начинается лизис клеток. Пропердин, таким образом, является регулятором, усиливающим альтернативный путь. Сказанное можно проиллюстрировать опытом по влиянию пропердина на лизис клеток эшерихий. Система из С3, факторов В, D, С,  $\beta$ ИН-белка и компонентов С5, С6, С7, С8, С9 вызывает существенные морфологические изменения бактерий, которые дезинтегрируются под дополнительным воздействием лизоцима. При добавлении пропердина в физиологических количествах бактериолитическая способность системы увеличивается в 3 раза.

Помимо стабилизации С3bBb-конвертазы на поздних этапах гемолитического процесса пропердин выступает в качестве раннедействующего компонента альтернативного пути активации комплемента в результате образования медиаторных эритроцитов, присоединяясь к ним за счет разности зарядов. Эритроциты с адсорбированным пропердином могут быть лизированы последовательным действием позднедействующих компонентов комплемента С6...С9, причем этот процесс происходит без участия иммуноглобулинов.

В силу описанного механизма запуска альтернативного пути пропердин является основным литическим фактором у животных, содержащих гемолитически малоактивный комплемент (рогатый скот, лошади, свиньи и др.), играющим важную роль в защите от грамотрицательных микроорганизмов.

Иным механизмом противомикробного действия обладает *лактоферрин* — негеминовый гликопротеид с железосвязывающей активностью. Представлен он полипептидом с одной углеводной субъединицей молекулярной массой 77 000. Лактоферрин связывает два атома трехвалентного железа, конкурируя с микроорганизмами, из-за чего их рост ингибируется.

Лактоферрин синтезируется полиморфно-ядерными лейкоцитами и гроздьевидными клетками железистого эпителия. Он отсутствует в сыворотке крови и является специфическим компонентом секрета желез — молочной, слезных, слюнных, пищеварительного, дыхательного, мочеполового трактов и др. Поэтому лактоферрин можно считать фактором местного иммунитета, защищающим от инфекций эпителиальные покровы. С содержанием лактоферрина коррелируют также противомикробные свойства экскретов, например коровьего молока.

*Бактерицидная активность сыворотки крови (БАС)* является интегрированным выражением противомикробных свойств входящих в ее состав гуморальных факторов естественной резистентности. Основными системными бактериологическими компонентами являются лизоцим (против грамположительных микробов) и комплемент (против грамотрицательных микробов). Действие последнего специфически направляют иммуноглобулины. Компоненты БАС никогда не будут постоянными, несмотря на поддержание активности на одном уровне. Следовательно, при изучении факторов, определяющих БАС, каждый раз нужно учитывать содержание гуморальных компонентов. Лимитирующими БАС-факторами у здоровых новорожденных телят являются IgG, у больных острыми желудочно-кишечными заболеваниями — IgM, а при бронхопневмонии — комплемент.

Помимо системного имеется местный, или локальный, иммунитет. За него ответственны клеточные (Т-клетки, макрофаги, нейтрофилы) и гуморальные факторы (SIgA-, SIgM-лизоцим, лактоферрин и др.). При этом происходит максимальное взаимодействие между компонентами, поскольку известно, что Т-клетки регулируют активность макрофагов, последние являются продуцентами лизоцима, который усиливает бактерицидность секреторных иммуноглобулинов. Поэтому факторы, определяющие местный иммунитет, также надо учитывать индивидуально.

При внутриутробном развитии у копытных животных передача материнского иммунитета отсутствует. Иммунологический статус организма сельскохозяйственных млекопитающих в данный период характеризуется аутосинтезом защитных факторов тканью плода. При этом синтез факторов естественной резистентности опережает развитие механизмов специфического реагирования.

Из факторов естественной резистентности первыми появляются клеточные: вначале моноциты, затем нейтрофилы и эозинофилы. Еще в эмбриональном периоде они обладают захватывающей и переваривающей способностью. Причем последняя преобладает и существенно не изменяется даже после приема новорожденными животными молозива. К концу эмбрионального периода в крови животных накапливаются лизоцим, пропердин и в меньшей степени комплемент. С возрастом у плодов уровень этих факторов постепенно повышается. В предплодный и плодный периоды в фетальной сыворотке крови появляются иммуноглобулины в основном класса М и, реже, класса G. Они обладают функцией антител, преимущественно неполных. Однако с возрастом концентрация иммуноглобулинов, особенно IgG, изменяется неравномерно.

У новорожденных содержание всех факторов защиты повышается, но количественно лишь лизоцим достигает уровня, характерного для материнского организма; пропердина в это время, на-

оборот, больше, чем в сыворотке крови коров-матерей. После приема молозива содержание всех факторов, за исключением комплемента, в организме новорожденных и их матерей сближается. Концентрация комплемента не достигает материнского уровня даже в сыворотке крови 6-месячных телят.

Бактерицидная активность сыворотки крови по отношению к гладким формам эшерихий постоянно регистрируется лишь после рождения животных и приравнивается к уровню материнского организма в молозивный период. Шероховатые формы эшерихий лизирует и фетальная сыворотка крови сельскохозяйственных животных.

В амнионе и аллантоисе зародыша содержатся лишь лизоцим, продуцируемый макрофагами, и комплемент. Взаимодействие этих факторов контролирует практически всю микрофлору околоплодной жидкости. Однако корреляции между уровнем гуморальных факторов естественной резистентности в амниотической жидкости и сыворотке крови плодов не отмечается, что свидетельствует об их автономном синтезе.

Насыщение крови новорожденных копытных иммунными факторами происходит лишь колостральным путем. В молозиве коров содержатся в убывающем количестве IgG1, IgM, IgA и IgG2. Иммуноглобулин G1 примерно за 2 нед до отела селективно переходит из кровотока коров и накапливается в вымени. Остальные молозивные иммуноглобулины синтезируются молочной железой. В ней же образуются лизоцим и лактоферрин, которые вместе с иммуноглобулинами представляют гуморальные факторы локального иммунитета вымени.

Молозивные иммуноглобулины переходят в лимфо-, а затем кровотоки неизменными путем пиноцитоза. В криптах тонкого отдела кишечника имеются специальные клетки, избирательно транспортирующие молекулы молозивных иммуноглобулинов. Причем селективность перехода их, например у крупного рогатого скота, временная: IgG пиноцитируется в течение 27 ч, IgA — 22 ч, а IgM — 16 ч. Процесс перехода молозивных глобулинов связан с образованием гликокаликса и контролируется кортикостероидами. Иммуноглобулины лучше всасываются при спаивании телятам молозива в первые 4...5 ч путем подсоса или из поилки вблизи от матери.

В эмбриональный период развития в крови животных выявляются Т- и В-клетки, несущие на своей поверхности иммуноглобулиновые рецепторы. Несмотря на более выраженный клеточный иммунитет, плоды способны реагировать на различные антигены (в том числе и микробные) антителообразованием.

Экспериментальным введением в фетальную ткань крупного и мелкого рогатого скота, свиней и лошадей бактерий, вирусов, токсоидов и других антигенных препаратов обоснована возможность пренатальной иммунизации животных. Сформировавшиеся

плоды обычно четче отвечают на антигенный стимул, чем новорожденные животные, принявшие молозиво. Снижение иммунореактивности новорожденных животных в молозивный период связано с повышенным содержанием в крови сразу после рождения кортикостероидов, а также с доминирующей концентрацией в ней материнских IgG, которые конкурируют с иммуноглобулинами телят при взаимодействии с антигеном. Поэтому вакцинацию приплода целесообразно проводить до приема новорожденными животными молозива или через несколько недель, когда закончится элиминация материнских иммуноглобулинов.

У грызунов (например, кроликов) материнские антитела могут переходить в кровь плодов через желточный мешок, а потом с молозивом. Поэтому собственный иммуногенез у них довольно долго находится в подавленном состоянии.

У птиц (например, кур) материнские антитела передаются приплоду трансовариально. Они сохраняются в лецитиновой фракции желтка и, видимо, несущественно влияют на аутосинтез иммуноглобулинов эмбрионами.

Однако независимо от видовой принадлежности животных в раннем периоде онтогенеза патогенные микробы сравнительно легко вызывают различные эмбрио- и фетопатии. В итоге нарушаются процессы эмбриогенеза, а внутриутробно инфицированные животные после рождения отстают в развитии и вскоре заболевают. При нарушениях процессов сорбции молозивных иммуноглобулинов или при их недостатке в выпаиваемом молозиве у новорожденных телят развиваются приобретенные острые желудочно-кишечные заболевания.

Механизм естественной резистентности изменяется в соответствии с состоянием организма животных. У здоровых новорожденных телят бактерицидную активность сыворотки и фагоцитарную активность лейкоцитов крови определяют IgG. На начальных этапах развития острых желудочно-кишечных заболеваний, вызванных эшерихиями и сальмонеллами, лимитирующим фактором будет IgM, а на фоне развития врожденной бронхопневмонии кокковой этиологии – комплемент.

Макроорганизм способен одинаково специфично реагировать на аутоантигены, половые и соматические клетки другого организма, растительные и микробные антигены. Поэтому противoinфекционную защиту организма следует рассматривать как частный случай поддержания генетического постоянства его внутренней среды. Дифференцированная реакция организма на генетически чужеродные молекулы и структуры осуществляется при помощи морфологически обособленной и функционально специализированной иммунной системы.



## 2.2. ИММУННАЯ СИСТЕМА ОРГАНИЗМА

Иммунная система организма — это совокупность лимфоидных органов и тканей, генерирующих клетки, способные самостоятельно или путем синтеза антител специфически взаимодействовать с антигеном. В ее состав входят центральные и периферические органы. К центральным органам иммунной системы относят тимус, фабрициеву сумку, пейеровы бляшки и костный мозг. К периферическим органам причисляют кровь, лимфатические узлы и селезенку. Главным продуктом этой системы является *лимфоцит*.

*Тимус*, или *вилочковая железа*, закладывается в первый месяц эмбриогенеза. Ее масса достигает максимума к концу внутриутробного периода развития организма. С возрастом животных она инволюционирует, но совсем не исчезает. Кортикальный слой железы плотно заселен скоплениями малых лимфоцитов, отгороженными друг от друга эпителиальной тканью органа. Эти лимфоциты именуют Т-лимфоцитами.

*Фабрициева сумка (или бурса)* представлена в виде дивертикула клоаки птиц небольшим лимфоузлом с мозговой и корковой зонами. У кур она формируется между 12-м и 13-м днем эмбрионального развития, а после 7-й недели жизни цыплят начинает атрофироваться. В корковой зоне находятся зрелые, а в мозговой — незрелые лимфоциты.

*Пейеровы бляшки* локализованы под слизистой оболочкой тонкого кишечника, и лимфоциты в них упакованы подобно фабрициевой сумке.

*Костный мозг* является поставщиком гемопоэтических стволовых клеток — родоначальниц всех клеток крови, в том числе и лимфоидных стволовых клеток, которые затем дифференцируются в эффекторы иммунитета. Все эти клетки располагаются в ячейках ретикулярной стромы.

*Кровь* является дискретной тканью периферической иммунной системы, ее форменные элементы представлены отдельными лимфоидными клетками различного назначения и разной степени зрелости, а также гранулоцитами и моноцитами. Кровоток животных насыщается лейкоцитами за счет лимфы и лимфоидных органов уже в период эмбриогенеза, но не одновременно. У крупного рогатого скота в первые месяцы внутриутробного развития в периферической крови плода появляются лимфоциты, затем моноциты, эозинофилы и нейтрофилы. Лейкограмма периферической крови плодов крупного рогатого скота, начиная с двухмесячного возраста внутриутробного развития, характеризуется постоянным содержанием лимфоцитов. В начале онтогенеза они представлены преимущественно зрелыми, а с возрастом и незрелыми лимфоидными клетками. Моноциты поступают в периферическую кровь двухмесячных, а эозинофилы и нейтрофилы — трехмесячных эмбрионов.



*Селезенка* обладает собственно лимфоидной тканью (белая пульпа). Из-за отсутствия лимфатических сосудов белая пульпа посредством трабекул и синусов связана с кровотоком, снабжая его стволовыми и лимфоидными клетками. Построена белая пульпа по типу лимфатических узлов.

*Лимфатические узлы* — компактные образования, которые, кроме непосредственной связи с кровотоком, постоянно поставляют через грудной проток в переднюю полую вену лимфоциты, преимущественно малые.

### **2.2.1. ЛИМФОИДНЫЕ ТКАНИ ПЕРВИЧНЫХ И ВТОРИЧНЫХ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ И ОБРАЗОВАНИЙ**

- Лимфоидные органы и ткани относятся либо к первичным (центральным), либо ко вторичным (периферическим). Первичные лимфоидные органы — это тимус и красный костный мозг.

- Лимфоциты дифференцируются из стволовых лимфоидных клеток в первичных лимфоидных органах и мигрируют для выполнения своих функций во вторичные лимфоидные органы и ткани.

- Вторичные лимфоидные органы — это селезенка и лимфатические узлы; кроме того, в слизистых оболочках присутствуют участки вторичной лимфоидной ткани (лимфоидные образования), формирующие единую систему — лимфоидную ткань слизистых оболочек (ЛТС).

- Иммунный ответ на антигены, поступающие в организм через слизистые оболочки, начинается с примирования лимфоцитов, главным образом в пейеровых бляшках.

- Разные лимфоидные органы защищают различные системы организма: селезенка отвечает на антигены, циркулирующие в крови; лимфатические узлы реагируют на антигены, поступающие по лимфатическим сосудам, ЛТС защищает слизистые оболочки.

- Лимфоциты в большинстве — не оседлые, а циркулирующие клетки; они постоянно мигрируют из кровотока в лимфоидные ткани и вновь поступают в кровь через грудной лимфатический проток.

- Клетки, участвующие в иммунном ответе, для наиболее эффективного функционирования действуют в составе специализированных тканей и органов, образующих лимфоидную систему.

Функциональные клетки лимфоидной системы представлены лимфоцитами, вспомогательными клетками (макрофаги и антигенпрезентирующие клетки) и в некоторых тканях эпителиальными клетками. Все эти клетки функционируют в составе либо обособленных, окруженных капсулой лимфоидных органов, либо диффузных образований.

Первичные лимфоидные органы служат основным местом развития лимфоцитов. Здесь лимфоциты дифференцируются из стволовых лимфоидных клеток, размножаются и созревают в функциональные клетки. У млекопитающих Т-лимфоциты созревают в тимусе, а В-лимфоциты — в печени плода и в костном мозге. Птицы имеют особое место образования В-клеток — фабрициеву сумку. Именно в первичных лимфоидных органах формируется репертуар специфичностей лимфоцитарных антигенсвязывающих рецепторов, и лимфоциты приобретают, таким образом, способность распознавать любые антигены, с которыми организм может столкнуться в течение жизни. Далее эти клетки подвергаются отбору на толерантность к аутоантигенам, после чего уже в периферических лимфоидных органах или образованиях распознают только чужеродные антигены. В тимусе, кроме того, Т-клетки «учатся» узнавать собственные молекулы МНС. Вместе с тем известно, что некоторые типы лимфоцитов развиваются вне первичных лимфоидных органов.

Вторичные лимфоидные органы и образования представлены селезенкой, лимфатическими узлами и лимфоидной тканью слизистых оболочек, включая миндалины глоточного кольца и пейеровы бляшки подвздошной кишки. Вторичная лимфоидная ткань — это то микроокружение, в котором лимфоциты могут взаимодействовать с антигенами, между собой и со вспомогательными клетками. Для возникающего здесь иммунного ответа необходимы фагоцитирующие макрофаги, антигенпрезентирующие клетки, а также зрелые Т- и В-лимфоциты.

**Первичные лимфоидные органы.** Тимус — место размножения и созревания Т-клеток. У млекопитающих тимус (вилочковая железа) состоит из двух долей и расположен в грудной полости, над сердцем и крупными кровеносными сосудами. Каждая его доля состоит из долек, разделенных между собой соединительнотканными перегородками. Внутри каждой дольки лимфоидные клетки (тимоциты) образуют наружную, *корковую зону (кортекс)* и внутреннюю, *мозговую зону (медулу)*. В плотно заполненной корковой зоне преобладают относительно незрелые пролиферирующие тимоциты; в мозговой зоне находятся их более зрелые формы, в расположении которых виден градиент клеточной дифференцировки от корковой зоны к мозговой. Созревшие тимоциты мозговой зоны экспрессируют маркер CD44, отсутствующий на кортикальных тимоцитах. Этот маркер представляет собой рецептор, связывающий гиалуронат и другие компоненты внеклеточного матрикса соединительной ткани; он выявляется на всех циркулирующих, но не на оседлых лимфоцитах. Основу структуры тимусных долек составляет сеть эпителиальных клеток, которым принадлежит существенная роль в дифференцировке костномозговых предшественников тимоцитов, приводящей к образованию зрелых Т-лимфоцитов.

В тимусных дольках различают три типа эпителиальных клеток. По взаиморасположению, структуре, функции и фенотипу (набору) маркеров можно выделить не менее трех типов эпителия тимусной дольки. Основу корковой зоны образует сеть *кортикальных эпителиальных клеток*, и, кроме того, в ней присутствуют эпителиальные клетки-няни; в мозговой зоне эпителиальные клетки расположены главным образом в виде плотных скоплений — кластеров. Помимо этих клеток в корковой зоне, преимущественно на переходе ее в мозговую, присутствуют разветвленные клетки, переплетенные отростками — *дендритные интердигитальные клетки*, ИДК — и макрофаги (и те, и другие костномозгового происхождения). Поступление клеток в тимус и их выход из него происходят по дольковым венам с высоким эндотелием (ВЭВ). Все эпителиальные клетки, ИДК и макрофаги экспрессируют на поверхности молекулы МНС, важные для развития и отбора Т-клеток.

Мозговая зона тимусных долек содержит *тельца Гассала* (тельца вилочковой железы). Функция их остается неизвестной; как установлено, они состоят из деградирующих эпителиальных клеток, богатых высокомолекулярными кератинами.

Тимус млекопитающих претерпевает по мере созревания и старения организма обратное развитие. Оно начинается в период полового созревания и продолжается до конца жизни. Возрастная инволюция прежде всего захватывает корковую зону долек вплоть до полного ее исчезновения, при сохранности мозговой зоны. Атрофия корковой зоны обусловлена чувствительностью кортикальных тимоцитов к кортикостероидным гормонам надпочечников. Например, атрофией тимуса сопровождаются все состояния, сопряженные с повышенной секрецией стероидов, в частности беременность и стресс. Однако генерация Т-клеток в тимусе может происходить и у взрослой особи, хотя с низкой частотой.

**Участки размножения и созревания В-клеток.** Развитие В-клеток происходит в печени плода, а после рождения — в костном мозге. В-клетки образуются из стволовых клеток в островках гемопоэтической ткани печени и костного мозга плода, а также постнатального костного мозга. Кроме развивающихся В-клеток, в постнатальном костном мозге присутствуют зрелые плазматические и Т-клетки. Следовательно, костный мозг функционирует и как важный вторичный лимфоидный орган.

У птиц дифференцировка В-клеток происходит в фабрициевой сумке, складки которой содержат лимфоидные фолликулы, имеющие корковую и мозговую зоны.

**Вторичные лимфоидные органы и образования.** Из первичных лимфоидных органов образовавшиеся здесь лимфоциты перемещаются во вторичные, периферические лимфоидные ткани — плотно структурированные, инкапсулированные органы (селезенка и лимфатические узлы) и бескапсульные скопления. Не окру-

женные капсулой островки лимфоидной ткани, расположенные большей частью в слизистых оболочках, названы лимфоидной тканью слизистых оболочек.

Функции лимфоидной ткани слизистых оболочек отличаются от функций других органов лимфоидной системы в иммунном ответе. Селезенка отвечает на антигены, находящиеся в крови (в случае удаления этого органа у больного повышается восприимчивость к возбудителям, проникшим в кровоток). Лимфатические узлы защищают организм от антигенов, проникающих через кожу или слизистые оболочки и затем транспортируемых с лимфой по лимфатическим сосудам. Иммунный ответ на проникшие такими путями антигены складывается из секреции антител в кровоток и из местных клеточных реакций. В отличие от этого лимфоидная ткань слизистых оболочек защищает именно слизистые. В ЛТС происходит *примирование*, т. е. первый контакт иммунных клеток с антигеном, поступающим с поверхности эпителия. Лимфоидная ткань присутствует в слизистой оболочке кишечника, дыхательных путей (в частности, бронхов) и мочеполовых путей. Основной эффекторный механизм местного иммунного ответа на уровне слизистой оболочки — это секреция и транспорт секреторных антител класса IgA (sIgA) непосредственно на поверхность ее эпителия. Не удивительно, что большая часть лимфоидной ткани организма (более 50 %) находится в слизистых оболочках и особенно обильно представлена в кишечнике, поскольку через слизистые оболочки и проникают в основном антигены извне. По той же причине антитела IgA представлены в организме в наибольшем количестве относительно других изотипов антител.

Инкапсулированные вторичные лимфоидные органы. Селезенка расположена в левом верхнем квадранте брюшной полости, позади желудка и вплотную к диафрагме. Снаружи селезенка покрыта соединительнотканной капсулой из пучков коллагеновых волокон, которые проникают в паренхиму органа, образуя короткие перекладки (трабекулы). Вместе с ретикулярной стромой они создают структурный каркас для массы заполняющих селезенку разнообразных клеток. В селезенке различают два основных типа ткани: красную пульпу и белую пульпу (мякоть).

*Белая пульпа* состоит из лимфоидной ткани, образующей вокруг центральных артериол периартериолярные лимфоидные «муфты» (ПАЛМ). В ПАЛМ имеются Т- и В-клеточные области: Т-клетки непосредственно окружают центральную артериолу, тогда как В-клетки могут образовывать первичные, «нестимулированные» фолликулы (агрегаты никогда не встречавшихся с антигеном лимфоцитов) или вторичные, «стимулированные» фолликулы, содержащие центры размножения с клетками иммунологической памяти. В центрах размножения присутствуют также фолликулярные дендритные клетки и фагоцитирующие макрофаги. В краевой зоне, расположенной над мантией, локализованы



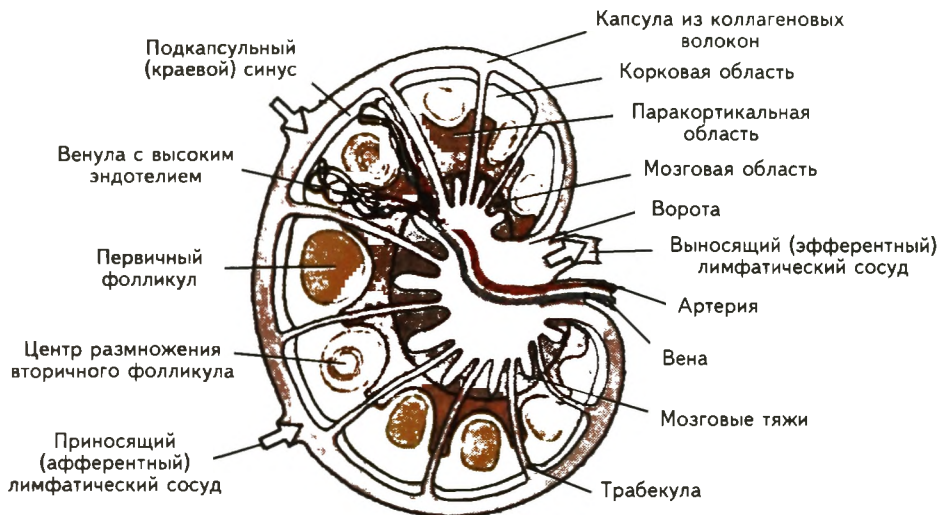
специализированные макрофаги и субпопуляции В-клеток, отвечающих на тимуснезависимые антигены II типа, например на полисахариды. Макрофаги и фолликулярные дендритные клетки в селезенке презентуют антигены В-клеткам. По входящим в краевую зону капиллярным ответвлениям центральной артериолы В-клетки и другие лимфоциты могут свободно поступать в ПАЛМ и покидать ее. Отдельные субпопуляции лимфоцитов, в частности созревающие плазмобласты, могут проходить через краевую зону в красную пульпу по сосудистым перемышкам.

*Красная пульпа* образована венозными синусоидами и клеточными тяжами (ретикулум), пространство между которыми заполняют оседлые макрофаги, эритроциты, тромбоциты, гранулоциты, лимфоциты и многочисленные плазматические клетки. Отметим, что помимо своих иммунологических функций селезенка выполняет функцию депонирования тромбоцитов, эритроцитов и гранулоцитов. В ней также разрушаются отжившие тромбоциты и эритроциты. Этот процесс, называемый *гемокатерезом*, протекает в красной пульпе. Осуществление депонирования и гемокатереза обеспечено особым строением кровеносной системы в селезенке. Окруженные ПАЛМ центральные артериолы оканчиваются капиллярами, которые свободно открываются в тяжах красной пульпы. Вследствие этого циркулирующие клетки, достигнув тяжей, задерживаются в них. Здесь макрофаги распознают и фагоцитируют отжившие тромбоциты и эритроциты. Не поглощенные и не разрушенные клетки крови возвращаются в кровоток, «протискиваясь» сквозь несплошную эндотелиальную выстилку венозных синусоидов через щели между клетками, свободно пропускающие поток плазмы.

Лимфатические узлы и лимфатическая система. Лимфатические узлы составляют часть системы, которая «вылавливает» антигены из тканевой жидкости и лимфы во время ее протекания от периферии к грудному протоку через главные лимфатические коллекторы. Лимфатические узлы обычно расположены в местах разветвления лимфатических сосудов. В стратегических пунктах системы — шейной, подмышечной и паховой областях, средостении и брюшной полости — они образуют скопления, собирающие лимфу из соответствующих поверхностных и глубоких областей тела. Лимфатические узлы, расположенные поверхностно и называемые подкожными, защищают кожу. Висцеральные (глубокие) лимфоузлы осуществляют защиту слизистых оболочек дыхательных путей, пищеварительного тракта и мочеполовых путей.

Лимфатические узлы — это образования округлой или бобовидной формы, диаметром 2...18 мм, с углублением для входа и выхода кровеносных сосудов, называемым *воротами*. Лимфа поступает в узел по нескольким приносящим (афферентным) лимфатическим сосудам и выходит из него по единственному выносящему (эфферентному) лимфатическому сосуду через ворота.





**Рис. 3. Схема строения лимфатического узла.**

Под капсулой, образованной коллагеновыми волокнами, находится подкапсульный синус, выстланный эндотелием и макрофагами. По приносящим лимфатическим сосудам из межклеточного пространства окружающих тканей и смежных лимфоузлов в него поступают лимфоциты и антигены. Корковая область заполнена в основном В-клетками, образующими первичные, а чаще всего вторичные (т. е. содержащие центры размножения) фолликулы. Паракортикальная область содержит главным образом Т-клетки. Каждый лимфатический узел снабжен собственными артерией и веной. Поступление лимфоцитов из кровотока происходит в паракортикальной области по функционально специализированным венулам с высоким эндотелием (ВЭВ). В мозговой области содержатся не только большая часть плазматических клеток лимфатического, но также Т- и В-клетки, образующие тяжи лимфоидной ткани. Лимфоциты покидают лимфоузел через выносящий лимфатический сосуд

Снаружи лимфатический узел покрыт капсулой из коллагеновых волокон. Радиально расположенные перегородки — трабекулы — вместе с тяжами ретикулярного остова поддерживают заполняющие узел разнообразные клетки. В лимфоузле различают В-клеточную корковую область, или кортекс, Т-клеточную (паракортикальную) область и центральную (мозговую) область (рис. 3). Последняя образована клеточными тяжами, содержащими Т- и В-лимфоциты, плазматические клетки и макрофаги.

Паракортикальная область содержит много переплетенных отростками (интердигитатных) клеток, экспрессирующих в большом количестве поверхностные антигены МНС класса II. Эти клетки собираются здесь, мигрируя из кожи (клетки Лангерганса) или из слизистых оболочек (дендритные клетки) и транспортируя при этом в лимфатические узлы процессированные антигены из наружных покровов тела и слизистых оболочек. Основная масса лимфоидной ткани лимфатического узла сосредоточена в корковой и паракортикальной областях. Мозговая область образована тяжами, которые разграничивают лимфатические (мозговые) синусы, собирающие лимфу в краевой синус и далее в выносящий

лимфатический сосуд (см. рис. 3). Вдоль синусов, большей частью в мозговой области, расположены клетки, фагоцитирующие детрит. В процессе протекания лимфы через лимфатический узел из приносящих лимфатических сосудов в выносящий эти фагоцитарные клетки вылавливают из нее корпускулярные антигены и транспортируют их в собственно лимфоидную ткань лимфатического узла.

В корковой области содержатся скопления В-клеток, образующих первичные и вторичные фолликулы, тогда как в паракортикальной области находятся главным образом Т-клетки. Вследствие этого после инъекции любого Т-зависимого антигена в кожу или слизистую оболочку в паракортикальной области лимфоузла, дренирующего место введения, наблюдается активная пролиферация Т-клеток. Еще одно доказательство именно такой локализации Т-клеток отмечено у больных с наследственной аплазией, у которых паракортикальные области лимфатических узлов содержат меньше клеток, чем в норме. Подобные явления наблюдаются у неонатально тимэктомированных или наследственно бестимусных (голых) мышей и крыс.

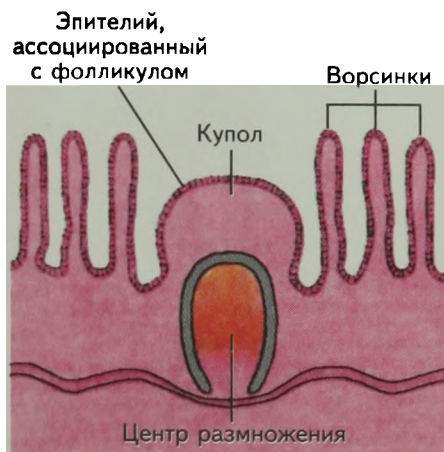
Центры размножения можно обнаружить во вторичных фолликулах лимфатических узлов, стимулированных антигеном. Они сходны с центрами размножения в В-клеточных областях селезеночных ПАЛМ и ЛТС. Большие и малые клетки фолликулярных центров размножения названы *центробластами* и *центроцитами*. У пролиферирующих В-клеток в центрах размножения ядро имеет характерную расщепленную форму, что служит ценным признаком для дифференциальной диагностики некоторых злокачественных заболеваний, таких как центробластно-центроцитарные лимфомы, возникающие из этих клеток.

Центры размножения окружены мантией из лимфоцитов. На В-клетках в зоне мантии сопряженно экспрессируются (коэкспрессия) поверхностные IgM и IgD. Мантия большинства вторичных фолликулов имеет утолщение (корону) со стороны капсулы лимфоузла. Кроме В-клеток, во вторичных фолликулах содержатся фолликулярные дендритные клетки (ФДК), некоторое количество макрофагов и небольшое число Т-клеток CD4+, которые взаимодействуют с дендритными клетками центров размножения. Все перечисленные клетки вместе со специализированными макрофагами краевого синуса способствуют, по-видимому, возникновению В-клеточного иммунного ответа, в частности, развитию иммунологической В-клеточной памяти — одной из главных функций центров размножения.

**Лимфоидная система слизистых оболочек.** Лимфоидная ткань слизистых оболочек. Скопления бескапсульной лимфоидной ткани можно обнаружить в собственной пластинке слизистых оболочек и в подслизистой ткани желудочно-кишечного тракта, дыхательных и мочеполовых путей. Лимфоидные клет-

**Рис. 4. Строение пейеровой бляшки.**

Куполообразный выступ, образуемый слизистой оболочкой кишечника, на участке, лишенном ворсинок. Поверхностный эпителий на этом участке, называемый эпителием, ассоциированным с фолликулами (ЭАФ), содержит М-клетки. В глубине слизистой оболочки расположено скопление вторичных лимфоидных фолликулов с крупными центрами размножения. Окружающие тимусзависимые межфолликулярные зоны содержат интердигитальные клетки и вены с высоким эндотелием. Область купола между ЭАФ и фолликулами заполнена преимущественно В-клетками, большинство которых относится к клеткам иммунологической памяти

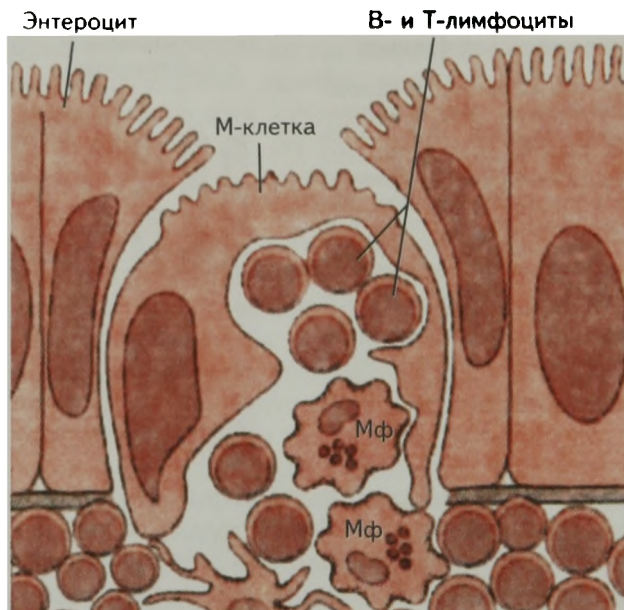


ки образуют в них одиночные или агрегированные скопления с центрами размножения (вторичные фолликулы). Сами слизистые оболочки пищеварительной, дыхательной и мочеполовой систем содержат дендритные клетки, необходимые для поглощения, процессинга и транспорта антигенов в регионарные лимфатические узлы. Скопления лимфоидной ткани, расположенные в собственной пластинке слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, часто распространяются в подслизистый слой. Они имеют форму одиночных фолликулов или сгруппированных узелков, как, например, в червеобразном отростке слепой кишки. Пейеровы бляшки обычно встречаются в нижней части подвздошной кишки. Покрывающий их эпителий кишечника (эпителий, ассоциированный с фолликулами) способен транспортировать антигены и микробы в лимфоидную ткань. Эту специализированную функцию выполняют особые эпителиальные клетки, рассеянные среди энтероцитов; они названы М-клетками, поскольку их обращенная в просвет кишечника поверхность образует многочисленные микроскладки (рис. 4).

В базально-латеральной области М-клеток имеются глубокие инвагинации плазматической мембраны — карманы, в которых располагаются В- и Т-лимфоциты, дендритные клетки и макрофаги (рис. 5). Антигены и микробы подвергаются трансцитозу в эти карманы и далее в организованную субэпителиальную лимфоидную ткань слизистой оболочки. М-клетки встречаются не только в участках пейеровых бляшек, но и в других лимфоидных образованиях слизистых оболочек.

При местном гуморальном иммунном ответе на уровне слизистой оболочки происходит образование антител в основном изотипа IgA. Секреторные IgA — это антитела, способные проникать через мембраны эпителиальных клеток для обеспечения защиты от патогенных микробов (рис. 6).

Лимфоциты слизистых оболочек. Помимо организованной лимфоидной ткани, образующей единую систему ЛТС,



**Рис. 5.** Схематическое изображение М-клетки кишечного ЭАФ.

Во внутриклеточном кармане находятся лимфоциты и нередко макрофаги (Мф). Эндоцитированные М-клеткой антигены попадают через этот карман в субэпителиальную лимфоидную ткань. (ЭАФ — эпителий, ассоциированный с фолликулами.)

в слизистой оболочке желудка, кишечника, верхних и нижних дыхательных путей и некоторых других органов присутствует множество рассеянных лимфоцитов и плазматических клеток. Лимфоциты обнаруживаются в соединительной ткани собственной пластинки и в эпителиальной выстилке.

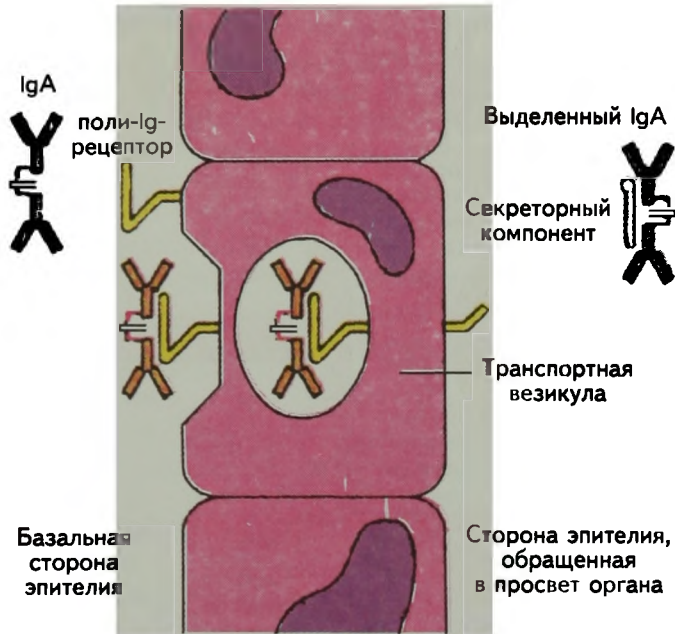
Среди лимфоцитов собственной пластинки (ЛСП) преобладают активированные Т-клетки, но в значительном количестве присутствуют также активированные В-клетки и плазмоциты. Эти плазматические клетки секретируют антитела преимущественно изотипа IgA, транспортируемые через клетки эпителия и высвобождаемые в просвет органа (см. рис. 6).

Внутриэпителиальные лимфоциты (ВЭЛ) представлены в основном Т-клетками, отличными по фенотипу от ЛСП.

Большинство ЛСП и ВЭЛ относятся к клеткам иммунологической памяти, несущим маркер CD45RO (см. рис. 44). Они слабо отвечают на стимуляцию антителами к CD3, но чувствительны к другим механизмам активации, например опосредованным CD2 или CD28.

Покоящиеся Т-клетки периферической крови не экспрессируют интегринавую  $\alpha$ -цепь HML-1 (CD103), но стимуляция фитогемагглютинином (ФГА) индуцирует ее синтез. Антитела к этой цепи митогенны для тех же клеток и вызывают у них экспрессию





**Рис. 6. Транспорт антител IgA через эпителий слизистой оболочки.**

Димеры IgA (sIgA), выделяемые плазматическими клетками в собственной пластинке слизистой оболочки кишечника, связываются поли-Ig-рецепторами на базальной стороне эпителия. Затем комплексы sIgA—рецептор путем эндоцитоза и переноса через клетку в транспортных везикулах (с мембраной которых они связаны) доставляются на поверхность эпителия, обращенную в просвет кишечника. Здесь транспортные везикулы сливаются с плазматической мембраной клеток эпителия, высвобождая димеры IgA с присоединенным секреторным компонентом (фрагмент рецептора) в просвет, где секреторный компонент предохраняет димеры IgA от расщепления протеолитическими ферментами

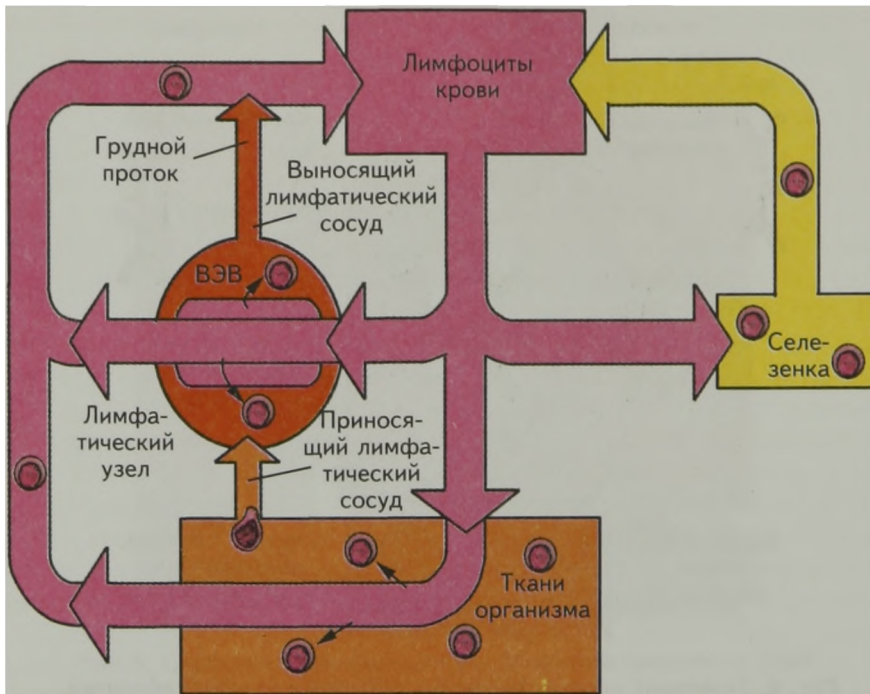
$\alpha$ -цепи низкоаффинных рецепторов ИЛ-2 (CD25). Полипептид HML-1 — это  $\alpha$ -цепь из семейства интегринов, образующая при взаимодействии с  $\beta_7$ -цепью гетеродимер  $\alpha$ HML-1- $\beta_7$  — интегрин, который синтезируют ВЭЛ и другие активированные лимфоциты.

Внутриэпителиальные лимфоциты выделяют ряд цитокинов, в том числе  $\gamma$ -интерферон (ИФ $\gamma$ ) и интерлейкин-5 (ИЛ-5). Одна из функций ВЭЛ состоит, предположительно, в иммунологическом надзоре, направленном на устранение мутантных или инфицированных вирусами клеток.

### 2.2.2. ЦИРКУЛЯЦИЯ ЛИМФОЦИТОВ

Миграция лимфоцитов из первичных во вторичные лимфоидные ткани уже описана выше. Оказавшись во вторичных лимфоидных органах и образованиях, многие лимфоциты не остаются в них, а перемещаются из одного лимфоидного органа в другой по кровеносным и лимфатическим сосудам.





**Рис. 7. Циркуляция лимфоцитов в организме.**

Лимфоциты из кровотока проникают в лимфатические узлы и в ЛТС через специализированный высокий эндотелий посткапиллярных венул (ВЭВ); затем они покидают лимфоидную ткань по выносящим лимфатическим сосудам и, пройдя сквозь другие лимфоузлы, возвращаются в кровоток по грудному протоку, впадающему у человека в левую подключичную вену. В селезенке лимфоциты входят в белую пульпу через краевые зоны; затем, попав в синусоиды красной пульпы, покидают орган через селезеночную вену

У большинства млекопитающих лимфоциты выходят из кровотока в лимфоидную ткань через стенки венул с высоким эндотелием, или высокоэндотелиальные венулы (ВЭВ) (рис. 7), и лишь некоторые лимфоциты переходят из кровотока в лимфоидную ткань через обычные посткапиллярные венулы.

В лимфатических узлах эти сосуды находятся главным образом в паракортикальной области и иногда в корковой, но не в мозговой. Вместе с тем часть лимфоцитов, в первую очередь Т-клетки, поступают в регионарный лимфатический узел из дренируемой им области по приносящим лимфатическим сосудам, а не по ВЭВ. Тем же путем в лимфоузлы поступает большинство антигенов. Венулы с высоким эндотелием обнаружены не только в лимфатических узлах, но и в ЛТС, а также в тимусе.

Венулы с высоким эндотелием управляют циркуляцией лимфоцитов. Эти венулы выстланы кубическими эндотелиальными клетками, которые в отличие от покоящихся плоских клеток эндотелиальной выстилки обычных венул экспрессируют при активации разнообразные молекулы межклеточной адгезии. Один из

механизмов активации клеток эндотелия опосредован локально синтезируемыми цитокинами, такими, как  $\gamma$ -интерферон (ИФ $\gamma$ ), интерлейкины (ИЛ) и фактор некроза опухолей (ФНО).

Эндотелий обычных венул может превращаться в кубический в участках хронического воспаления, например в коже или в синовиальных оболочках, где ВЭВ в норме отсутствуют. Появившиеся ВЭВ направляют в очаг воспаления специализированные субпопуляции Т-лимфоцитов. Активированные кубические эндотелиоциты экспрессируют ряд молекул межклеточной адгезии из суперсемейства иммуноглобулинов [ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) и VCAM-1 (CD106)] или из семейства селектинов, в том числе E-селектин [ELAM-1 (CD62E)] и P-селектин (CD62P). P-селектин хранится в тельцах Вейбеля—Палада эндотелиальных клеток кровеносных капилляров и при активации быстро доставляется на поверхность эндотелиоцита. Ведущая роль в прилипании лимфоцитов к эндотелию принадлежит CD44 — белку с молекулярной массой 190 000, который экспрессируют все лейкоциты. Предположительно, между лимфоцитами и эндотелием возникают специфические лиганд-рецепторные взаимодействия, в результате которых лимфоциты направляются в определенные ткани-мишени. Это происходит за счет экспрессии эндотелием специфичных для данного органа «адресинов», например MAdCAM-1 на эндотелиоцитах в кишечнике и VCAM-1 на эндотелиальных клетках в других органах. Для избирательного органоспецифического распределения лимфоцитов важны также особые молекулы «хоминга», или эффекта «дома» (от англ. homing — возвращение домой). Например, решающее значение для возвращения лимфоцитов в лимфоидную ткань кишечника имеют их интегрины  $\alpha_4\beta_7$ , которые связываются с адресинами MAdCAM-1 на эндотелиальных клетках ВЭВ в пейеровых бляшках.

Благодаря циркуляции любой антиген экспонируется множеству лимфоцитов. Из лимфатических узлов лимфоциты возвращаются в кровоток по выносящим лимфатическим сосудам, через грудной проток и подключичную вену. Ежечасно в рециркуляцию вовлекается 1...2 % лимфоцитов. В итоге этот процесс позволяет множеству антигенспецифических лимфоцитов встретиться с соответствующими антигенами, проникшими в их микроокружение в периферических лимфоидных органах. Особая важность рециркуляции становится очевидной, если вспомнить, что лимфоидные клетки моноспецифичны, и лишь ограниченное число лимфоцитов способно распознавать каждый конкретный антиген.

В норме рециркуляция лимфоцитов через лимфатические узлы происходит постоянно, но если в лимфоидную ткань ранее sensibilizированного к тому или иному антигену животного повторно попадает данный антиген, рециркуляция прекращается приблизительно на 24 ч. Временная остановка рециркуляции обусловлена в этом случае избирательной задержкой антигенспецифических

лимфоцитов в лимфатических узлах, дренирующих место проникновения антигена. Например, образовавшиеся в результате контакта с антигеном лимфобласты уже не рециркулируют, оставаясь, по-видимому, в участке встречи с антигеном.

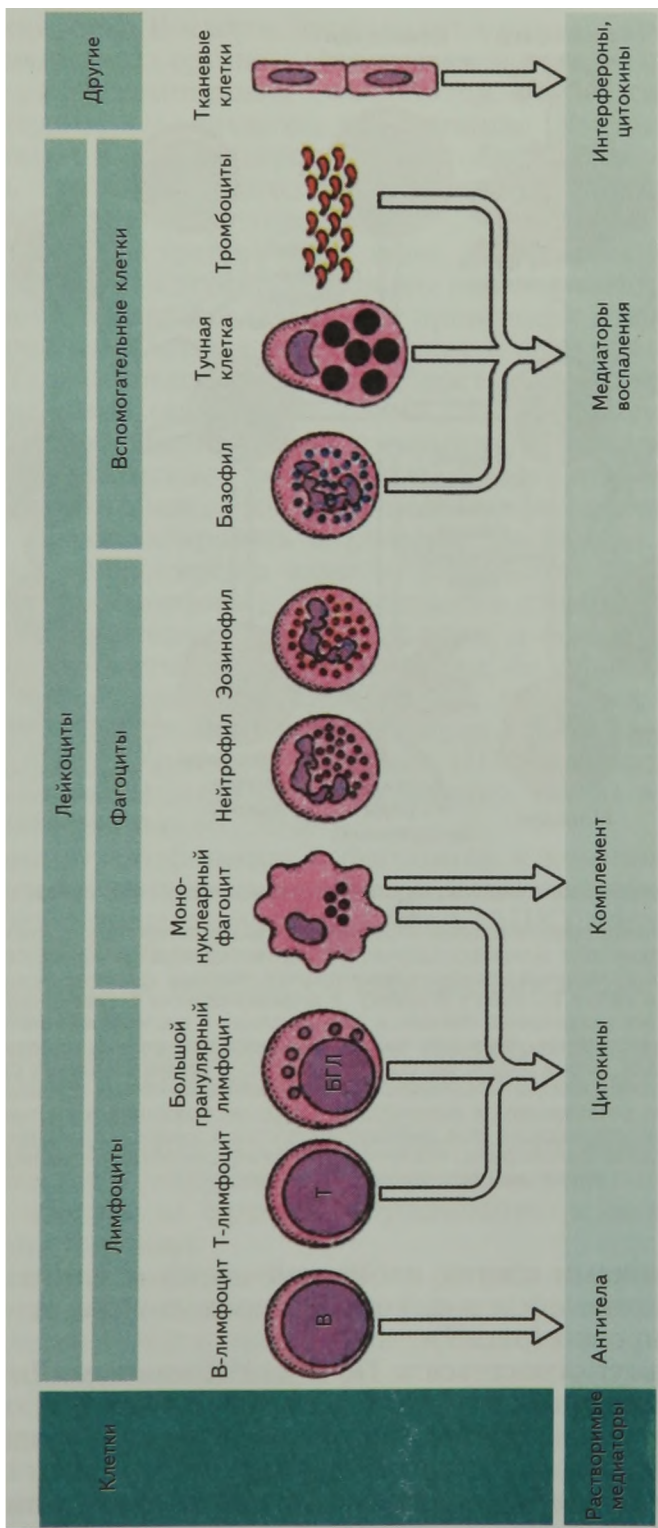
Лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками, отличается как система от других лимфоидных органов в том числе и тем, что лимфоциты ЛТС возвращаются в процессе рециркуляции главным образом в эту ткань. Так, лимфоциты, стимулированные в пейеровых бляшках, проходят через регионарные лимфатические узлы в кровотоке, а затем возвращаются «домой», в собственную пластинку слизистой оболочки кишечника. Такая специфическая рециркуляция объясняется тем, что эти лимфоциты экспрессируют молекулы «хоминга», которые связываются со специфическими молекулами адгезии — адрессинами — на поверхности эндотелиоцитов. Адрессины экспрессирует только эндотелий венул лимфоидной ткани слизистых оболочек, но не ВЭВ обычных лимфатических узлов (см. выше), что и обеспечивает избирательную рециркуляцию. По той же причине стимуляция антигеном в области слизистой оболочки (в том или ином участке организма) вызывает системное образование антител преимущественно в ЛТС.

### **2.3. КЛЕТКИ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЕ ИММУННЫЙ ОТВЕТ**

В иммунном ответе участвует целый ряд клеток и выделяемых ими растворимых продуктов. Центральная роль всегда принадлежит лейкоцитам, однако другие клетки (например, тканевые) также вносят свой вклад, посылая сигналы лимфоцитам и отвечая на цитокины, выделяемые Т-клетками и макрофагами. На рис. 8 перечислены основные клетки и молекулы, принимающие участие в иммунологических реакциях организма.

Выполнение специализированных функций в иммунном ответе осуществляют клетки различного происхождения. В- и Т-лимфоциты экспрессируют на своей поверхности антигенсвязывающие рецепторы и другие молекулы (маркеры), необходимые для выполнения разнообразных функций. Для Т-клеточного ответа требуется представление антигенов антигенпрезентирующими клетками. В-клетки способны распознавать нативные антигены, не процессированные и не представленные другими клетками.

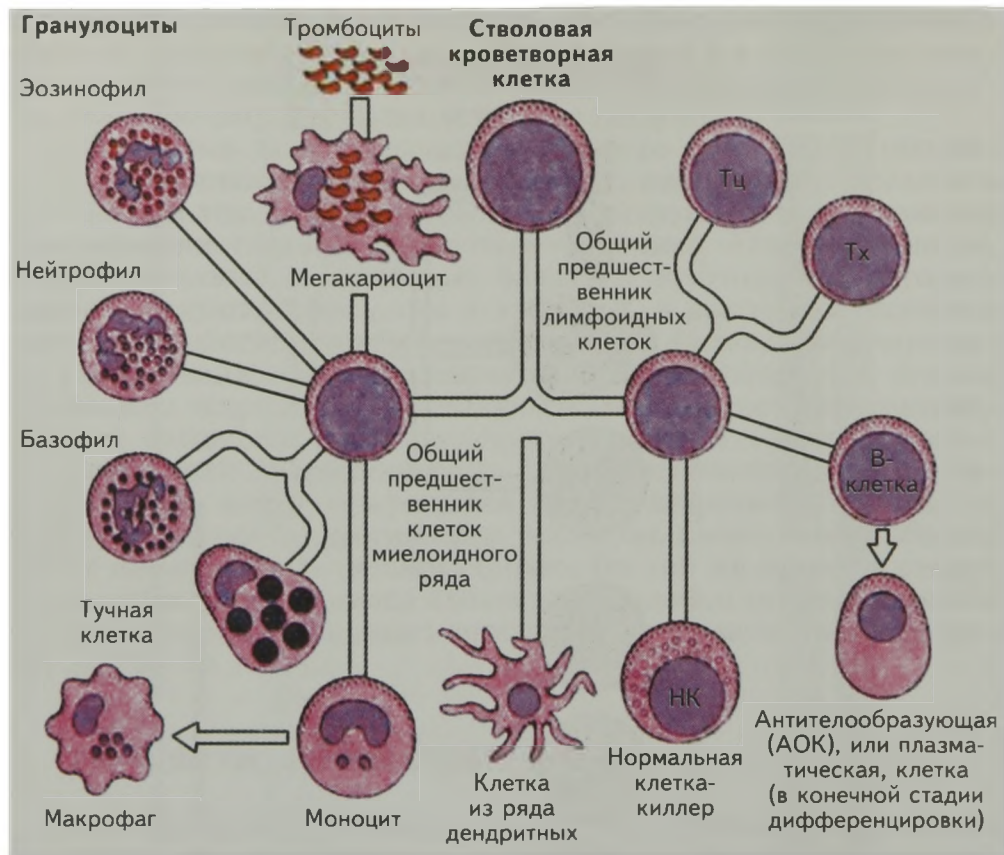
Различные функциональные субпопуляции Т-лимфоцитов проявляют хелперную (Т<sub>х</sub>), супрессивную или цитотоксическую (Т<sub>ц</sub>) активность. Фагоцитарные клетки, несущие специфические поверхностные маркеры, циркулируют в крови (моноциты и гранулоциты) и присутствуют в тканях (например, клетки Купфера в печени). Эозинофилы, базофилы, тучные клетки и тромбоциты принимают участие в воспалительной реакции.



**Рис. 8. Основные элементы иммунной системы.**

Стрелками указаны растворимые медиаторы иммунного ответа. Компоненты комплемента синтезируются преимущественно клетками печени





**Рис. 9. Происхождение клеток, осуществляющих иммунный ответ.**

Все клетки гемопоэтического происхождения образуются из плюрипотентных стволовых клеток, дающих начало клеткам двух основных направлений кроветворения: лимфоидного и миелоидного. В зависимости от микроокружения клетка-предшественник лимфоидного ряда может дифференцироваться либо в Т-, либо в В-клетку. У млекопитающих Т-клетки созревают в тимусе, тогда как В-клетки развиваются сначала в печени плода, а после рождения — в костном мозге. Точное происхождение отдельных видов антигенпрезентирующих клеток (АПК) остается пока неизвестным, хотя в общем все они образуются из гемопоэтических стволовых клеток. Нормальные клетки-киллеры (НК) происходят, вероятно, из общих предшественников лимфоидных клеток, созревающих в печени плода, а после рождения в костном мозге. Предшественники клеток миелоидного ряда дифференцируются в зрелые (коммитированные) клетки, изображенные слева. Эозинофилы, нейтрофилы и базофилы объединены под групповым названием гранулоциты

Предшественниками клеток иммунной системы служат плюрипотентные стволовые клетки, которые проходят два основных пути дифференцировки (рис. 9).

Лимфоциты могут относиться к Т-, В- и НК-клеткам. Две главные популяции лимфоцитов — это Т-клетки и В-клетки. Т-клетки развиваются из своих предшественников в тимусе, тогда как В-клетки у млекопитающих сначала дифференцируются в печени плода, а после рождения — в красном костном мозге. У птиц диф-



ференцировка В-клеток происходит в уникальном для этого класса позвоночных органе — фабрициевой сумке. Органы, где происходит дифференцировка лимфоцитов, относятся к центральным, или первичным, лимфоидным органам. Именно в них предшественники В- и Т-лимфоцитов приобретают способность распознавать антигены благодаря экспрессии антигенспецифических поверхностных рецепторов.

Лимфоциты третьей популяции, не экспрессирующие антигенсвязывающие рецепторы, названы нормальными (естественными) клетками-киллерами (НК). Они происходят из предшественников лимфоидных клеток в костном мозге и функционально отличаются от Т- и В-клеток своей способностью лизировать *in vitro* клетки определенных опухолевых линий (но не свежееудаленных опухолей) без предварительной иммунизации. Морфологически это большие зернистые (гранулярные) лимфоциты (БГЛ).

Моноциты/макрофаги или полиморфно-ядерные гранулоциты могут функционировать в качестве фагоцитов. У полиморфно-ядерных гранулоцитов ядро неправильной формы, сегментированное (полиморфное). В зависимости от характера окрашивания цитоплазматических гранул кислыми и основными красителями гранулоциты относят к нейтрофилам, базофилам или эозинофилам. Эффекторные функции клеток этих трех типов различны. Наиболее многочисленны нейтрофилы, называемые также полиморфно-ядерными нейтрофилами (ПМН) и составляющие большинство лейкоцитов (белых кровяных телец) в циркулирующей крови (примерно 60...70 %).

Помимо лимфоцитов и фагоцитов к компонентам иммунной системы относятся *вспомогательные клетки (А-клетки)*.

Антигенпрезентирующие клетки (АПК) представляют антигены Т- и В-клеткам.

Тромбоциты участвуют в свертывании крови и в воспалительных реакциях.

Тучные клетки, структурно и функционально сходные с базофильными полиморфно-ядерными гранулоцитами, принимают участие в воспалении определенных типов.

Эндотелиальные клетки экспрессируют молекулы, способные узнавать циркулирующие с кровотоком лейкоциты, обеспечивая таким образом их адгезию — прилипание, а также распределение в сосудистом ложе.

**Фагоциты и фагоцитоз.** Мононуклеарные фагоциты. Наиболее важная группа способных к фагоцитозу и долгоживущих клеток — популяции мононуклеарных фагоцитов (см. рис. 9). Эти клетки, происходящие из стволовых клеток костного мозга, осуществляют захват частиц, в том числе инфекционных агентов, поглощают и разрушают их. Для выполнения этой функции фагоциты стратегически располагаются в тех тканях организма, где возможно попадание таких частиц. Например, клетки Купфера

выстилают кровеносные синусоидальные капилляры печени, а синовиальными А-клетками выстланы полости суставов. Мононуклеарные фагоциты, циркулирующие с кровью, называются моноцитами. Из крови они мигрируют в ткани, где превращаются в тканевые макрофаги, способные весьма эффективно презентировать антигены Т-лимфоцитам. Однако наиболее важны для презентации антигена покоящимся Т-клеткам интердигитатные дендритные клетки.

**Полиморфно-ядерные нейтрофилы.** Вторая значительная группа фагоцитирующих клеток — это полиморфно-ядерные нейтрофильные гранулоциты, часто называемые просто нейтрофилами или ПЯН. Нейтрофилы составляют большинство среди лейкоцитов крови и происходят от тех же ранних клеток-предшественников, что моноциты и макрофаги. Подобно моноцитам, нейтрофилы мигрируют в ткани, отвечая на определенные стимулы, но в отличие от моноцитов относятся к короткоживущим клеткам, которые, поглотив чужеродный материал, разрушают его и затем погибают.

**Популяции лимфоцитов.** Лимфоциты представлены двумя большими популяциями — В-клетками и Т-клетками, которые ответственны за специфическое распознавание антигенов. Специфическое иммунологическое распознавание патогенных организмов — это всецело функция лимфоцитов, поэтому именно они инициируют реакции приобретенного иммунитета. Все лимфоциты происходят из стволовых клеток костного мозга, но Т-лимфоциты затем развиваются в тимусе, тогда как В-лимфоциты продолжают свое развитие в красном костном мозге (у взрослых особей млекопитающих).

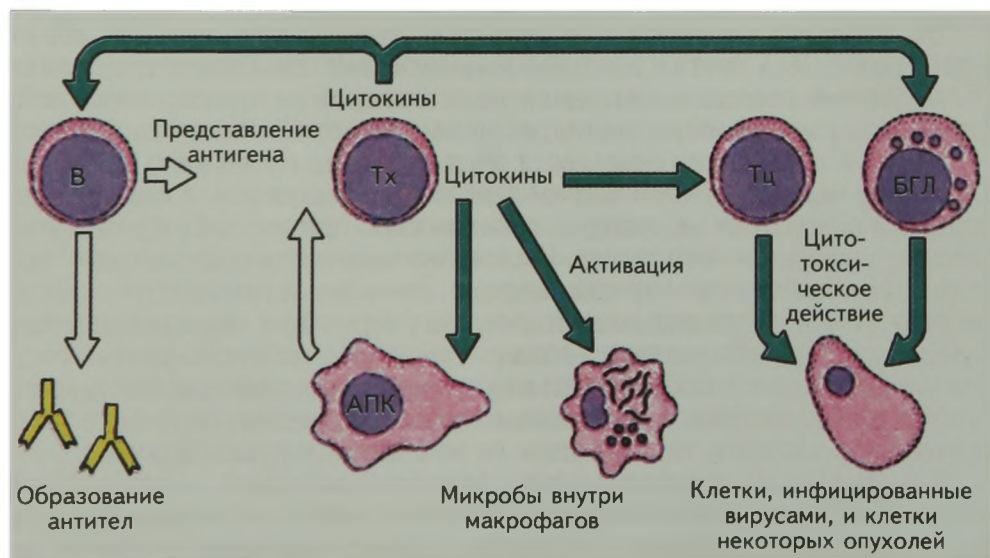
**В-лимфоциты.** Каждая В-клетка генетически запрограммирована на синтез поверхностного рецептора, специфичного к одному определенному антигену. Встретив и распознав этот антиген, В-клетки размножаются и дифференцируются в плазматические клетки, которые образуют и выделяют в растворимой форме большие количества таких рецепторных молекул, называемых антителами. Антитела представляют собой крупные гликопротеиды и содержатся в крови и тканевой жидкости. Благодаря своей идентичности исходным рецепторным молекулам они взаимодействуют с тем антигеном, который первоначально активировал В-клетки.

**Т-лимфоциты.** Имеется несколько субпопуляций Т-клеток с различными функциями. Одни взаимодействуют с В-клетками, помогая им размножаться, созревать и продуцировать антитела. Другие взаимодействуют с мононуклеарными фагоцитами, способствуя разрушению локализованных в них микроорганизмов. Обе эти субпопуляции Т-клеток названы *хелперными Т-клетками* (Тх). Третья субпопуляция Т-клеток осуществляет разрушение клеток организма, зараженных вирусами или иными внутриклеточно размножающимися патогенными микроорганизмами. Этот

тип активности Т-клеток назван цитотоксичностью, а сами клетки соответственно *цитотоксическими Т-лимфоцитами* (Тц). Как правило, распознавание антигена Т-клетками происходит только при том условии, что он презентируется на поверхности других клеток в ассоциации (комплексе) с молекулами МНС. В распознавании участвует специфичный к антигену Т-клеточный рецептор (ТкР), функционально и структурно сходный с той поверхностной молекулой иммуноглобулина, которая у В-клеток служит антигенсвязывающим рецептором.

Свои функции воздействия на другие клетки Т-лимфоциты осуществляют путем выделения растворимых белков — цитокинов, передающих сигналы другим клеткам, или путем прямых межклеточных контактов. Основные функции лимфоцитов представлены на рис. 10.

В развитии иммунного ответа кроме цитокинов участвует ряд молекул-посредников, в том числе выделяемые лимфоцитами антитела и различные белки сыворотки крови, обычно содержащиеся в ней в низкой концентрации. Эти белки названы *острофазными*, так как их концентрация быстро нарастает при инфекционном процессе. Один из полимеров — это С-реактивный белок (CRP), названный так за способность связываться с С-белком пневмококков. Благодаря такому связыванию фагоциты начинают более активно поглощать бактерии — такой процесс называют *опсонизацией*.



**Рис. 10. Основные функции лимфоцитов.**

В-клетки образуют антитела, а Т-хелперные (Тх) клетки — цитокины, регулирующие иммунный ответ. В стимуляции Тх для синтеза цитокинов участвуют клетки, презентующие антиген (АПК), и выполняющие ту же функцию В-клетки. Активированные макрофаги приобретают способность уничтожать поглощенные ими микробы. Цитотоксические Т-лимфоциты (Тц) и большие зернистые (гранулярные) лимфоциты (БГЛ) могут распознавать и уничтожать клетки-мишени самого организма

Цитотоксические клетки распознают и уничтожают инфицированные клетки организма. Цитотоксичностью, направленной на другие клетки организма, обладает ряд клеток иммунной системы. Наиболее важны из них, вероятно, Тц-клетки.

Большие зернистые (гранулярные) лимфоциты (БГЛ). Эта популяция лимфоцитов, как и Т-клетки, способна распознавать те изменения клеточной поверхности, которые возникают при злокачественном перерождении или вирусной инфекции. Большие гранулярные лимфоциты поражают такие клетки-мишени, но кроме того, они в отличие от цитотоксических Т-лимфоцитов весьма эффективно распознают клетки, поверхность которых вовсе лишена своих молекул МНС или утратила их частично. Прежде цитотоксическое действие БГЛ рассматривали как активность нормальных киллерных (НК) клеток. Макрофаги и БГЛ распознают и уничтожают также некоторые клетки-мишени (или патогенные микроорганизмы), если поверхность последних покрыта связавшимися с ней специфическими антителами.

Эозинофильные полиморфно-ядерные гранулоциты, или эозинофилы. Это специализированная популяция лейкоцитов, способных поражать крупные внеклеточные паразитические организмы, например шистосомы.

Все типы цитотоксических клеток поражают свои мишени, выделяя вблизи них содержимое внутриклеточных гранул и другие, не запасаемые в гранулах молекулы.

Вспомогательные клетки, регулирующие воспаление. Ряд других клеток иммунной системы участвует в воспалительной реакции, основная цель которой — привлечение лейкоцитов и растворимых медиаторов иммунитета к очагу инфекции.

Базофильные сегментоядерные гранулоциты и тучные клетки. Эти клетки заполнены гранулами, в которых содержатся различные медиаторы, вызывающие при высвобождении воспаление в окружающей ткани. Выделение медиаторов происходит при активации базофилов и тучных клеток. Эти клетки могут также синтезировать и выделять ряд медиаторов, регулирующих иммунный ответ. Тучные клетки располагаются во всех тканях вблизи кровеносных сосудов и воздействуют посредством некоторых своих медиаторов на клетки сосудистой стенки. Базофилы выполняют функции, сходные с таковыми тучных клеток, но в отличие от них циркулируют с кровью.

Кровяные пластинки (тромбоциты). Эти клетки, активированные в процессе свертывания крови или под действием комплексов антиген—антитело, также выделяют медиаторы воспаления.

### **2.3.1. ЛИМФОИДНЫЕ КЛЕТКИ**

Ежесуточно в первичных (центральных) лимфоидных органах — тимусе и постнатальном костном мозге — образуется зна-



чительное число лимфоцитов. Часть этих клеток мигрирует из кровотока во вторичные лимфоидные ткани — селезенку, лимфатические узлы и лимфоидные образования слизистых оболочек. В организме животных содержится примерно  $10^{12} \dots 10^{14}$  лимфоидных клеток, и лимфоидная ткань в целом составляет приблизительно 2 % общей массы тела. При этом на лимфоидные клетки приходится примерно 20 % циркулирующих с кровотоком лейкоцитов.

Многие зрелые лимфоидные клетки относятся к долгоживущим и могут длительно существовать в качестве клеток иммунологической памяти. Лимфоциты морфологически разнообразны. В обычном мазке крови лимфоциты различаются как по размерам (диаметр 6...10 мкм), так и по морфологии. Варьируется соотношение величина ядра : объем цитоплазмы (Я:Ц), а также форма самого ядра. В цитоплазме некоторых лимфоцитов могут содержаться азурофильные гранулы.

При световой микроскопии мазков крови, окрашенных, например, гематологическим красителем Гимзы, можно обнаружить два морфологически различных типа циркулирующих лимфоцитов: 1) относительно мелкие клетки, в типичном случае лишенные гранул, с высоким соотношением Я:Ц; 2) более крупные клетки с меньшим соотношением Я:Ц, содержащие в цитоплазме гранулы и известные как большие гранулярные лимфоциты. (Не следует путать БГЛ с гранулоцитами, моноцитами или их предшественниками, также содержащими азурофильные гранулы.)

Покоящиеся Т-лимфоциты крови. Большая часть их экспрессирует  $\alpha\beta$ -Т-клеточные рецепторы ( $\alpha\beta$ -Т-клетки) и может иметь один из двух описанных выше типов морфологии. Большинство (95 %) хелперных (Тх) и часть (50 %) цитотоксических (Тц) лимфоцитов относятся к малым лимфоцитам, лишенным гранул и имеющим высокое соотношение Я:Ц. Кроме того, в их цитоплазме присутствует особая структура, названная тельцем Голла, — скопление первичных лизосом возле липидной капли. Тельце Голла легко выявить при электронной микроскопии или цитохимически, методом определения лизосомных ферментов. Менее 5 % Тх-клеток и примерно половина Тц-клеток имеют другой тип морфологии, характерный для БГЛ, с рассеянными по цитоплазме первичными лизосомами и хорошо развитым комплексом Гольджи.

Признаки больших гранулярных лимфоцитов свойственны также еще одной субпопуляции Т-лимфоцитов, а именно Т-клеткам с  $\gamma\delta$ -рецепторами ( $\gamma\delta$ -Т-клетки). В лимфоидных тканях эти клетки имеют дендритную (ветвистую) морфологию; при культивировании *in vitro* они способны прикрепляться к подложке, принимая в результате разнообразную форму.

Неактивированные В-лимфоциты крови. Эти клетки не содержат тельца Голла и морфологически не сходны с большими гранулярными лимфоцитами; их цитоплазма в основ-



ном заполнена рассеянными монорибосомами. В кровотоке иногда можно наблюдать активированные В-клетки с развитым шероховатым эндоплазматическим ретикуломом.

**НК клетки.** Нормальные киллерные клетки, подобно  $\gamma\delta$ -Т-клеткам и одной из субпопуляций Тц, имеют морфологию БГЛ. Однако при этом в их цитоплазме больше азурофильных гранул, чем у гранулярных Т-клеток.

**Экспрессия лимфоцитами поверхностных маркеров.** На поверхности лимфоцитов (как и других лейкоцитов) присутствует множество разнообразных молекул, которые могут служить метками (маркерами) различных субпопуляций. Значительная часть этих клеточных маркеров в настоящее время легко идентифицируется при помощи специфических моноклональных антител. Разработана систематизированная номенклатура маркерных молекул; в ней группы моноклональных антител, каждая из которых специфически связывается с определенной маркерной молекулой, обозначены символом CD (от англ. cluster designation — групповая метка). За основу CD-номенклатуры принята специфичность прежде всего мышинных моноклональных антител к лейкоцитарным антигенам человека. В создании этой классификации участвуют многие специализированные лаборатории разных стран. Для ее обсуждения проведена серия международных рабочих встреч, на которых удалось определить характерные наборы образцов моноклональных антител, связывающихся с лейкоцитами различных популяций, а также молекулярные массы выявляемых при этом маркеров. Моноклональные антитела совпадающей специфичности связывания объединяют в одну группу, присваивая ей номер в системе CD. Однако в последнее время принято обозначать таким образом не группы антител, а маркерные молекулы, распознаваемые данными антителами.

В дальнейшем молекулярные маркеры стали классифицировать в соответствии с информацией, которую они несут об экспрессирующих их клетках, например:

популяционные маркеры, которые служат характерным признаком данного цитопозитического ряда, или линии; пример — маркер CD3, выявляемый только на Т-клетках;

дифференцировочные маркеры, экспрессируемые временно, в процессе созревания; пример — маркер CD1, который присутствует на развивающихся тимоцитах, но не на зрелых Т-клетках;

маркеры активации, такие, как CD25 — низкоаффинный Т-клеточный рецептор для фактора роста (ИЛ-2), экспрессируемый только на Т-клетках, активированных антигеном.

**Т-лимфоциты.** Т-лимфоциты различаются по своим антиген-распознающим рецепторам. Маркером, характеризующим линию Т-клеток, служит Т-клеточный рецептор для антигена (ТкР). Имеется два различных типа ТкР. И тот, и другой — гетеродимеры, состоящие из двух соединенных дисульфидными связями по-

липептидных цепей. ТкР первого типа образован цепями  $\alpha$  и  $\beta$ , второго типа, сходный по структуре, — цепями  $\gamma$  и  $\delta$ . Оба рецептора ассоциированы на клеточной поверхности с пятью полипептидами CD3-комплекса, образуя вместе с ним рецепторный комплекс Т-клетки (ТкР—CD3-комплекс).

Т-клетки экспрессируют либо  $\gamma\delta$ -, либо  $\alpha\beta$ -ТкР и подразделяются на субпопуляции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, распознающие пептиды антигена в ассоциации с молекулами МНС класса I или II соответственно. Т-клетки CD4<sup>+</sup> можно далее разделить на субпопуляции Тх1 и Тх2 по набору образуемых ими цитокинов. Четких данных о различии цитокиновых профилей у  $\gamma\delta$ -Т-клеток и у  $\alpha\beta$ -Т-клеток CD8<sup>+</sup> не получено.

Примерно 95 % Т-клеток CD4<sup>+</sup> и 50 % Т-клеток CD8<sup>+</sup> морфологически представляют собой малые негранулярные лимфоциты. Эти популяции можно дифференцировать дальше по фенотипической экспрессии CD28 и CTLA-4 на функционально различные субпопуляции. Экспрессируемый Т-клетками CD4<sup>+</sup> маркер CD28 обеспечивает передачу костимулирующего сигнала активации при распознавании антигена. (В отсутствие такого сигнала контакт ТкР с антигеном может вызывать анергию.)

Т-лимфоциты можно классифицировать также по профилю цитокинов. Функциональное разнообразие Т-клеток можно продемонстрировать, анализируя профили секреции цитокинов разными клонами Т-хелперов. У мыши и человека идентифицировано по две группы Т-клеточных CD4<sup>+</sup>-клонов. Субпопуляция Тх1 секретирует ИЛ-2 и ИФ $\gamma$ , а субпопуляция Тх2 — ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6 и ИЛ-10. Клетки Тх1 принимают участие в активации цитотоксических Т-лимфоцитов и в местных воспалительных реакциях. Следовательно, они важны для противодействия организма внутриклеточной вирусной, бактериальной или паразитарной инфекции. Клетки Тх2 более эффективны в стимуляции В-лимфоцитов к пролиферации и образованию антител, поэтому их функции связаны в первую очередь с защитой организма от микробов, размножающихся внеклеточно (гуморальный иммунитет).

Т-лимфоциты обладают рядом общих маркеров с клетками других линий. Ряд молекул экспрессируется на поверхности всех Т-клеток («пан-Т-клеточные маркеры»), а также на клетках других линий. Хороший пример — рецепторы для эритроцитов барана (CD2). В норме молекула CD2, связываясь с соответствующими лигандами, принимает участие в процессе активации Т-клеток вместе с ТкР — CD3-комплексом и другими гликопротеидами в составе мембран. Вместе с тем CD2 выявляется также у 75 % НК-клеток CD3. Другая участвующая в Т-клеточной активации молекула — это маркер CD5, экспрессируемый на всех Т-клетках и на одной из субпопуляций В-клеток. Молекула CD5 может связываться с CD72, но вопрос о ее роли в качестве физиологического лиганда В-клеток остается открытым. Маркер CD7 присутству-

ет почти на всех НК- и Т-клетках. Т-клетки мыши экспрессируют маркеры, сходные с обнаруженными на Т-клетках человека.

Получены очевидные функциональные доказательства существования антигенспецифических супрессорных Т-клеток (Тс), однако они, по-видимому, не составляют отдельной субпопуляции Т-клеток с исключительно супрессивной функцией. Доказано также, что Т-клетки, как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup>, способны подавлять иммунный ответ либо путем прямого цитотоксического действия на антигенпрезентирующие клетки, либо путем выделения «супрессивных» цитокинов, либо путем передачи сигнала отрицательной регуляции (при связывании CTLA-4 с его лигандами), либо посредством идиотипантиидиотипических сетевых взаимодействий.

**В-лимфоциты.** От 5 до 15 % циркулирующих с кровью лимфоидных клеток — это В-лимфоциты, выявляемые по наличию поверхностных иммуноглобулинов. Молекулы иммуноглобулинов синтезируются конститутивно; они встроены в цитоплазматическую мембрану клетки и функционируют как антигенспецифические рецепторы. Такие рецепторы можно определить на клеточной поверхности, используя меченные флюорохромом антитела к иммуноглобулину.

«Рецепторный комплекс» В-лимфоцитов. Большинство В-клеток периферической крови человека экспрессирует на своей поверхности иммуноглобулины двух изоформ — IgM и IgD. На каждой отдельной В-клетке антигенсвязывающие центры у этих изоформ идентичны. Менее 10 % В-клеток циркулирующей крови экспрессируют IgG, IgA и IgE, но в определенных областях тела такие клетки встречаются с большей частотой; например, В-клеток, несущих IgA, много в слизистой оболочке кишечника. Ассоциируя с другими молекулами на поверхности В-клеток, иммуноглобулин образует антигенраспознающий рецепторный комплекс В-клетки. К этим другим, «вспомогательным», молекулам относятся соединенные дисульфидными связями гетеродимеры, состоящие из Igα (CD79a) и Igβ (CD79b). Эти гетеродимеры, взаимодействуя (подобно составным частям TкР—CD3-комплекса Т-клеток) с трансмембранными сегментами иммуноглобулинового рецептора, участвуют в процессе активации В-клеток.

Другие В-клеточные маркеры и субпопуляции. Большая часть В-клеток несет на поверхности антигены МНС класса II, которые важны для кооперативных (контактных) взаимодействий с Т-клетками. У мыши это антигены I-A или I-E, у человека — HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR. Выявляемые почти на всех В-клетках рецепторы для компонентов комплемента C3b (CR1, CD35) и C3d (CR2, CD21) вовлечены в процессы клеточной активации и, вероятно, хоминга. Взаимодействие CD19/CD21 с комплексом комплемент + антиген играет роль в активации В-клеток при участии антигенсвязывающего рецептора антител. На В-клетках имеются также Fc-рецепторы для экзогенного IgG

(FcγRII, CD32), передающие сигналы отрицательной регуляции для В-клеток.

Основные маркеры, используемые в настоящее время для идентификации В-клеток, — это CD19, CD20 и CD22. Известны также другие В-клеточные маркеры — CD72 и CD78. Маркер CD72 обнаружен на В-клетках мыши (Lyb-2) вместе с B220, представляющим собой высокомолекулярную (220 000) изоформу маркера CD45 (Lyb-5). Существенная роль в контактных взаимодействиях между Т- и В-клетками принадлежит маркеру CD40.

В-клетки можно разделить на две субпопуляции: В-1 (Mac-1<sup>+</sup> CD23<sup>-</sup>) и В-2 (Mac-1<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>). Большинство В-1-клеток экспрессирует маркер CD5 (Lyl), первоначально обнаруженный только на Т-клетках. Этот маркер ассоциирован с В-клеточным рецептором и может участвовать в регуляции процесса активации В-клеток. В-1-клетки спонтанно синтезируют так называемые нормальные антитела к определенным бактериальным антигенам, а также к аутоантигенам, таким, как ДНК, Fc-фрагмент IgG, фосфолипиды и белки цитоскелета.

Кроме общего с Т-клетками маркера CD5, В-клетки имеют общие маркеры с другими клетками, например маркер CD40, который присутствует на некоторых дендритных клетках.

**Нормальные (естественные) клетки-киллеры.** Клетки, названные нормальными киллерами (НК), составляют до 15 % лимфоцитов крови; они не экспрессируют ни Т-клеточных, ни В-клеточных антигенсвязывающих рецепторов.

**Фенотипические маркеры НК клеток.** Большинство антигенов, выявляемых на поверхности НК при помощи моноклональных антител, присутствует также на Т-клетках и на моноцитах/макрофагах. В очищенных лимфоцитарных популяциях НК-клетки чаще всего выявляют с использованием моноклональных антител к CD16 (FcγRIII). Маркер CD16 участвует в одном из механизмов активации НК и экспрессируется также нейтрофилами, некоторыми разновидностями макрофагов и αγ-Т-клеток.

У гранулоцитов маркер CD16 связан с цитоплазматической мембраной посредством фосфатидилинозитолгликана, тогда как НК, макрофаги и αγ-Т-клетки экспрессируют трансмембранную форму этой маркерной молекулы. Другой важный для идентификации маркер НК — это CD56, представляющий собой гомофильную молекулу межклеточной адгезии (N-CAM) из суперсемейства иммуноглобулинов. Неактивированные НК экспрессируют, кроме того, β-цепь рецептора к ИЛ-2 (рецептор средней аффинности с молекулярной массой 70 000) и передающую сигнал γ-цепь, общую для рецепторов, связывающих ИЛ-2 и другие цитокины. Разумеется, прямая стимуляция интерлейкином-2 вызывает активацию НК. Представляет интерес тот факт, что рецептор с молекулярной массой 70 000 экспрессируется также на всех Т-клетках, имеющих морфологию БГЛ, а именно на γδ-Т-клетках и на части



$\alpha\beta$ -Т-клеток CD8<sup>+</sup> Под влиянием ИЛ-2 все эти клетки, включая НК, приобретают неспецифическую цитотоксическую активность, превращаясь в клетки, известные под общим названием активированные лимфокином киллерные клетки (ЛАК). ЛАК-клетки оказывают цитотоксическое действие на свежесыведенные клетки опухолей, причем спектр их мишеней гораздо шире, чем у неактивированных НК.

**Функции нормальных клеток-киллеров.** Функция НК — распознавание и уничтожение клеток некоторых опухолей, а также клеток, инфицированных вирусами. Механизм распознавания полностью пока не ясен. Субпопуляции НК экспрессируют молекулы суперсемейства иммуноглобулинов, регулирующие их цитотоксическую активность. Продукты некоторых аллелей HLA класса I могут защищать клетки-мишени от НК, продукты других же, напротив, усиливают их цитолитическое действие.

Нормальные клетки-киллеры способны также поражать клетки-мишени, нагруженные антителами IgG, при участии своих рецепторов для IgG (FcγRIII, или CD16). Эта активность названа антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (АЗКЦ). Активированные НК выделяют  $\gamma$ -интерферон (ИФ $\gamma$ ) и другие цитокины (в частности, ИЛ-1 и ГМ-КСФ), которые могут играть важную роль в регуляции гемопоэза и иммунного ответа.

**Активация В- и Т-лимфоцитов.** В- и Т-клетки активируются, связываясь со специфическими антигенами. Т-клеткам для этого требуется «увидеть» антиген связанным с молекулами МНС на антигенпрезентирующих клетках, тогда как В-клетки могут связываться с нативными антигенами, но для активации им необходима помощь Т-клеток (в случае некоторых полимерных антигенов или митогенных по своей природе молекул эта помощь В-клеткам не требуется).

Помимо специфического связывания антигена рецепторами для эффективной активации Т- и В-клеток необходимо межклеточное взаимодействие с участием других компонентов поверхности, например, в случае Т-клеток, CD28. Индуцированная антигеном активация и дифференцировка Т- и В-клеток обычно происходит в лимфоидных тканях и может быть воспроизведена *in vitro* при культивировании лимфоцитов в присутствии активирующего агента. Такими агентами могут служить: антиген, распознаваемый поверхностным антигенсвязывающим рецептором клетки; моноклональные антитела к ТкР — CD3-комплексу и лектины [например, фитогемагглютинин (ФГА), конканавалин А (КонА) и митоген лаконоса].

Лектины — это белки растительного и бактериального происхождения, связывающие углеводы. Некоторые из них способны активировать лимфоциты, перекрестно взаимодействуя с ВкР или ТкР, и служить митогенами (индукторами пролиферации). Считается, что митогенная стимуляция лимфоцитов *in vitro* довольно



близко воспроизводит активацию специфическими антигенами. Лектины ФГА и КонА стимулируют Т-лимфоциты мыши и человека. Бактериальный липополисахарид (ЛПС) стимулирует В-клетки мыши, а митоген лаконоса вызывает пролиферацию и В-, и Т-клеток человека.

Исследования *in vitro* с применением этих агентов показали, что активация Т- и В-клеток вызывает синтез цитокинов и рецепторов для них. Взаимодействие цитокинов с рецепторами индуцирует вступление клеток в цикл деления (пролиферация) и их последующее созревание с образованием эффекторных клеток или клеток иммунологической памяти. В условиях *in vitro* клетки памяти рециркулируют и в итоге расселяются по Т- и В-зависимым областям лимфоидных тканей, где они в дальнейшем остаются, сохраняя готовность к ответу при новой встрече с тем же антигеном.

Значение «вторых посредников». В результате взаимодействия покоящихся лимфоцитов с антигеном индуцируется цепь биохимических процессов, приводящих к образованию внутри В- или Т-клетки «вторых посредников». Эти посредники ответственны за последующие изменения на уровне генов. Как в Т-, так и в В-клетках в передаче сигнала активации участвует гуанозинтрифосфатсвязывающий (ГТФ-зависимый) белок (G-белок), который стимулирует метаболизм фосфатидилинозитола. В результате образуются два вторых посредника — инозитол-1,4,5-трифосфат (IP3) и диацилглицерол (ДАГ). Посредник IP3 индуцирует выход ионов  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо, а ДАГ активирует протеинкиназу С, которая вместе с другими киназами фосфолирует ряд компонентов плазматической мембраны, что приводит к появлению факторов транскрипции и последующей экспрессии определенных генов. Таким образом, сразу после контакта Т-лимфоцитов с антигеном на их поверхности экспрессируется ряд молекул, в том числе gp39 и рецептор для ИЛ-2. Дальнейшие межклеточные взаимодействия с участием этих молекул вызывают пролиферацию и дифференцировку лимфоцитов.

Значение дифференцировки В-лимфоцитов. Дифференцировка В-лимфоцитов приводит к образованию плазматических клеток и клеток иммунологической памяти. После активации митогеном или антигеном Т- и В-клетки претерпевают характерные ультраструктурные изменения, превращаясь в лимфобласты. Впоследствии многие В-лимфобласты созревают в антителообразующие клетки (АОК), которые *in vivo* развиваются затем в окончательно дифференцированные плазматические клетки. В некоторых В-лимфобластах не образуется цистерн шероховатого эндоплазматического ретикулума (ЭР). Такие клетки присутствуют в центрах размножения внутри лимфоидных фолликулов; они названы центральными клетками фолликула, или центроцитами.

Как показывает световая микроскопия, цитоплазма плазматических клеток базофильна, т. е. обладает сродством к основным красителям. Это свойство цитоплазмы объясняется присутствием в ней больших количеств РНК, обеспечивающей синтез антител на рибосомах шероховатого ЭР. Эти клетки редко появляются в кровотоке, составляя не больше 0,1 % циркулирующих лимфоцитов. В норме плазматические клетки встречаются только во вторичных лимфоидных органах и тканях, и, кроме того, их довольно много в красном костном мозге. Антитела, образуемые одной плазматической клеткой, обладают одной антигенной специфичностью и принадлежат к одному изотипу иммуноглобулинов. Их можно выявить в цитоплазме этих клеток при помощи меченных флюорохромом антиглобулиновых антител. Плазматические клетки имеют короткую продолжительность жизни; просуществовав лишь несколько дней, они погибают в процессе апоптоза.

**Маркеры активации на лимфоцитах.** Активация Т- и В-клеток вызывает синтез *de novo* ряда поверхностных маркеров и увеличение экспрессии других.

К этим маркерам активации относятся молекулы межклеточной адгезии, обеспечивающие более эффективное взаимодействие активированных клеток с другими, а также рецепторы факторов роста и дифференцировки, необходимые для постоянной пролиферации и созревания клеток. Один из них — рецептор для ИЛ-2 (ИЛ-2Р), экспрессируемый Т-клетками после активации; он состоит из трех субъединиц. В состоянии покоя Т-клетки постоянно экспрессируют  $\gamma$ -цепь (CD134) этого рецептора, а некоторые из них (БГЛ) образуют также его  $\beta$ -цепь (CD122). Активация вызывает синтез  $\alpha$ -субъединицы ИЛ-2Р (CD25) и образование гетеротримерного высокоаффинного ИЛ-2Р. Временно активация Т-клеток вызывает также экспрессию gp39 (CD40L) и рецепторов трансферрина (CD71, важен для пролиферации), CD38 и CD69. Эти маркеры появляются в ранней фазе онтогенеза Т-клеток, но исчезают в ходе внутритимусного развития. Поздними маркерами активации Т-клеток служат молекулы МНС класса II. На Т-клетках, в частности Т-клетках иммунологической памяти, экспрессируется как поздний маркер активации CD29 ( $\beta$ -цепь VLA). Поэтому функцию «памяти» субпопуляции Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup> можно интерпретировать как индуцированное активацией увеличение числа различных молекул межклеточной адгезии, которые облегчают взаимодействие этих Т-клеток с другими, если организм встречается с данным антигеном вновь.

К маркерам активации В-клеток относятся высокоаффинный ИЛ-2Р и другие рецепторы для факторов роста и дифференцировки, таких как ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-6.

К маркерам активации НК-клеток относятся молекулы МНС класса II.

### 2.3.2. МОНОНУКЛЕАРНЫЕ ФАГОЦИТЫ

Система мононуклеарных фагоцитов выполняет две основные функции, осуществляемые двумя разными типами клеток костно-мозгового происхождения:

«профессиональными» макрофагами, главная роль которых — устранение корпускулярных антигенов;

антигенпрезентирующими клетками (АПК), роль которых заключается в поглощении, процессинге и представлении антигена Т-клеткам.

Ранее тканевые макрофаги вместе с эндотелиальными клетками функционально объединяли под названием ретикулоэндотелиальная система.

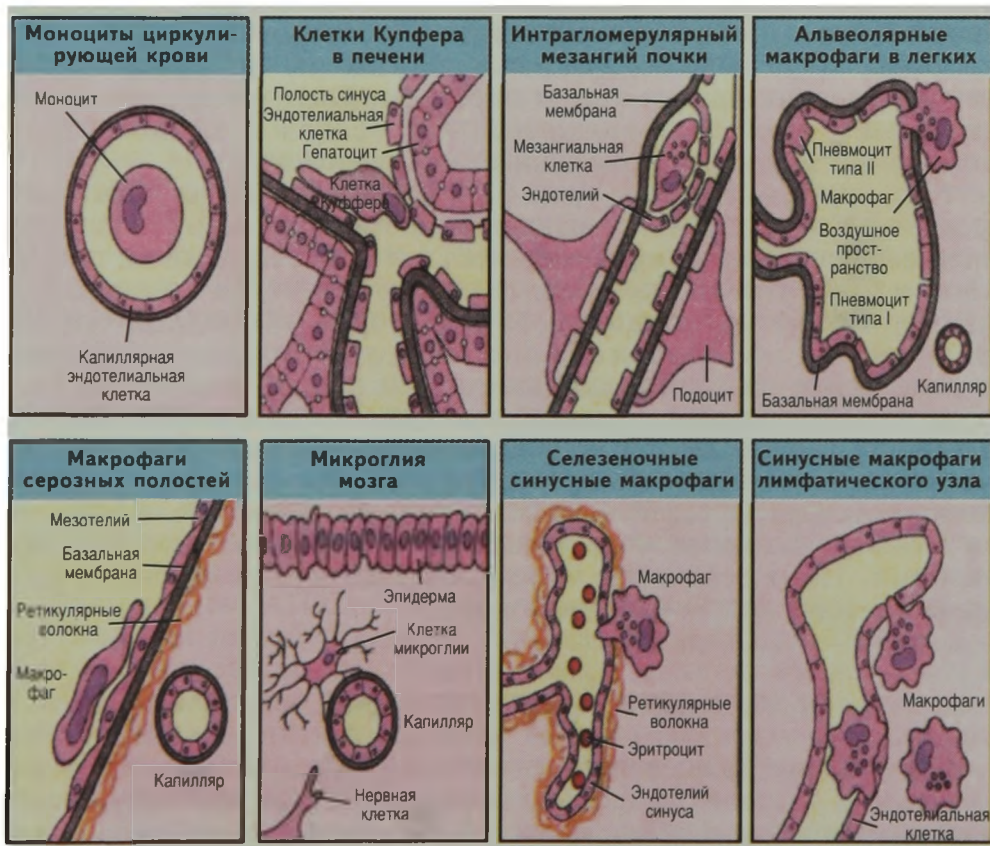


Рис. 11. Система мононуклеарных фагоцитов.

В систему мононуклеарных фагоцитов входят моноциты крови, оседлые фагоциты тканей и макрофаги, прикрепленные к эндотелиальной выстилке кровеносных капилляров. Оседлые макрофаги печени известны как клетки Купфера, в то же время при локализации в почках они названы интрагломерулярными мезангиальными клетками. Альвеолярные макрофаги и фагоциты серозных полостей (например, перитонеальные) относятся к «блуждающим». Мозговая микроглия — это клетки, проникшие в нервную ткань в момент рождения и дифференцировавшиеся в фиксированные фагоциты. (Реальные соотношения размеров клеток на схеме не соблюдены.)

Макрофаги присутствуют во многих органах (рис. 11) и могут быть выявлены, например у мыши, путем введения в вену мельчайших частиц угля, которые оказываются локализованными в фагоцитах.

Миелоидные предшественники в костном мозге дифференцируются в промоноциты, а затем в зрелые моноциты, поступающие в кровь. Клетки этого циркулирующего пула мигрируют через стенки сосудов в различные органы, где превращаются в макрофаги. По сравнению с лимфоцитами моноциты — это более крупные клетки (диаметром 10...18 мкм) с характерным подковообразным ядром и азурофильными гранулами в цитоплазме.

Моноциты и макрофаги способны прочно прилипать к поверхности стекла и пластика, а также активно фагоцитировать микроорганизмы и даже опухолевые клетки *in vitro*. При связывании специализированных моноцитарных рецепторов с микробными клетками происходит их адгезия и поглощение моноцитами. Эти рецепторы взаимодействуют с определенными углеводами в составе клеточных стенок микробов либо с IgG и компонентами комплемента, опсонизировавшими их поверхность.

Молекулярные маркеры моноцитов и макрофагов. У моноцитов и макрофагов имеются маннозилфукозильные рецепторы, связывающиеся с этими сахарами на поверхности микробов или дефектных клеток организма-хозяина, например старых эритроцитов. К рецепторам углеводной специфичности относятся также N-ацетилглюкозаминовые рецепторы и рецепторы, распознающие клеточный детрит. Удаляемые моноцитами и макрофагами апоптотичные клетки распознаются, в частности, фосфатидилсериновыми рецепторами. Кроме того, моноциты/макрофаги экспрессируют CD14 — рецептор для липополисахаридсвязывающего белка, который в норме содержится в сыворотке крови и связывается с грамотрицательными бактериями. На поверхности моноцитов/макрофагов имеются также рецепторы для Fc-фрагмента IgG.

### 2.3.3. АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ

Клетки, представляющие антиген (АПК), — это гетерогенная популяция лейкоцитов с весьма выраженной иммуностимулирующей активностью. Определенные АПК играют центральную роль в индукции функциональной активности Тх-клеток, некоторые взаимодействуют с другими клетками иммунной системы.

АПК локализованы преимущественно в коже, лимфатических узлах, селезенке, эпителиальном и субэпителиальном слоях большинства слизистых оболочек и в тимусе (рис. 12). Относящиеся к ним клетки Лангерганса из кожи и других плоскоэпителиальных покровов тела мигрируют в виде вуалевидных клеток



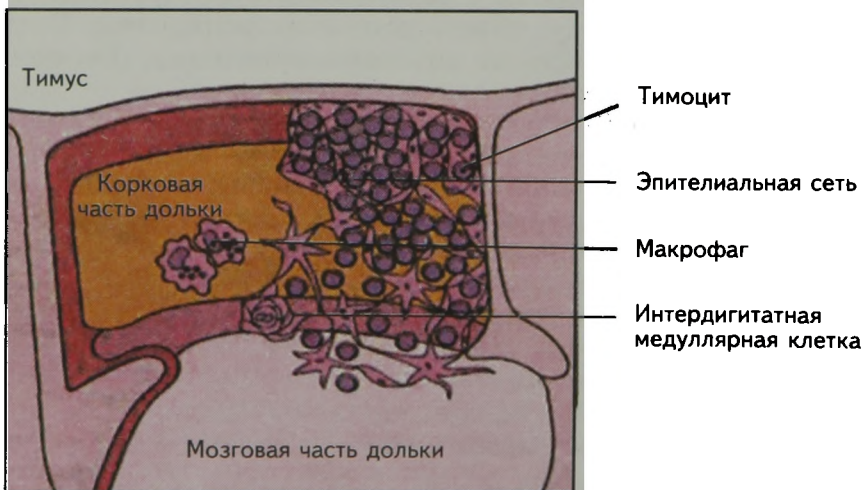
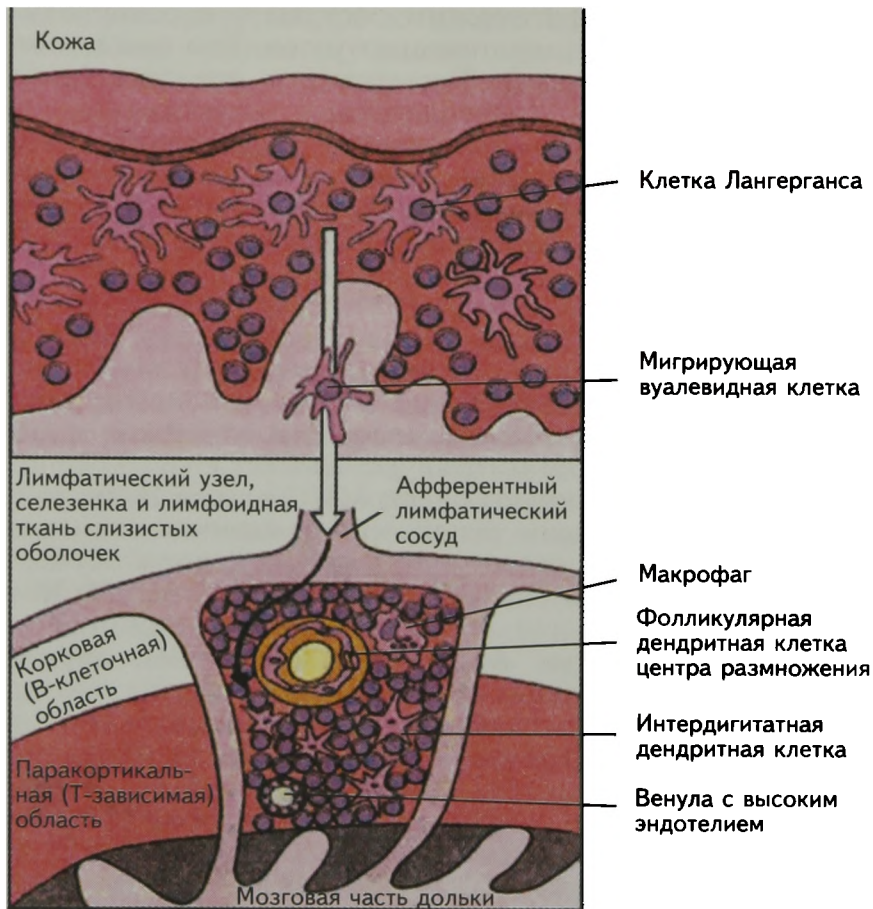
по афферентным лимфатическим сосудам в паракортикальные области регионарных лимфатических узлов. Там они взаимодействуют с многочисленными Т-клетками и представляют собой уже интердигитатные (переплетенные отростками) клетки (ИДК). Такая миграция обеспечивает эффективный механизм доставки антигенов из кожи и слизистых оболочек к Тх-клеткам лимфатических узлов. На этих АПК обильно экспрессированы белки МНС класса II, необходимые для презентации антигена хелперным Т-клеткам.

Фолликулярные дендритные (разветленные) клетки (ФДК), презентующие антигены В-клеткам, содержатся в первичных и вторичных фолликулах В-клеточных областей лимфатических узлов, селезенки и лимфоидной ткани слизистых оболочек (ЛТС). Прочно соединяясь десмосомами отростков и образуя стабильную сеть, они не мигрируют из мест своего расположения. ФДК не экспрессируют белки МНС класса II, но связывают антигены посредством рецепторов к компонентам комплемента (CD21 и CD35), ассоциированным в данном случае с иммунными комплексами (иккосомами). Кроме того, ФДК экспрессируют рецепторы для Fc. В центрах размножения внутри вторичных В-клеточных фолликулов обнаружен другой вид АПК — дендритные клетки центров размножения, которые в отличие от ФДК экспрессируют белки МНС класса II и способны к миграции. В центре размножения они взаимодействуют с Т-клетками.

АПК присутствуют в тимусе, представляя собой здесь, как и в лимфатических узлах, интердигитатные клетки; особенно велико их содержание в мозговой зоне тимуса. В этом органе, которому принадлежит основная роль в размножении и созревании Т-клеток, ИДК, по-видимому, ответственны за устранение Т-клеток, реагирующих на собственные антигены организма. Данный процесс назван *отрицательной селекцией*.

Большинство АПК образуется в костном мозге, хотя их гемопоэтический предшественник остается неизвестным. Например, через 100 сут после трансплантации костного мозга все клетки Лангерганса в коже реципиента имеют донорское происхождение. Моноциты, активированные *in vitro* гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (ГМ-КСФ) и интерлейкином-4, теряют способность к фагоцитозу и превращаются в АПК, приобретая морфологию дендритных клеток и начиная экспрессировать белки МНС класса II. Относительно ФДК первичных и вторичных лимфоидных фолликулов предполагается, что они имеют мезенхимное, а не костномозговое происхождение.

Классические В-клетки обильно экспрессируют белки МНС класса II (особенно после активации) и способны, следовательно, расщеплять и представлять специфические антигены активиро-



### Рис. 12. Антигенпрезентирующие клетки.

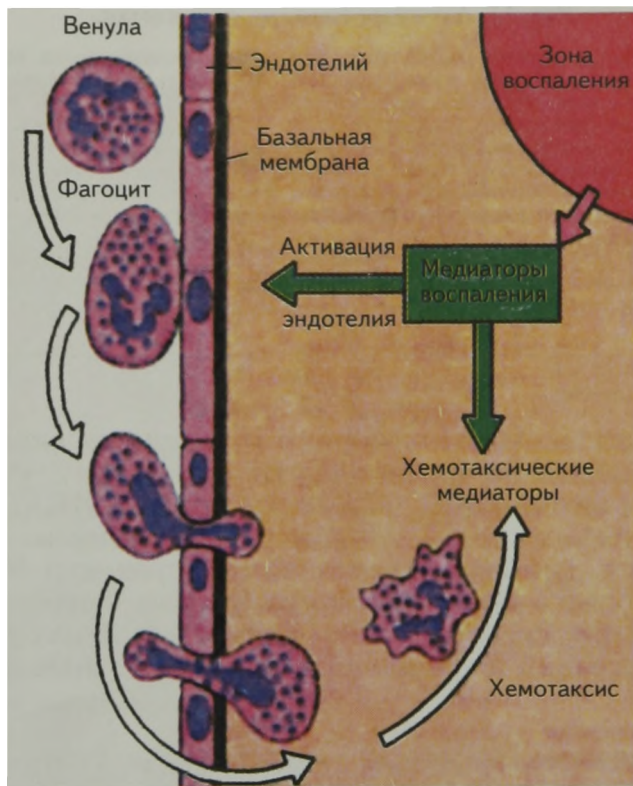
Антигенпрезентирующие клетки (АПК) костномозгового происхождения выявляются главным образом в лимфоидной ткани, коже и слизистых оболочках. В эпидермисе они имеют вид клеток Лангерганса с характерными, напоминающими теннисные ракетки, бербековыми гранулами в цитоплазме. Эти клетки, богатые белками МНС класса II и нагруженные процессированным антигеном, мигрируют по афферентным лимфатическим сосудам (при этой локализации их называют вуалевидными клетками) в паракортикальные (Т-зависимые) области регионарных лимфатических узлов. Здесь уже как интердигитальные клетки они контактируют с Т-клетками и презентуют им антиген. Экспонирование антигена В-клеткам происходит на фолликулярных дендритных клетках (ФДК) в центрах размножения внутри В-клеточных фолликулов. В качестве АПК действуют также некоторые макрофаги наружной кортикальной области и краевого синуса лимфатических узлов. В тимусе АПК представлены интердигитальными (переплетенными отростками) клетками мозговой зоны

ваным Т-клеткам. Не относящиеся к иммунной системе клетки организма в норме не экспрессируют белки МНС класса II, но при индукции цитокинами, такими, как ИФγ и ФНОα, некоторые типы соматических клеток, например кератиноциты, тироциты и эндотелиоциты, способны синтезировать продукты МНС класса II и презентировать антигены. Индукция этой «неуместной» экспрессии, вероятно, представляет собой элемент патогенеза аутоиммунных заболеваний и хронических воспалительных процессов.

#### 2.3.4. ПОЛИМОРФНО-ЯДЕРНЫЕ ГРАНУЛОЦИТЫ, ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ И ТРОМБОЦИТЫ

Полиморфно-ядерные гранулоциты (часто называемые просто гранулоцитами) — это базофилы, эозинофилы, но в основном нейтрофилы ПМН, которые высвобождаются костным мозгом со скоростью примерно 7 млн/мин. По сравнению с моноцитами и макрофагами, которые могут сохраняться месяцы или годы, гранулоциты — короткоживущие (всего 2...3 сут) клетки. Они составляют 60...70 % общего числа лейкоцитов крови и содержатся также в тканях. Подобно моноцитам, ПМН могут прилипать к эндотелиальным клеткам, выстилающим кровеносные сосуды («краевое стояние») и покидать кровоток, протискиваясь между эндотелиальными клетками (рис. 13). Этот процесс известен как диапедез. Адгезию ПМН вызывают хемоаттрактанты (хемокины), такие, как ИЛ-8, и опосредуют гранулоцитарные рецепторы, взаимодействующие с лигандами на эндотелиальных клетках.

Гранулоциты не обладают какой-либо «врожденной» антигенной специфичностью, но им принадлежит важнейшая роль (обычно вместе с антителами и комплементом) в острой защитной воспалительной реакции на инфекцию. Главная функция этих клеток — фагоцитоз. Их значение становится очевидным на примере больных с пониженным содержанием гранулоцитов в крови или в случаях редко встречающегося наследственного им-



**Рис. 13. Хемотаксис.**

Инфекционный агент вызывает в зоне воспаления повреждение тканей и активацию комплемента. Это, в свою очередь, приводит к высвобождению медиаторов воспаления (например, одного из наиболее важных хемотаксических пептидов C5a — фрагмента пятого компонента комплемента). Медиаторы воспаления диффундируют к близлежащим венулам, где вызывают прилипание фагоцитов к эндотелию. Прилипшие фагоциты проникают своими псевдоподиями между эндотелиальными клетками и растворяют базальную мембрану. Затем они покидают кровеносные сосуды и движутся по градиенту концентрации хемотаксических медиаторов к зоне воспаления (хемотаксис)

мунодефицита, при котором ПЯН не способны мигрировать из сосудов в ответ на хемотаксический стимул; обе ситуации характеризуются повышенной восприимчивостью к инфекции.

**Нейтрофилы.** Эти лейкоциты составляют более 95 % циркулирующих гранулоцитов; для них характерны многодольчатое (сегментированное) ядро и диаметр 10...20 мкм (рис. 14).

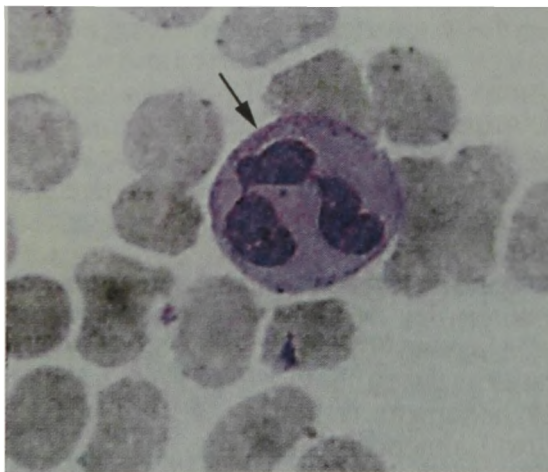
Хемотаксис нейтрофилов вызывают фрагменты белков, образующиеся в результате активации комплемента (например, C5a), факторы фибринолитической и кининовой систем, а также продукты лейкоцитарного, тромбоцитарного и бактериального происхождения. Под действием хемотаксических стимулов осуществляются «краевое стояние» (прилипание к эндотелиальным клеткам) и диапедез нейтрофилов.



Нейтрофилы обладают большим набором антибиотических белков, которые хранятся в гранулах двух типов. Первичные (азурофильные) гранулы — это лизосомы, содержащие кислые гидролазы, миелопероксидазу и мурамидазу (лизоцим). Во вторичных (специфических) гранулах помимо лизоцима обнаружен лактоферрин. Кроме ферментов и лактоферрина, в этих гранулах содержатся в высоких концентрациях антибиотические белки — дефензины, сепроцидины, кателицидины и белок, индуцирующий проницаемость бактериальных клеток. Фагоцитированные нейтрофилами микробы находятся в вакуолях (называемых фагосомами), которые сливаются с лизосомами, превращаясь в фаголизосомы.

При активации иммунными комплексами, опосредованной Fcγ-рецепторами, нейтрофилы способны также высвобождать содержимое гранул и цитотоксические соединения во внеклеточное пространство. Вполне вероятно, что именно этот механизм лежит в основе патогенеза болезней иммунных комплексов (гиперчувствительность III типа).

**Эозинофилы.** Эозинофилы крови обычно содержат двухдольчатое ядро и множество цитоплазматических гранул, которые окрашиваются кислыми красителями, например эозином. В крови здорового, не страдающего аллергией организма эозинофилы составляют около 2...5 % всех лейкоцитов. Они, по-видимому, способны фагоцитировать и уничтожать поглощенные микробные клетки, хотя это и не относится к их прямым функциям. Гранулы зрелых эозинофилов — это окруженные мембранами клеточные



**Рис. 14. Морфология нейтрофила.**

Зрелый нейтрофил с дольчатым (сегментированным) ядром в мазке крови. Окрашивание по Гимзе.  $\times 1500$

органеллы с «кристалловидной» сердцевиной, заметные на фоне окружающего матрикса благодаря их высокой электронной плотности.

Определенные стимулы вызывают дегрануляцию эозинофилов, т. е. слияние гранул с цитоплазматической мембраной и высвобождение их содержимого во внеклеточную среду. Реакция дегрануляции — это один из механизмов использования эозинофилами токсичного содержимого своих гранул для уничтожения крупных мишеней, которые не поддаются фагоцитозу. Другой механизм состоит в образовании токсичных реакционноспособных метаболитов кислорода. Оба механизма, вероятно, составляют основу противогельминтного иммунитета, в котором, как предполагается, эозинофилам принадлежит особая роль.

Привлечение эозинофилов к месту инвазии паразита происходит за счет высвобождения Т-лимфоцитами, тучными клетками и базофилами особых продуктов, таких как анафилактический фактор хемотаксиса эозинофилов (ФХЭ-А). Они связываются с поверхностью гельминта, опсонизированной специфичными антителами изотипа IgG или IgE, и в процессе дегрануляции выделяют токсин, названный основным белком. Этот токсин содержится в кристалловидной сердцевине эозинофильной гранулы; матрикс гранулы содержит другое токсичное вещество — катионный белок эозинофилов. Эозинофилы выделяют также гнeтаминазу и арилсульфатазу, которые инактивируют продукты выделения тучных клеток — гистамин и фактор анафилаксии, вызывающий замедленную реакцию (ФЗР-А). Таким образом, выделяемые эозинофилами продукты подавляют воспалительную реакцию и, в частности, миграцию гранулоцитов в очаг инвазии.

**Базофилы и тучные клетки.** Базофилы присутствуют в циркулирующей крови в очень незначительном количестве, менее 0,2 % общего числа лейкоцитов. Тучные клетки вовсе не встречаются в циркуляции и по ряду свойств отличаются от базофилов.

Известны два вида тучных клеток — тучные клетки слизистых оболочек и тучные клетки соединительной ткани. Пролиферация первых, в отличие от вторых, зависит, по-видимому, от Т-лимфоцитов. Оба вида тучных клеток видны при световой микроскопии препаратов, окрашенных основными красителями. В цитоплазме зрелых базофилов крови присутствуют неравномерно распределенные и окруженные мембранами гранулы. Гранулы базофилов и тучных клеток содержат гепарин, ФЗР-А, гистамин и ФХЭ-А. Часто тот или иной аллерген (антиген, ставший причиной аллергической реакции) служит стимулом дегрануляции тучных клеток или базофилов. Для этого он должен перекрестно «сшить» соседние молекулы IgE, связанные с высокоаффинными рецепторами для IgE (FcεRI) на плазматической мембране тучной клетки или

базофила. В результате дегрануляции происходит мгновенное высвобождение всего содержимого гранул. Сначала гранулы сливаются между собой внутри цитоплазмы, затем их содержимое выбрасывается из клетки. Секретируемые в результате дегрануляции медиаторы, например гистамин, вызывают патологические проявления аллергии, но, с другой стороны, играют положительную роль в антипаразитарном иммунитете, усиливая воспалительную реакцию.

**Тромбоциты (кровяные пластинки).** Тромбоциты кроме свертывания крови участвуют также в иммунном ответе, в частности воспалительных реакциях. Они образуются из костномозговых мегакариоцитов и содержат гранулы. У взрослого человека ежедневно появляются  $10^{11}$  новых тромбоцитов; в среднем 30 % этих клеток депонируются в селезенке. Тромбоциты экспрессируют белки МНС класса I, рецепторы для IgG (FcγRII; CD32) и низкоаффинные рецепторы для IgE (FcεRI; CD23). Кроме того, мегакариоциты и тромбоциты несут рецепторы для фактора VIII свертывания крови и другие функционально важные молекулы, такие как комплекс GpIIb/IIIa (CD41) и комплекс GpIb/GpIX (CD42). Первый из них — это цитоадгезин, ответственный за связывание с фибриногеном, фибронектином и витронектином. Оба эти комплекса представляют собой еще и рецепторы для фактора Виллебранда. Имеется также дополнительный рецептор к витронектину, CD51. И рецепторы, и молекулы адгезии важны для активации тромбоцитов. В случае повреждения эндотелия они прилипают к субэпителиальной поверхности поврежденной сосудистой стенки, образуя агрегаты. При этом из тромбоцитарных гранул двух типов высвобождается их содержимое, в том числе серотонин и фибриноген, что приводит к повышению проницаемости капилляров, активации комплемента и, вследствие этого, к привлечению лейкоцитов.

## 2.4. АНТИТЕЛА И КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ДЛЯ НИХ

- Циркулирующие антитела распознают антиген в крови и в тканевой жидкости.
- У большинства видов млекопитающих пять классов антител — IgG, IgA, IgM, IgD и IgE.
- Основная структурная единица иммуноглобулинов состоит из двух легких и двух тяжелых цепей. Классы различаются между собой тяжелыми цепями. IgA и IgM — это олигомеры основной четырехцепочечной единицы.
- Цепи иммуноглобулинов свернуты в несколько глобулярных структур, называемых доменами; легкие цепи образуют по два домена, тяжелые — четыре или пять в зависимости от класса иммуноглобулина.

- При помощи протеолитических ферментов можно получать фрагменты иммуноглобулинов для исследовательских либо медицинских целей. Папаин расщепляет молекулу IgG на три фрагмента — два Fab (антигенсвязывающих) и один Fc; пепсин отщепляет крупный F(ab)<sub>2</sub>-фрагмент, содержащий оба антигенсвязывающих центра.

- Антигенсвязывающие центры образованы гипервариабельными (V) участками цепей иммуноглобулинов. В V-доменах любой легкой или тяжелой цепи имеется по три таких участка. Свертывание цепей в домены приводит к тому, что гипервариабельные участки группируются на выступающих частях молекулы, образуя два антигенсвязывающих центра в каждой четырехцепочечной единице.

- Все антитела несут две функции. Кроме связывания антигена они осуществляют одну или несколько эффекторных функций. Структурные участки молекулы иммуноглобулина, ответственные за эффекторную активность (например, за активацию комплемента или связывание с клетками), пространственно удалены от антигенсвязывающих центров и находятся главным образом в Fc-области.

- Рецепторы для иммуноглобулинов присутствуют на поверхности мононуклеарных лейкоцитов, нейтрофилов, нормальных клеток-киллеров, эозинофилов, базофилов и тучных клеток. Взаимодействуя с Fc-областью иммуноглобулинов разных изотипов, рецепторы стимулируют, например, фагоцитоз, противоопухолевую цитотоксическую активность и дегрануляцию тучных клеток. Большинство Fcγ-рецепторов относится к молекулам суперсемейства иммуноглобулинов и имеет два или три внеклеточных иммуноглобулинподобных домена.

Основная функция специфического иммунного ответа — это специфическое распознавание чужеродных антигенов. В распознавании участвуют молекулы двух разных типов — иммуноглобулины и T-клеточные антигенраспознающие рецепторы (ТкР) (рис. 15). Структурное разнообразие этих молекул, благодаря которому они способны распознавать множество самых разных антигенов, возникает в результате многочисленных генных рекомбинаций.

Имуноглобулины представляют собой группу гликопротеидов, которые содержатся в плазме крови и в тканевой жидкости у всех млекопитающих. Некоторые иммуноглобулиновые молекулы структурно связаны с плазматической мембраной В-лимфоцитов и функционируют как антигенспецифические рецепторы. Другие (антитела) присутствуют в плазме или в лимфе как свободные молекулы. Синтез антител осуществляют В-клетки, но для этого необходим контакт с антигеном и вызванное им созревание В-клеток в антителообразующие клетки (АОК). К АОК относятся, в частности, секретирующие значительные количества антител плазматические клетки (так первоначально гистологи называли АОК, выявляемые в крови и тканях). Мембраносвязанные иммуногло-



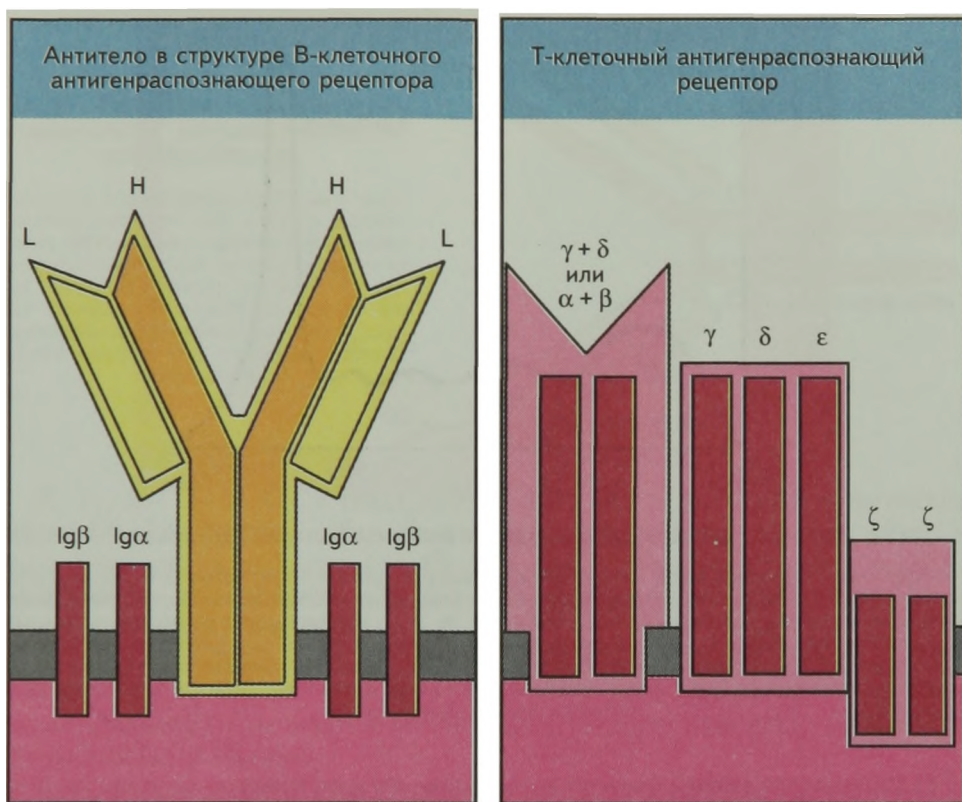


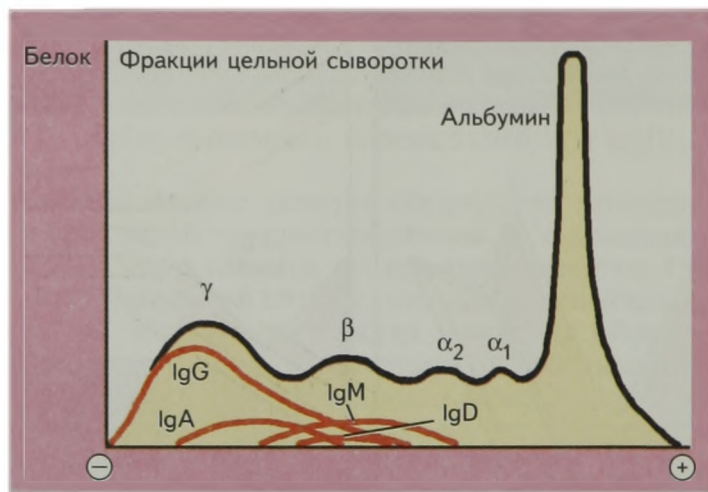
Рис. 15. Молекулы, распознающие антиген (принцип строения).

Антигенраспознающие рецепторы Т- и В-клеток происходят, вероятно, от общего филогенетического предшественника и принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов. Основную часть В-клеточного рецептора образуют две одинаковых тяжелых (Н) и две одинаковых легких (L) цепи. С основной частью рецептора непосредственно связаны дополнительные компоненты (Igα и Igβ), по-видимому, соединяющие его с путями внутриклеточной передачи сигнала. Циркулирующие антитела структурно подобны основной части этих В-клеточных рецепторов, но лишены их трансмембранных и внутрицитоплазматических сегментов. Антигенсвязывающий центр Т-клеточного рецептора состоит из одной α-цепи и одной β-цепи (или одной γ- и одной δ-цепи), которые ассоциированы с четырьмя структурно отличными от них трансмембранными пептидами (γ, δ, ε и ζ)

булины незрелых В-клеток (предшественников) имеют ту же самую антигенсвязывающую специфичность, что и антитела, образуемые зрелыми АОК.

#### 2.4.1. ИММУНОГЛОБУЛИНЫ — ОСОБОЕ СЕМЕЙСТВО БЕЛКОВ

У большинства высших млекопитающих обнаружено пять классов иммуноглобулинов — IgG, IgA, IgM, IgD и IgE, которые различаются по размерам молекул, заряду, аминокислотному составу и содержанию углеводов.



**Рис. 16. Распределение основных изотипов иммуноглобулинов.**

Электрофорезграмма сыворотки крови, показывающая распределение четырех основных классов иммуноглобулинов. В электрическом поле происходит разделение сывороточных белков соответственно заряду их молекул на фракции  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  в зависимости от подвижности. (IgE по подвижности сходен с IgD, но из-за низкой концентрации в сыворотке не представлен здесь количественно.) Класс IgG наиболее гетерогенен по заряду молекул; другие классы иммуноглобулинов имеют более узкий интервал подвижности, главным образом в  $\beta$ - и «быстрой»  $\gamma$ -области электрофорезграммы

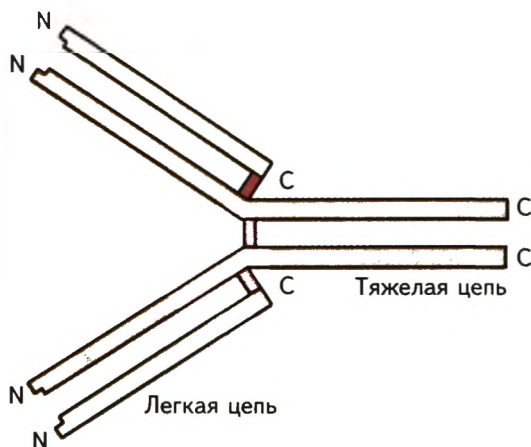
Помимо различий между классами, существует и весьма значительная гетерогенность в пределах каждого класса. Так, по электрофоретическим свойствам иммуноглобулины настолько разнообразны, что встречаются во всех фракциях нормальной сыворотки, от  $\alpha$  до  $\gamma$  (рис. 16).

Имуноглобулины — бифункциональные молекулы. Каждый иммуноглобулин выполняет две функции. Одна область его молекулы предназначена для связывания с антигеном, другая осуществляет так называемые эффекторные функции. К ним относится связывание иммуноглобулина с тканями организма, различными клетками иммунной системы, определенными фагоцитарными клетками и первым компонентом комплемента (C1q) при активации этой системы по классическому пути.

Принадлежность иммуноглобулина к определенному классу и подклассу определяется структурой тяжелой цепи. Основная структурная единица иммуноглобулина любого класса состоит из двух одинаковых легких и двух одинаковых тяжелых полипептидных цепей, удерживаемых вместе дисульфидными связями (рис. 17). От типа тяжелых цепей зависит принадлежность молекулы иммуноглобулина к тому или иному классу и подклассу. Так, у человека четыре подкласса IgG (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) имеют тяжелые цепи соответственно  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  и  $\gamma_4$ ; все они выявляются иммунохимически как  $\gamma$ -цепи, но незначительно отличаются друг от друга.

**Рис. 17. Структура основной четырехцепочечной единицы молекулы иммуноглобулина**

Основная структурная единица иммуноглобулинов состоит из двух одинаковых легких и двух одинаковых тяжелых полипептидных цепей, соединенных дисульфидными связями (красные линии). Обратите внимание на положение аминоконцевых (N) и карбоксиконцевых (C) участков пептидных цепей



К 1-, 2-, 3- и 4-му подклассам IgG относится соответственно около 66, 23, 7 и 4 % общего числа молекул этого класса. Известны также два подкласса IgA (IgA1 и IgA2). Разнообразие классов и подклассов иммуноглобулинов обусловлено изотипической изменчивостью их молекул.

В процессе эволюции подклассы иммуноглобулинов возникли, по-видимому, позже классов. Поэтому подклассы IgG человека очень сильно отличаются от четырех подклассов IgG, идентифицированных у мыши.

У каждого класса иммуноглобулинов свой набор функций. Все иммуноглобулины — это гликопротеиды; содержание углеводов в них варьируется от 2...3 % у IgG до 12...14 % у IgM, IgD и IgE. Физико-химические свойства иммуноглобулинов приведены в таблице 1.

**IgG.** Это главный изотип иммуноглобулинов нормальной сыворотки; на его долю приходится 70...75 % общего количества сывороточных иммуноглобулинов. Молекула IgG представляет собой четырехцепочечный мономер с коэффициентом седиментации 7S и молекулярной массой 146 000. При этом белки IgG3 несколько крупнее белков других подклассов из-за большей по размерам  $\gamma_3$ -цепи. Иммуноглобулины класса G равномерно распределены между внутри- и внесосудистым пулами и составляют большинство антител вторичного иммунного ответа, а также основную часть антитоксинов. Кроме того, именно материнские IgG обеспечивают невосприимчивость новорожденного к инфекциям в первые несколько месяцев жизни. У человека антитела всех подклассов IgG проникают через плаценту в организм плода, создавая напряженный пассивный иммунитет на весь неонатальный период. У млекопитающих тех видов, для которых характерна передача материнского иммуноглобулина потомству только после рождения, например у свиньи, IgG, поступающий с молоком, избирательно проникает из желудочно-кишечного тракта в кровотоки новорожденного.

## 1. Физико-химические свойства иммуноглобулинов

Свойства	Изотип иммуноглобулина									
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	sIgA	IgD	IgE
Тяжелая цепь	$\gamma_1$	$\gamma_2$	$\gamma_3$	$\gamma_4$	$\mu$	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_1/\alpha_2$	$\delta$	$\epsilon$
Средняя концентрация в сыворотке, мг/мл	9	3	1	0,5	1,5	3,0	0,5	0,05	0,03	0,00005
Коэффициент седиментации	7S	7S	7S	7S	19S	7S	7S	11S	7S	8S
Молекулярная масса ( $\times 10^3$ )	146	146	170	146	970	160	160	385	184	188
Время полужизни, сут	21	20	7	21	10	6	6	Нет данных	3	2
Внутрисосудистый пул, %	45	45	45	45	80	42	42	Следы	75	50
Содержание углеводов, %	2...3	2...3	2...3	2...3	12	7...11	7...11	7...11	9..14	12

Примечание. Иммуноглобулины каждого класса — IgG, IgM, IgA, IgD и IgE — имеют свой характерный тип тяжелой цепи —  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  и  $\epsilon$  соответственно. Внутри некоторых классов существуют разные варианты тяжелых цепей, определяющие деление класса на подклассы. Например, пул IgG человека включает четыре подкласса, различия между которыми состоят в строении  $\gamma$ -цепи. Классы (изотипы) иммуноглобулинов различаются по свойствам. Примечательно, что в выделениях организма IgA представлен секреторной формой (sIgA) — димером, соединенным с дополнительной пептидной цепью (она названа секреторным компонентом). Концентрация sIgA в сыворотке крови очень низкая, тогда как в кишечном соке может быть весьма значительной.

**IgM.** К этому классу относится примерно 10 % общего пула иммуноглобулинов сыворотки крови. Молекула IgM представляет собой пентамер основной четырехцепочечной единицы. Отдельная тяжелая цепь имеет молекулярную массу 65 000, а вся молекула — 970 000. Антитела этого класса содержатся преимущественно во внутрисосудистом пуле иммуноглобулинов и доминируют в качестве «ранних» антител, чаще всего при иммунном ответе на сложные по антигенному составу патогенные микроорганизмы.

**IgA.** Белки этого класса составляют 15...20 % общего количества иммуноглобулинов в сыворотке крови человека, где они более чем на 80 % представлены в виде мономера — четырехцепочечной единицы. Однако в сыворотке большинства других млекопитающих IgA присутствует большей частью в полимерной форме, чаще всего как димер четырехцепочечной единицы. IgA — это главный класс иммуноглобулинов серозно-слизистых секретов, таких как слюна, молозиво и молоко, а также отделяемого слизистой оболочки дыхательных и мочеполовых путей.

Секреторные IgA (sIgA) относятся к подклассу IgA1 или IgA2 и представлены в основном димерной формой с коэффициентом



седиментации 11S и молекулярной массой 385 000. Они присутствуют в большом количестве в серозно-слизистых секретах, где связаны с другим белком, называемым секреторным компонентом.

**IgD.** Этот класс составляет менее 1 % всех иммуноглобулинов плазмы, но обильно представлен на мембране многих В-лимфоцитов. Биологическая роль иммуноглобулинов данного класса до конца не известна. Предположительно они участвуют в антиген-зависимой дифференцировке лимфоцитов.

**IgE.** Концентрация иммуноглобулинов этого класса в сыворотке крови исчезающе мала, но он выявляется на поверхностной мембране базофилов и тучных клеток у любого человека. Кроме того, ими сенсибилизированы клетки слизистых оболочек, в частности носовой полости, бронхов и конъюнктивы. Возможно, IgE имеют существенное значение в антигельминтозном иммунитете, однако в развитых странах с ними чаще всего связан патогенез аллергических заболеваний, например бронхиальной астмы и поллиноза (сенной лихорадки).

#### 2.4.2. СТРОЕНИЕ АНТИТЕЛ

Основная четырехцепочечная структурная единица (мономер) молекул иммуноглобулинов (рис. 18) образована полипептидными цепями двух разных типов. Меньшие по размерам (легкие, L — от англ. light) цепи имеют молекулярную массу 25 000 и одинаковы у всех классов, тогда как более крупные (тяжелые, H — от англ. heavy) цепи, молекулярной массой 50 000...77 000, структурно различны у разных классов и подклассов иммуноглобулинов. Полипептидные цепи удерживаются вместе ковалентными и нековалентными связями.

Каждая цепь содержит переменную и константную области. У большинства позвоночных легкие цепи существуют в двух различных изотипических формах, обозначенных каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ). В молекуле иммуноглобулина могут объединяться пары легких и тяжелых цепей любого типа, но обе цепи в паре относятся к одному типу.

Как установили Хильшманн, Крейг и соавторы (1965), легкие цепи состоят из двух различных областей. С-концевая половина (приблизительно 107 аминокислотных остатков) цепи одинакова (константна) у легких цепей всех типов (исключая некоторые аллотипические и изотипические варианты, см. ниже); она названа константной, или  $C_L$ -областью (от англ. constant light chain). В то же время N-концевая половина этой цепи имеет множество вариантов аминокислотной последовательности, из-за чего названа переменной, или  $V_L$ -областью (от variable light chain).

Молекулы IgG имеют типичную для антител структуру. В качестве «типичного» антитела можно рассматривать молекулу IgG (см. рис. 18). В ней имеется две внутрицепочечные дисульфидные

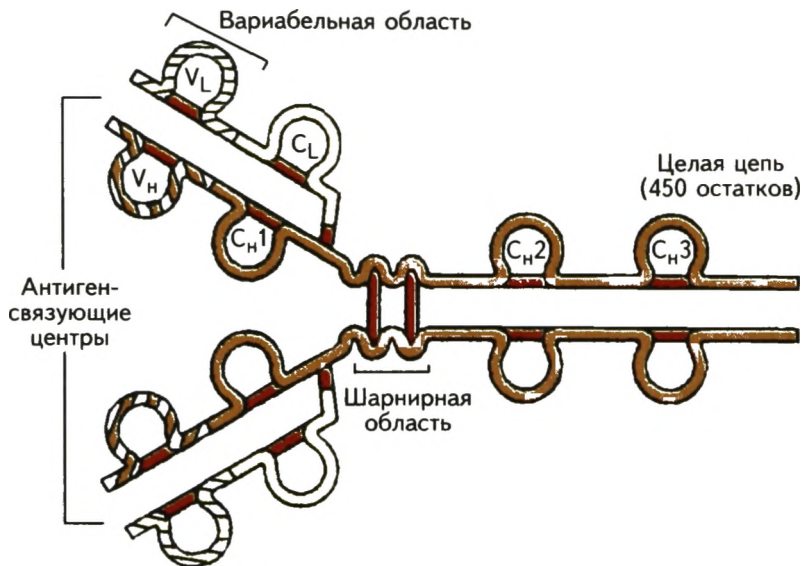


Рис. 18. Общая схема строения IgG1.

N-концевой последовательности как легких (L), так и тяжелых (H) цепей IgG1 свойственна вариабельность (V), поэтому эти области названы соответственно  $V_L$  и  $V_H$ . Остальные части молекулы имеют относительно неизменную (константную — C) структуру. Константная область легкой цепи обозначается  $C_L$ . Константную область тяжелой цепи подразделяют еще на три структурно обособленные области —  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ . И вариабельные, и константные области легких и тяжелых цепей образуют стабилизированные внутрицепочечными дисульфидными связями (показаны красным цветом) глобулярные структуры, называемые доменами. Антигенсвязывающие центры молекулы иммуноглобулина образованы вариабельными доменами  $V_L$  и  $V_H$ . Отрезок тяжелой цепи между доменами  $C_{H1}$  и  $C_{H2}$  называют шарнирной областью; она обладает гибкостью, которая позволяет обоим антигенсвязывающим центрам функционировать независимо один от другого. За исключением домена  $C_{H2}$ , домены одной тяжелой цепи тесно прилегают к гомологичным (V и C) доменам легкой цепи и к  $C_{H3}$ -области другой тяжелой цепи (см. рис. 19). К  $C_{H2}$ -доменам присоединяются углеводные компоненты

связи в каждой легкой цепи: по одной в вариабельной и константной областях и четыре таких связи в каждой тяжелой ( $\gamma$ ) цепи, которая вдвое длиннее легкой. Каждая дисульфидная связь замыкает пептидную петлю из 60...70 аминокислотных остатков; при сравнении аминокислотных последовательностей этих петель выявляется удивительно высокая степень их гомологии. В основном поэтому каждая полипептидная цепь иммуноглобулина образует несколько глобулярных доменов с весьма сходной вторичной и третичной структурой.

Пептидная петля, замкнутая дисульфидной связью, — это центральная часть домена, в котором насчитывается примерно 110 аминокислотных остатков. Как в легких, так и в тяжелых цепях первые от N-конца домены образованы соответственно вариабельными областями  $V_L$  и  $V_H$  (рис. 19). Тяжелые цепи IgG, IgA и IgD имеют еще три домена —  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ , составляющих константную область. В цепях  $\mu$  и  $\epsilon$  непосредственно за  $C_{H1}$  следует

один дополнительный домен, поэтому С-концевые домены тяжелых цепей IgM и IgE (обозначаемые  $C_{\mu 4}$  и  $C_{\epsilon 4}$ ) гомологичны  $C_{\mu 3}$ -домену IgG ( $C_{\gamma 3}$ ).

По данным рентгеноструктурного анализа удалось реконструировать  $\alpha$ -углеродный скелет и построить компьютерные модели целых молекул IgG. Модельные IgG имеют вид Y- и T-образных структур, и аналогичные формы IgG выявлены при помощи электронной микроскопии.

В Fab-области молекулы иммуноглобулина гомологичные домены легких и тяжелых цепей располагаются парами (как показано на рис. 19).  $C_{\gamma 3}$ -домены двух тяжелых цепей также образуют пару, но  $C_{\gamma 2}$ -домены разделены углеводными компонентами.

Несмотря на структурное сходство гомологичных доменов, междоменные взаимодействия в разных парах существенно различаются. Например, варибельные домены контактируют друг с другом слоями, состоящими из трех сегментов, а константные — слоями из четырех сегментов цепи. Модель молекулы IgG1, представленная на рис. 19, в общем адекватно отражает структуру элементарных единиц в составе иммуноглобулинов всех изотипов, однако каждый класс и подкласс имеет свои характерные отличия в деталях строения.

Четыре подкласса IgG лишь незначительно различаются по аминокислотной последовательности тяжелых цепей. Этими различиями, относящимися в основном к шарнирной области, обусловлены изотипические вариации расположения и числа межцепочечных дисульфидных связей. Из четырех подклассов наиболее выраженной структурной особенностью — удлиненной шарнирной областью — обладает IgG3, чем объясняется его более высокая молекулярная масса и, отчасти, повышенная биологическая активность.

**IgM.** IgM обычно обнаруживается в виде пентамера основной четырехцепочечной структурной единицы. Отличие его  $\mu$ -цепи от  $\gamma$ -цепей IgG состоит в иной аминокислот-

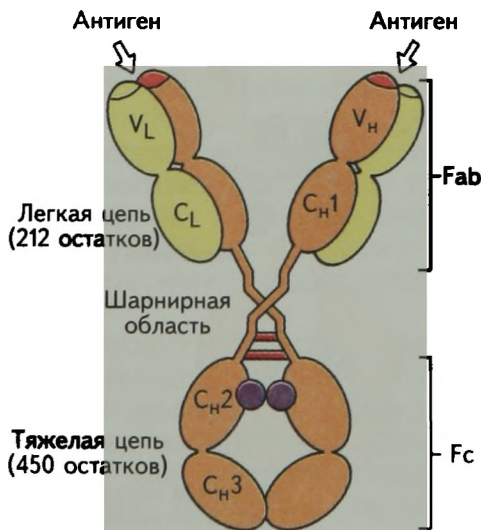


Рис. 19. Структура IgG1.

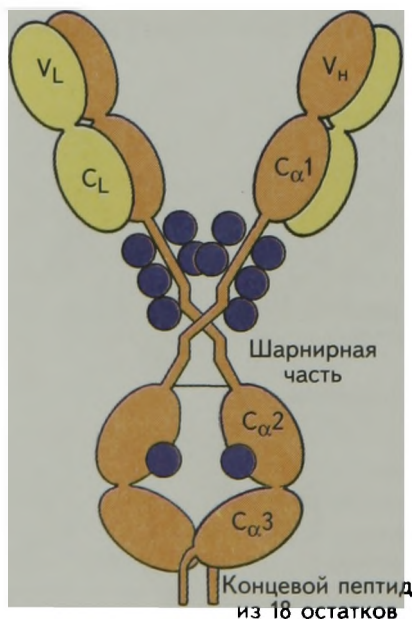
Модель молекулы IgG1 с изображением глобулярных доменов тяжелой (H) и легкой (L) цепей. Отображено взаимное сближение доменов  $C_{\mu 3}$  и разделение доменов  $C_{\mu 2}$ , между которыми расположены углеводные компоненты (показаны синим). На этом рисунке дисульфидные связи между H- и L-цепями не показаны

ной последовательности и наличии дополнительного константного домена с С-концевым пептидом из 18 аминокислотных остатков. Субъединицы пентамера соединены дисульфидными связями между  $C_{\mu 3}$ -доменами и, вероятно, между С-концевыми пептидами. По данным электронной микроскопии, молекула IgM имеет плотно сложенный центр, от которого расходятся пять ветвей.

Молекулу IgM характеризуют еще два свойства: многочисленные присоединенные к  $\mu$ -цепи олигосахариды и добавочная пептидная J-цепь (от англ. joining — соединение), которая предположительно принимает участие в полимеризации мономерных единиц, предшествующей выходу IgM из синтезирующей его клетки. J-цепь представляет собой полипептид из 137 аминокислотных остатков, образующий домен иммуноглобулинового типа. Каждая молекула IgM содержит только одну J-цепь. Она соединена дисульфидными связями с С-концевыми, состоящими из 18 аминокислотных остатков, пептидами тяжелых цепей отдельных мономеров (дисульфидную связь образует остаток цистеина в предпоследней позиции). Имеется наблюдение, что в клетках, секретирующих IgM преимущественно в форме гексамера, отсутствуют свободные J-цепи.

**IgA.** Состоящая из 472 аминокислотных остатков  $\alpha$ -цепь свертывается с образованием четырех доменов:  $V_H$ ,  $C_{\alpha 1}$ ,  $C_{\alpha 2}$  и  $C_{\alpha 3}$  (рис. 20). Аналогично IgM тяжелая цепь IgA содержит дополнительный С-концевой пептид из 18 аминокислотных остатков с остатком цистеина в предпоследней позиции. Этот остаток способен ковалентно взаимодействовать с J-цепью, соединяющей две молекулы с образованием димера. На электронных микрофотографиях димеры IgA выглядят как двойные Y-формы, что свидетельствует о соединении двух мономерных субъединиц «конец в конец» и об участии в этом соединении С-концевых областей  $C_{\alpha 3}$ .

Секреторный IgA (sIgA) представлен главным образом димерной формой с коэффициентом седиментации 11S (молекулярная масса 380 000). Полностью собранная молекула состоит из двух мономеров



**Рис. 20. Структура IgA1.**

Доменная структура IgA1 и вероятное расположение углеводных цепей (показаны синим). Отмечен «хвостовой» пептид из 18 аминокислотных остатков на С-конце (общий признак с IgM) и шарнирная область



IgA, одного секреторного компонента (молекулярная масса 70 000) и одной J-цепи (молекулярная масса 15 000). Как все эти пептидные цепи связаны между собой, до конца не ясно. В противоположность J-цепи секреторный компонент синтезируется не в плазматических, а в эпителиальных клетках. Молекулы IgA, удерживаемые в димерной конфигурации J-цепью и секретируемые субэпителиальными плазматическими клетками слизистых оболочек, при прохождении через эпителиальный покров активно связывают секреторный компонент. Он способствует доставке антител sIgA в выделения организма, а также защищает эти антитела от протеолиза.

Преобладающий подкласс IgA как в сыворотке, так и в выделениях организма (носовой секрет, слюна, слезы, молоко) — это IgA1 (~90 % и 70...95 % соответственно). Однако в просвете толстой кишки около 60 % IgA составляет подкласс IgA2. Многие представители микрофлоры верхних дыхательных путей, приспособленные к условиям обитания, выделяют протеазы, расщепляющие IgA1.

**IgD.** К IgD относится менее 1 % иммуноглобулинов сыворотки крови. Этот белок гораздо более чувствителен к протеолизу, чем IgG1, IgG2, IgA или IgM и, кроме того, проявляет тенденцию к спонтанному протеолизу. По-видимому, его  $\delta$ -цепи удерживаются вместе всего одной дисульфидной связью и соединены с большим числом углеводных (олигосахаридных) цепей.

**IgE.** Молекула IgE состоит из более крупных (по сравнению с другими изотипами)  $\epsilon$ -цепей (72 500), содержащих большее число аминокислотных остатков (приблизительно 550) и образующих пять доменов ( $V_H$ ,  $C_{\epsilon 1}$ ,  $C_{\epsilon 2}$ ,  $C_{\epsilon 3}$  и  $C_{\epsilon 4}$ ).

## 2.5. КОМПЛЕМЕНТ

- Система комплемента — это одна из основных систем врожденного иммунитета, функция которой состоит в том, чтобы отличать «свое» от «не-своего». Такая дифференциация осуществляется благодаря присутствию на собственных клетках организма регуляторных молекул, подавляющих активацию комплемента.

- Существует два главных пути (механизма) активации комплемента — классический и альтернативный. При классической активации происходит связывание иммунных комплексов с C1q, что объединяет приобретенный иммунитет (антитела) с врожденным (комплемент).

- В плазме крови постоянно происходит «холостая» активация C3, приводящая к фиксации небольшого числа его молекул на поверхности как «своего», так и «не-своего». На поверхности собственных клеток регуляторные белки вызывают разрушение связавшихся молекул C3 и подавляют дальнейшую активацию комплемента. На чужеродных структурах, лишенных регулятор-

ных белков, напротив, начинается альтернативная активация комплемента.

- Наличие внутренней тиоэфирной связи в белках C3 и C4 позволяет им ковалентно взаимодействовать с гидроксид- и аминогруппами других молекул. Образование этой связи составляет ключевой момент активации комплемента в очагах воспаления.

- При активации комплемента действуют два механизма усиления. Первый известен как «запуск ферментного каскада». «Пусковым сигналом» служит связывание небольшого числа молекул C1q, вызывающее затем последовательную активацию ряда зимогенов (проферментов), которые расщепляют уже значительно большее число молекул C3.

- Второй механизм усиления — это действующая по принципу положительной обратной связи «петля усиления». Расщепление небольшого количества молекул C3 с образованием C3b способствует появлению фермента C3-конвертазы, который расщепляет гораздо больше C3. На собственных клетках организма имеются молекулы, подавляющие действие этой петли усиления путем расщепления C3b на неактивные продукты. На чужеродных структурах действие «петли усиления» не встречает препятствий.

- Эффекторные механизмы системы комплемента делятся на пять групп в зависимости от функции: 1) опсонизация микробов для поглощения их фагоцитами; 2) непосредственное уничтожение микроорганизмов путем лизиса; 3) активация и хемотаксическое привлечение лейкоцитов в очаг воспаления; 4) процессинг (специфическое расщепление) иммунных комплексов; 5) индукция специфических антител путем, во-первых, усиленной локализации антигенов на поверхности В-лимфоцитов и антигенпрезентирующих клеток и, во-вторых, снижения порога активации В-лимфоцитов.

- Патогенные микробы вырабатывают механизмы, позволяющие им избежать уничтожения системой комплемента, а в некоторых случаях даже использовать ее для усиления своей патогенности.

- Система комплемента может участвовать в патогенезе заболевания, если происходит ее генерализованная активация *in vivo* или активация на собственных тканях в результате связывания комплемента аутоантителами.

Термин «комплемент» первоначально применил П. Эрлих для описания «дополнительной», присутствующей в сыворотке активности, без которой специфические антитела не могут лизировать бактерии. Открытие этой термолabile активности в сыворотке крови обычно приписывают Ж. Борде (1895), хотя нечто подобное несколькими годами ранее описал Г. Наттолл.

**Сложная номенклатура системы комплемента.** Белки классического пути активации и лизирующей мембрану комплекса обозначены каждый своим номером и вступают в реакцию активации в

следующем порядке: Clq, Clr, Cls, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9. Среди них много предшественников ферментов — проферментов, которые приобретают активность только после расщепления. Обозначение активного фермента отличается от обозначения его неактивного предшественника надбуквенной чертой, например Clc. Продукты расщепления обозначаются так же, как исходные компоненты комплекта, но с добавлением строчных букв — обычно для меньшего фрагмента — «а», а для большего — «b», например C3a и C3b. Из этого правила имеется одно исключение: C2b означает меньший, а C2a — больший фрагмент C2.

Белки альтернативного пути активации называют факторами и обозначают однобуквенными символами. В тексте слово фактор обычно сокращается до первой буквы F или вовсе опускается, и в результате фактор В может быть обозначен аббревиатурой FB или просто В. Регуляторные белки чаще всего обозначают аббревиатурами названий их функциональной активности: например, белок, ускоряющий диссоциацию C3-конвертазы классического пути, имеет символ DAF (от англ. decay accelerating factor), или, по-русски, ФУД (фактор ускорения диссоциации).

Клеточные рецепторы, связывающие компоненты комплекта, названы по аббревиатурам своих лигандов (например, C5a-рецептор) или как маркерные молекулы в номенклатуре CD-системы. Отдельно пронумерованы рецепторы для главных фрагментов C3 как рецепторы комплекта типов 1, 2, 3 и 4 (CR1, CR2, CR3 и CR4). К сожалению, в результате этого некоторые рецепторы в современной литературе имеют по три синонима, например C3b-рецептор = CR1 = CD35.

Белки системы комплекта относятся к различным суперсемействам. Белки, объединенные в одно суперсемейство, например иммуноглобулинов, имеют много общих структурных и функциональных свойств. В систему комплекта входят белки, относящиеся к нескольким суперсемействам.

Классификация белков комплекта по суперсемействам позволяет лучше понять их структурные и функциональные взаимосвязи. Поясним это на примере суперсемейства регуляторных белков комплекта, называемых также *регуляторами активации комплекта*. К ним относятся:

фактор H — белок плазмы крови с молекулой удлиненной конфигурации;

C4-связывающий белок [C4-bp (binding protein)] — гептамерный белок плазмы, молекула которого имеет паукообразную форму;

фактор, ускоряющий диссоциацию C3-конвертазы (ФУД, CD55), — белок клеточной мембраны, закрепленный в ней на своеобразной гликофосфолипидной «ножке»;

мембранный кофакторный белок (МКБ, CD46) — трансмембранный белок, действующий как кофактор расщепления C3b;

рецепторы комплемента типа 1 (CR1, CD35) и типа 2 (CR2, CD21) — клеточные рецепторы, имеющие трансмембранные домены.

Семейство регуляторных белков комплемента кодирует группа тесно сцепленных генов, расположенных в хромосоме 1. При очевидных различиях структуры все эти белки содержат одинаковый домен, состоящий примерно из 60 аминокислотных остатков и названный *коротким общим повтором*. Этот домен может много раз встречаться в структуре каждой молекулы, образуя ее каркас и, возможно, определяя специфичность связывания. Синтез этих белков кодируют гомологичные, tandemно расположенные экзоны.

Составляющие это семейство шесть белков выполняют также ряд общих функций в активации комплемента: фактор H, C4-bp, ФУД, МКБ и CR1 подавляют образование комплексов C4b2a и C3bBb, т. е. C3-конвертаз классического и альтернативного путей активации. Некоторые из этих белков имеют и другие общие функции, но не идентичные, а лишь частично перекрывающиеся. Такие функции включают: подавление связывания C2 с C4b и фактора В с C3b, индукцию диссоциации C2a от C4b и Bb от C3b, действие в качестве кофакторов фактора I — фермента, ответственного за катаболизм C3b и C4b.

Следует отметить, что короткие общие повторы имеются и в других белках, которые, однако, не взаимодействуют с белками комплемента; это рецептор для ИЛ-2,  $\beta_2$ -гликопротеид I и фактор XIII системы свертывания крови.

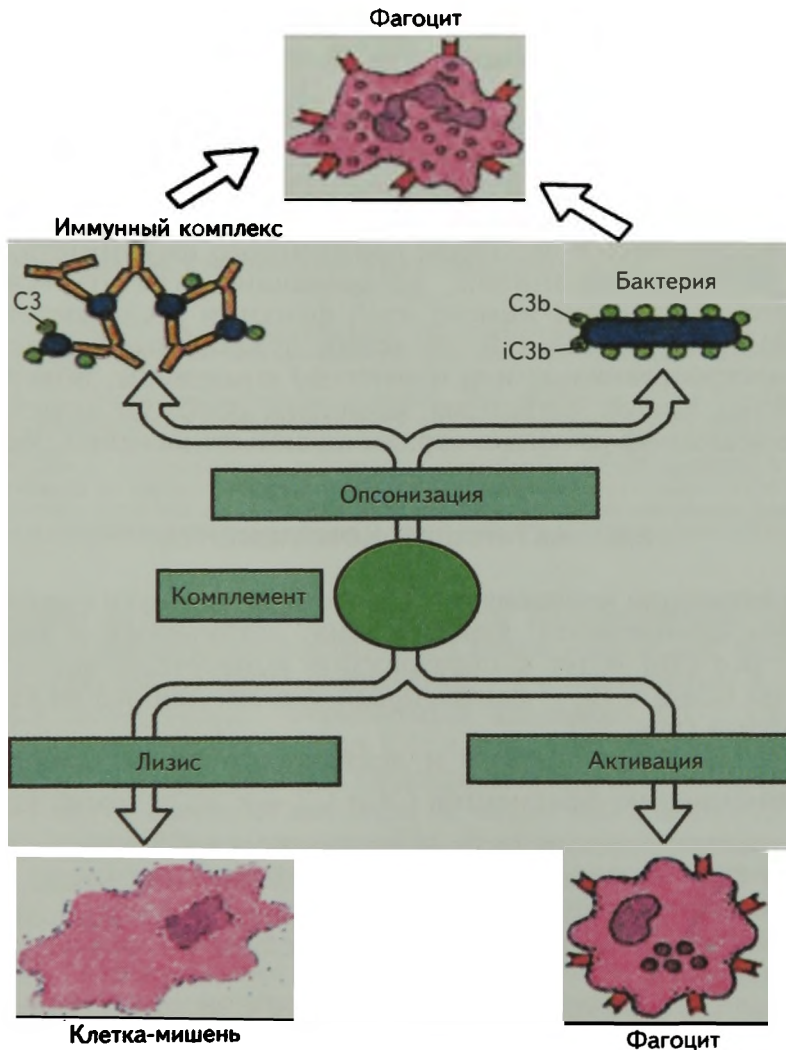
**Активация комплемента** — один из главных эффекторных механизмов воспаления. Система комплемента относится к факторам врожденного иммунитета и включает в себя ряд белков, действующих последовательно, т. е. каскадом, в котором каждый фермент катализирует активность следующего. Наиболее важный компонент комплемента — это C3, присутствующий в плазме крови в той же концентрации (1...2 мг/мл), что и некоторые иммуноглобулины. Два главных пути активации комплемента отражают особенности его участия в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета. Классический путь связан с приобретенным иммунитетом, поскольку белок C1q взаимодействует с антителами, образовавшими комплекс с антигеном. Альтернативный путь активации комплемента относится к механизмам врожденного иммунитета, начинаясь иммунонеспецифическим связыванием C3b с поверхностью микроорганизма.

Активность отдельных компонентов комплемента *in vivo* можно проиллюстрировать на примерах расстройств, вызванных недостаточностью этих белков. У таких особей наблюдается повышенная восприимчивость к рецидивирующим гнойным бактериальным инфекциям, а также к заболеваниям, для которых характерно повышенное образование аутоантител и иммунных



комплексов. Эти наблюдения свидетельствуют о необходимости комплемента как для антибактериальной защиты, так и для устранения иммунных комплексов, которые в противном случае способны вызывать аутоиммунные заболевания и болезни иммунных комплексов.

В результате активации комплемента при воспалении происходят: опсонизация микроорганизмов и иммунных комплексов; активация лейкоцитов; лизис клеток-мишеней (рис. 21).



**Рис. 21. Три главные функции комплемента в воспалительном процессе.**

1. Опсонизация («одевание») комплементом микроорганизмов и иммунных комплексов для их распознавания клетками, экспрессирующими рецепторы комплемента; 2. Лизис клеток-мишеней; 3. Активация фагоцитов, включая макрофаги и нейтрофилы

**Опсонизация.** Это стимуляция фагоцитоза в результате прикрепления белков комплемента к поверхности мишеней (микробов, иммунных комплексов и др.). Обладая рецепторами к опсонизирующим белкам, фагоцитарные клетки связывают мишени, что вызывает активацию фагоцитов и эндоцитоз или фагоцитоз мишеней.

**Активация лейкоцитов.** Полиморфно-ядерные гранулоциты и макрофаги обладают специфическими рецепторами к мелким фрагментам белков комплемента, образующимся на поверхности мишеней в результате каскада протеолитических реакций. Диффундируя в окружающую среду, эти фрагменты привлекают фагоциты (направленное движение клеток, или хемотаксис) и, связываясь с ними, вызывают их активацию.

**Лизис клеток-мишеней.** Протеолитический каскад комплемента завершается погружением гидрофобного «зонда» в липидный бислой мембраны клетки-мишени и ее последующим осмотическим разрывом и лизисом.

Комплемент способен отличать «свое» от «не своего». Относясь к факторам врожденного иммунитета, комплемент реализует механизмы, позволяющие отличать «свое» от «не своего». Ключевой момент этой функции заключается в немедленном связывании C3b со всеми чужеродными объектами, будь то микроорганизмы или иммунные комплексы; поверхность собственных клеток организма защищена особыми молекулами, которые весьма эффективно ограничивают отложение C3b.

### 2.5.1. АКТИВАЦИЯ КОМПЛЕМЕНТА

**Пути активации комплемента.** Существует три пути (механизма) активации комплемента: классический, лектиновый и альтернативный. Все они ведут к образованию конвертазы, расщепляющей C3 на C3a и C3b, — центральный момент любого из каскадов комплемента (рис. 22).

Конвертаза классического и лектинового путей представляет собой комбинацию фрагментов C4 и C2 —  $C4b2a$ , тогда как конвертаза альтернативного пути — это комплекс C3 с FВ —  $C3bBb$ . Фрагмент C3b, который отщепляют от C3 обе конвертазы, связывается с мембраной мишени и становится фокусом дополнительного образования C3b — эта ступень каскада получила название петли усиления.

Присоединяя дополнительно молекулу C3b, обе C3-конвертазы могут превращаться в конвертазу C5, которая функционирует как катализатор на первой ступени каскада, ведущего к образованию лизирующей мембрану комплекса.

*Классический путь* активации комплемента чаще всего запускается иммунными комплексами. Зависимая от антител активация

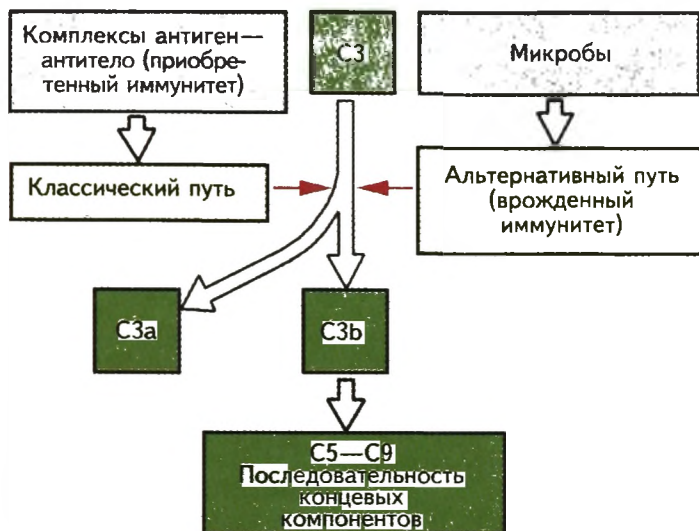


Рис. 22. Сопоставление классического и альтернативного путей активации комплемента.

Активация комплемента как по классическому, так и по альтернативному пути приводит к появлению C3-конвертазы, которая превращает C3 в C3b, и эта конверсия — центральное событие всего каскада. В свою очередь, C3b активирует цепочку концевых компонентов комплемента (C5—C9), образующих литический комплекс. При активации по классическому пути сначала антиген связывается со специфическими антителами и только затем происходит фиксация C3. В альтернативной активации антитела не участвуют. Она начинается ковалентным связыванием C3b с гидроксильными группами на цитоплазматической мембране микробной клетки. Активация по альтернативному пути служит механизмом неспецифического врожденного иммунитета, тогда как классический путь представляет собой связующее звено между врожденным и приобретенным иммунитетом, появившееся в филогенезе сравнительно недавно

комплемента развертывается в основном по классическому пути; роль первого ферментного комплекса в нем выполняет белок C1.

Активацию инициирует связывание C1 с антителами в составе иммунных комплексов. Ферментный комплекс C1 состоит из пяти молекул — одной C1q, двух C1r и двух C1s; их соединение зависит от  $Ca^{2+}$ . Первая ступень каскада активации по классическому пути — это связывание антитела не менее чем с двумя из шести сферических доменов молекулы C1q. В этом высокоавидном связывании участвуют  $C_{H2}$ -домены (части Fc-областей) агрегированных молекул IgG в составе комплекса с антигеном. Молекулы C1q могут также связываться  $C_{H3}$ -доменами неагрегированной молекулы IgM, конформация которой изменилась с «плоской» на «сложенную» в результате образования комплекса с антигеном.

Предполагается, что многоточечное связывание сферических доменов C1q с входящими в иммунные комплексы молекулами IgG или IgM ведет к изменению конформации всего комплекса C1, вызывая автокаталитическую самоактивацию сначала одной, а затем и другой молекулы C1r с превращением их в две молекулы ак-

тивного фермента  $C1g$ , которые расщепляют обе молекулы  $C1s$  с образованием соответственно двух молекул  $C1s$ , обладающих активностью сериновой эстеразы.

*Лектиновый путь* активации комплемента почти идентичен классическому, но запускается независимо от антител. Белок  $C1q$  относится к семейству кальцийзависимых лектинов, названных коллектинами (коллагеновые лектины). В это же семейство белков входят маннансвязывающий лектин (МСЛ), называемый иначе маннансвязывающим белком (МСБ), конглютинин и легочные поверхностно-активные белки А и D. Сывороточный МСЛ может связываться с концевыми маннановыми группами на поверхности клеток бактерий, приобретая за счет этого способность к взаимодействию с двумя маннансвязывающими лектинассоциированными сериновыми протеиназами, МАСП1 и МАСП2, гомологичными по структуре  $C1g$  и  $C1s$ . Это взаимодействие подобно взаимодействию  $C1q$  с  $C1g$  и  $C1s$  и приводит к независимой от антител активации комплемента по классическому пути.

Кроме того,  $C1q$  связывается непосредственно, т. е. без участия антител, с некоторыми микробами, в частности с микоплазмами и рядом ретровирусов (но не ВИЧ).

Под действием  $C1$  происходит расщепление  $C4$  с образованием активированного  $C4b$ . Белок  $C4$  комплемента содержит внутреннюю тиоэфирную связь, участок расположения которой высокогомологичен тиоэфирсодержащему участку  $C3$ . При расщеплении  $C4$  под действием  $C1s$  возникает два фрагмента:  $C4a$ , обладающий слабой анафилатоксической активностью, и более крупный (нестабильный, промежуточный)  $C4b^*$ . (Звездочка указывает на нестабильное состояние молекулы, в которой активирован участок связывания.) В течение нескольких миллисекунд  $C4b^*$  подвергается атаке расположенных в непосредственной близости нуклеофильных групп. Большинство молекул  $C4b^*$  гидролизуются с образованием инактивированного  $iC4b$ . Однако  $C4b^*$  может образовывать ковалентные связи с амино- или гидроксигруппами молекул клеточной мембраны, превращаясь в связанный на поверхности  $C4b$ .

Известны два изоформа  $C4$  —  $C4A$  и  $C4B$ . Их кодируют расположенные тандемно гены главного комплекса гистосовместимости. Активированный  $C4A$  взаимодействует преимущественно с аминогруппами, а  $C4B$  — с гидроксигруппами, образуя соответственно амидные и эфирные связи. Таким образом,  $C4A$  связывается в основном с белками, а  $C4B$  — с углеводами.

В результате присоединения  $C2$  к связанному на клеточной поверхности  $C4b$  образуется  $C3$ -конвертаза классического пути. Связанный на клеточной поверхности  $C4b$  становится, в свою очередь, участком связывания для профермента  $C2$ . Связанный  $C2$  служит субстратом для  $C1s$ , который расщепляет его с осво-



бождением C2b, при этом более крупный фрагмент, C2a, остается присоединенным к C4b, в результате чего образуется C4b2a — ферментный комплекс, называемый C3-конвертазой классического пути.

Образующийся под действием C3-конвертазы белок C3b может ковалентно связываться с молекулами клеточной поверхности. Полипептид C3 относится к белкам с необычными посттрансляционными изменениями структуры. Расположенные на близком расстоянии остатки цистеина и глутамин образуют за счет элиминации аммиака метастабильную внутреннюю тиоэфирную связь. Электрофильная (акцептирующая электроны) карбоксильная группа ( $-\text{C}^+=\text{O}$ ) этого тиоэфира чувствительна к атаке нуклеофильных групп (доноры электронов), в том числе амино- и гидроксигрупп приближающихся белковых и углеводных молекул. Таким образом, C3 способен ковалентно связываться с этими молекулами (рис. 23).

Протеолитическое отщепление C3a от N-конца  $\alpha$ -цепи C3 под действием C3-конвертазы приводит к конформационному изменению оставшейся части молекулы (т. е. C3b\*), делающему внутреннюю тиоэфирную связь весьма нестабильной. Она становится новым участком связывания внутри C3b\*, способным очень активно взаимодействовать с находящимися вблизи нуклеофильными группами. Как и в случае C4b\* большая часть молекул C3b\* подвергается гидролизу, однако некоторые молекулы связываются с белками и углеводами, находящимися в непосредственной

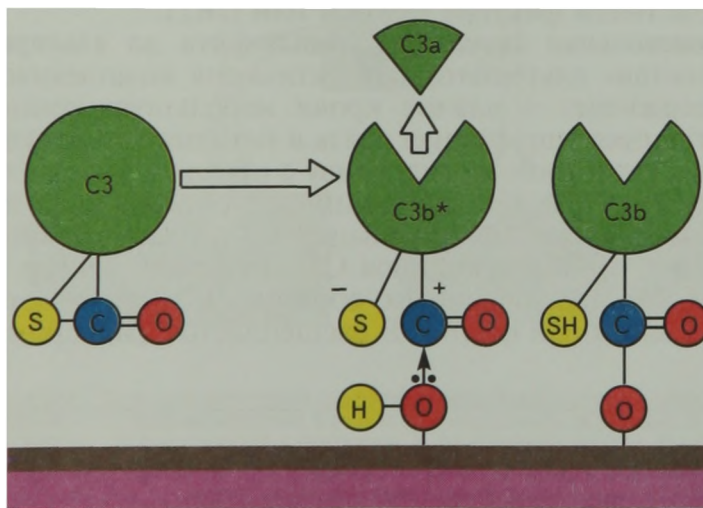


Рис. 23. Дестабилизация тиоэфирной связи в молекуле C3.

$\alpha$ -Цепь молекулы C3 содержит тиоэфирную связь, образованную остатками цистеина и глутамин. В результате расщепления C3 на C3a и C3b эта связь становится нестабильной и чувствительной к нуклеофильной атаке  $-\text{OH}$ - и  $-\text{NH}_2$ -групп (доноров электронов), что позволяет C3b ковалентно связываться с белками и углеводами

близости от места активации. Поскольку С3-конвертаза обычно образуется на чужеродной поверхности или на иммунных комплексах, С3b накапливается в основном там же. Затем связанный С3b становится фокусом дальнейшей активации комплемента по так называемой петле усиления альтернативного пути.

Активация комплемента по классическому пути тонко регулируется. Существует два механизма регуляции классического пути активации комплемента в жидкой фазе. Первый — это действие С1-ингибитора, т. е. ингибитора сериновых протеиназ (серпина), связывающего и инактивирующего С1r и С1s.

Второй механизм состоит в подавлении образования С3-конвертазы классического пути, С4b2a. В жидкой фазе так действуют фактор I и С4-связывающий белок (С4-bp), вместе расщепляющие С4b. Кроме того, С4-bp вызывает диссоциацию С4b2a на С2a и С4b.

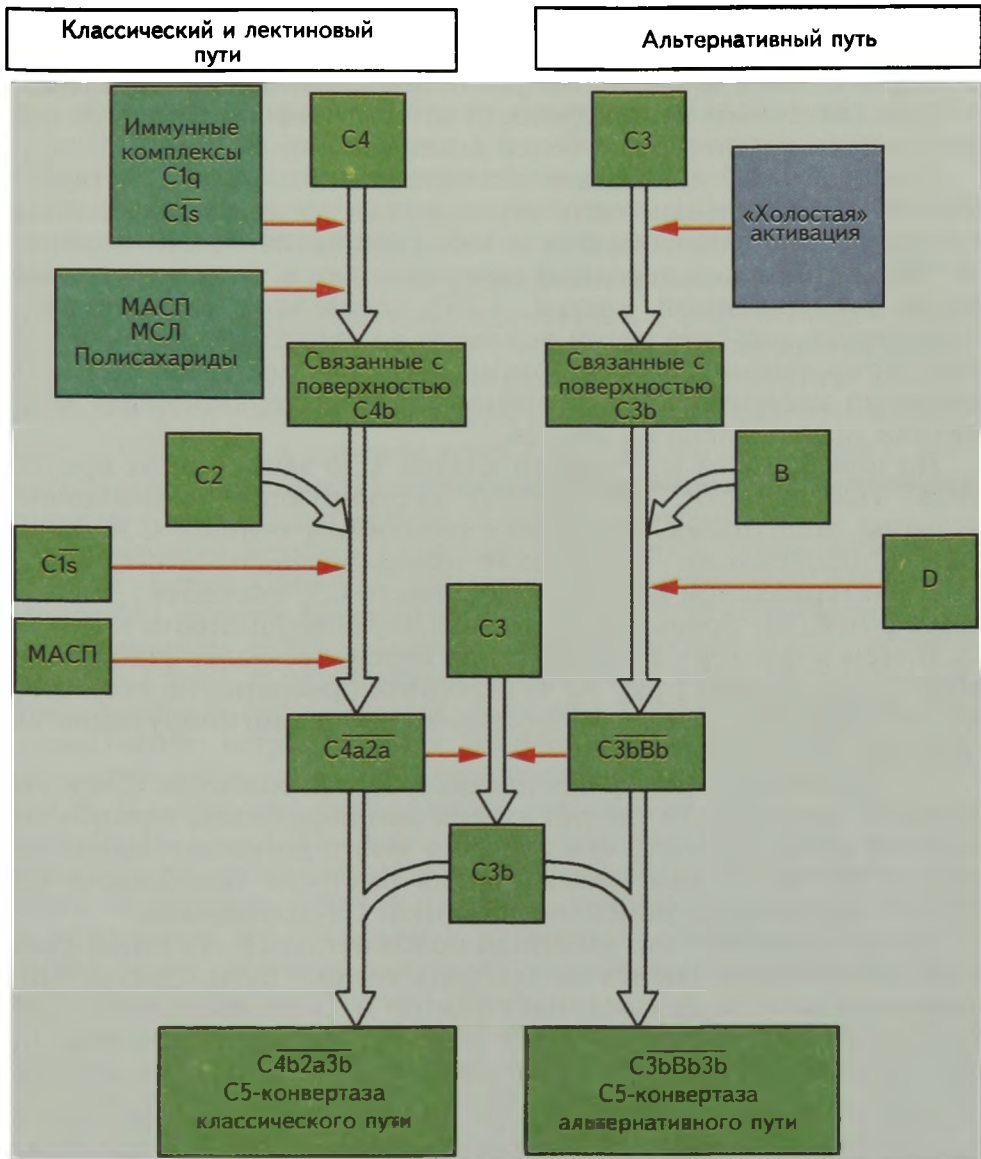
Активация по классическому пути регулируется также путем подавления взаимодействия комплемента с поверхностью клеток хозяина. Ингибирование осуществляют регуляторные белки комплемента: фактор, ускоряющий диссоциацию С3-конвертазы (ФУД, CD55), рецепторы комплемента типа 1 (CR1, CD35) и мембранный кофакторный белок (МКБ, CD46). Эти белки действуют следующим образом: подавляют связывание С2 с С4b (ФУД или CR1); вызывают и ускоряют диссоциацию С4b2a на С2a и С4b (ФУД и CR1); действуют как кофакторы, стимулируя катаболизм С4b под действием фактора I (МКБ или CR1).

**Самопроизвольная активация комплемента по альтернативному пути.** «Холостая» альтернативная активация комплемента постоянно поддерживает в плазме крови небольшую концентрацию С3b\* Внутренняя тиоэфирная связь в нативной молекуле С3 чувствительна к спонтанному гидролизу с превращением в активированную форму — С3i. (Эта постоянная, происходящая на низком уровне, самопроизвольная активация С3 в плазме крови называется «холостой».) Образующийся С3i связывает фактор В с образованием С3iВ. [Аналогичным образом, С2 связывается с С4b (рис. 24).] Связанный фактор В расщепляется фактором D с выс-

---

**Рис. 24.** Аналогичные этапы активации комплемента по классическому, лектиновому и альтернативному механизмам.

Как классический, так и альтернативный путь активации комплемента приводит к появлению С3-конвертазы: С4b2a и С3bBb соответственно. Классический путь начинается с активации С1s комплексом антиген—антитело и последующего расщепления активированным С1s компонентов С4 и С2. Фрагменты меньшего размера, С4a и С2b, высвобождаются, а более крупные образуют С4b2a. Компоненты С4 и С2 могут быть активированы также маннансвязывающей лектинассоциированной сериновой протеиназой (МАСП) — белком лектинового



пути, аналогичным C1s, и сывороточным маннансвязывающим лектином (МСЛ). На первых этапах альтернативного пути возникший в результате «холостой» активации и связавшийся с поверхностью белок C3b соединяется с фактором В, от которого фактор D отщепляет меньший фрагмент — Ва. Большой фрагмент В, т. е. Вb, остается связанным с C3b, образуя C3bBb — C3-конвертазу, которая расщепляет дополнительное количество молекул C3 (механизм положительной обратной связи). Поверхность, активирующая комплемент (например, микроорганизмов), стабилизирует C3b, обеспечивая его связывание с фактором В. Это способствует дальнейшей альтернативной активации комплемента. C3-конвертазы классического и альтернативного путей могут дополнительно присоединять C3b, образуя ферментные комплексы, называемые C5-конвертазами (C4b2a3b и C3bBb3b соответственно), которые активируют следующий компонент системы комплемента — C5

вободением Ва. Оставшийся комплекс  $\overline{C3iVb}$  представляет собой жидкофазную СЗ-конвертазу альтернативного пути, расщепляющую СЗ на СЗа и СЗб. Запуск петли усиления альтернативного пути связанным на поверхности аутологичных клеток СЗб предотвращают регуляторные белки комплемента.

Поскольку СЗ-конвертаза альтернативного пути действует в жидкой фазе, большая часть образовавшегося в результате ее активности СЗб\* гидролизуется и инактивируется водой. Однако в случае контакта с чужеродной поверхностью, в частности с мембраной бактериальной клетки, СЗб\* ковалентно связывается и инициирует действие петли усиления альтернативного пути. Общая схема взаимодействия компонентов комплемента при активации по классическому, лектиновому и альтернативному механизмам представлена на рис. 24.

На поверхности микробной клетки СЗб защищен от протеолиза. Поверхности, интенсивно активирующие комплемент, названы защитными, поскольку связанный с ними СЗб защищен от протеолиза. Чужеродная поверхность, подобная мембране бактериальной клетки, «защищает» СЗ, поскольку, связавшись с ней, он проявляет более высокую аффинность к фактору В, чем к фактору Н, и образует, вероятно, более стабильную конвертазу. Кроме того, на чужеродной поверхности отсутствуют регуляторные белки организма-хозяина, ингибирующие активацию комплемента.

За первоначальным прикреплением одной молекулы СЗб к «защитной» поверхности следует стадия амплификации, в результате которой в том же месте фиксируется много дополнительных молекул СЗб. Ключевым моментом для быстрого накопления СЗб служит образование мембраносвязанной СЗ-конвертазы.

*Петля усиления* — это механизм положительной обратной связи в активации комплемента по альтернативному пути. Связанный с поверхностью СЗб присоединяет фактор В. Образовавшийся СЗбВ становится субстратом для фактора D — сериновой эстеразы, отщепляющей от фактора В небольшой фрагмент, Ва. Остающийся на поверхности комплекс  $\overline{C3bVb}$  весьма быстро диссоциирует, если не будет стабилизирован в результате связывания пропердина (P) с образованием комплекса  $\overline{C3bVbP}$ , представляющего собой связанную с поверхностью СЗ-конвертазу альтернативного пути.

Комплекс  $\overline{C3bVbP}$  расщепляет много все новых молекул СЗ. Поскольку конвертаза локализована на «защитной» поверхности, образующиеся молекулы СЗб\* будут связываться именно там, а не в каком-либо ином месте.

Отметим, что петля усиления функционирует и в том случае, когда СЗб фиксируется на поверхности в результате классической (зависимой от антител) активации комплемента.



**Конечная фаза активации комплемента — образование лизирующего мембрану комплекса.** Каскад реакций активации комплемента завершается образованием литического комплекса (лизирующий, или атакующий, мембрану комплекс, ЛМК) в результате ферментативного расщепления C5 — белка, гомологичного C3 и C4, но не содержащего внутренней тиоэфирной связи.

Прежде чем подвергнуться расщеплению C5-конвертазой, C5 избирательно связывается с C3b в ее составе. C5-конвертаза классического пути — это трехмолекулярный комплекс, C4b2a3b, в котором C3b, ковалентно присоединенный к C4b, обладает более высокой константой связывания с C5, чем C3b, связанный с другими молекулами клеточной поверхности. C5-конвертаза альтернативного пути представляет собой также трехмолекулярный комплекс — C3bBb3b, в котором один C3b ковалентно связан с другим. При расщеплении C5 высвобождается небольшой пептидный фрагмент C5a — высокоактивный анафилатоксин

Лизирующий мембрану комплекс образуется путем неферментативной сборки C5b—9. Последующее формирование ЛМК происходит без участия ферментов. Компонент C5b связывается с C6 с образованием C5b6, который взаимодействует с C7, образуя комплекс C5b67. В результате связывания C7 гидрофильный C5b6 превращается в гидрофобный комплекс C5b67, способный преимущественно встраиваться в липидный бислой. К этому комплексу присоединяется C8 и затем последовательно до 14 мономеров C9. В результате формируется литический «зонд», или порообразующая молекула. Хотя после присоединения C8 к C5b67 комплекс уже проявляет незначительную литическую активность, полное ее развитие зависит от полимеризованного C9. (Отметим, что комплекс C5b6789 обычно обозначают аббревиатурой C5b-9; подобным же образом могут обозначаться и предшествующие продукты сборки, например C5b—8.)

Полимеризация гидрофобных молекул для образования пор в мембране — это обычный механизм клеточной цитотоксичности. Т-лимфоциты поражают клетки-мишени, погружая в их мембрану порообразующие молекулы, названные *перфоринами*. Перфорины структурно гомологичны C9; подобные же молекулы найдены в гранулах эозинофилов (катионные белки эозинофилов). Некоторые бактериальные токсины, например стрептолизин O, также представляют собой порообразующие молекулы.

### 2.5.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ КОМПЛЕМЕНТА

Биологические активности системы комплемента можно подразделить на полезные для организма-хозяина и вредные.

Основные полезные эффекты комплемента: содействие в уничтожении микроорганизмов; интенсивное удаление иммун-

ных комплексов; индукция и усиление гуморального иммунного ответа.

Система комплемента может вызывать повреждение клеток и тканей собственного организма в следующих случаях: если происходит ее генерализованная массивная активация, например при септицемии, вызванной грамотрицательными бактериями; если ее активация происходит в очаге тканевого некроза, в частности при инфаркте миокарда; если активация происходит при аутоиммунной реакции в тканях.

**Комплемент способствует уничтожению микроорганизмов.** Усиление ликвидации микробов достигается несколькими путями, включая: образование анафилатоксинов, которые повышают проницаемость стенок сосудов, облегчая тем самым поступление в очаг инфекции других защитных факторов воспалительной реакции; опсонизацию микробов для усиления фагоцитоза; внедрение лизирующего мембрану комплекса в мембрану микробных клеток.

Анафилатоксины — сильные индукторы воспаления. Активация системы комплемента приводит к образованию анафилатоксинов C3a и C5a, физиологическая роль которых состоит в привлечении клеток воспалительного экссудата в очаг воспаления, а также в активации их эффекторных механизмов.

Системное введение C5a или генерализованная внутрисосудистая активация комплемента (например, при сепсисе, вызванном грамотрицательными бактериями), может привести к сердечно-сосудистому коллапсу и бронхоспазму, т. е. к состоянию, напоминающему анафилаксию (отсюда название анафилатоксины).

Активность C5a многообразна. Он служит сильным активатором всех типов клеток миелоидного ряда. Этот анафилатоксин вызывает хемотаксис и хемотаксис нейтрофилов, их дегрануляцию, а также вспышку клеточного дыхания с образованием кислородных радикалов. Кроме того, C5a вызывает метаболизирование арахидоновой кислоты, входящей в состав мембран, с образованием простагландинов и эйкозаноидов. При этом возрастает также поверхностная экспрессия молекул межклеточной адгезии, что способствует прилипанию клеток к сосудистому эндотелию. У моноцитов и макрофагов C5a вызывает аналогичные реакции и, кроме того, секрецию ИЛ-1 и ИЛ-6, а у базофилов и тучных клеток — дегрануляцию с высвобождением гистамина и других вазоактивных медиаторов.

Активируя эти клетки, C5a опосредованно влияет на кровеносные сосуды, повышая их проницаемость, и на гладкую мускулатуру, вызывая ее сокращение. Кроме того, C5a может действовать синергично с другими медиаторами воспаления, например вместе с ИФ $\gamma$  или эндотоксином стимулировать секрецию ИЛ-1 моноцитами.

Присутствие C5a в кровотоке весьма кратковременно, как и следует ожидать для столь мощного медиатора воспаления. Содержащийся в крови фермент карбоксипептидаза N отщепляет от

C5a C-концевой остаток аргинина, в результате чего все виды биологической активности этого эффектора, за исключением хемотаксической, существенно ослабевают. Затем происходит связывание его рецептором для C5a, интернализация и быстрое внутриклеточное расщепление протеазами на неактивные фрагменты.

По сравнению с C5a субкомпонент комплемента C3a обладает гораздо меньшей активностью и связывается с иным клеточным рецептором. Он вызывает слабую агрегацию нейтрофилов и вспышку клеточного дыхания, но в отличие C5a не обладает хемотаксической активностью. Отметим, что образование анафилактиоксинов происходит в результате активации не только комплемента, но и других ферментных систем, которые непосредственно расщепляют C3, C4 и C5. К таким ферментам относятся плазмин, каликреин, тканевые и лейкоцитарные (лизосомные) протеазы (в частности, эластаза нейтрофилов), а также протеолитические ферменты микробного происхождения, например гингипаин-1 из бактерии *Porphyromonas gingivalis*, которая встречается при патологии периодонта.

Фиксированные C3b и C4b действуют как опсонины, усиливая фагоцитоз. Ковалентно связываясь с поверхностью бактерий и иммунными комплексами, C3b и C4b делают их лигандами для рецепторов комплемента на фагоцитарных клетках. Тем самым они обеспечивают очистку крови от бактерий и иммунных комплексов. Связывание C3b и C4b с рецепторами комплемента на поверхности нейтрофилов, моноцитов и макрофагов может вызывать, кроме стимуляции фагоцитоза, экзоцитоз гранул, содержащих протеолитические ферменты, и образование свободных кислородных радикалов в результате вспышки клеточного дыхания.

Недостаточность комплемента ассоциирована с подверженностью инфекционным заболеваниям. Физиологическая роль комплемента в опсонизации и бактериолизе становится совершенно ясной, если проанализировать две формы его наследственной недостаточности. Недостаточность компонентов классического пути и C3 и недостаточность семейства рецепторов CR3/CR4/LFA-1 ассоциированы с частым возникновением инфекций, вызываемых гноеродными бактериями. Тот факт, что дефицит опсопинов либо рецепторов приводит к одинаковым последствиям, убедительно свидетельствует о важной роли комплемента в уничтожении этих бактерий путем фагоцитоза и внутриклеточного разрушения.

Лизирующий мембрану комплекс принимает также участие в воспалительной реакции. Согласно традиционному представлению ЛМК уничтожает любую клетку, образуя поры в мембране и вызывая ее лизис. Однако не так давно было установлено, что содержащее ядро клетки, например клетки иммунной системы организма, относительно устойчивы к литическому действию ЛМК; отчасти это обусловлено присутствием на мембране регуля-

торных молекул типа CD59, но кроме того — и способностью этих клеток устранять путем эндоцитоза или экзоцитоза те участки своей плазматической мембраны, в которые проник ЛМК. Даже в случае сублетального воздействия ЛМК вызванное им изменение структуры мембранного бислоя может стимулировать клетки иммунной системы (в зависимости от их тканевого происхождения) к высвобождению и метаболизированию арахидоновой кислоты, усилению окислительного метаболизма, дегрануляции или секреции цитокинов. Эти реакции, возможно, важны для усиления воспаления в участках активации комплемента.

**Патогенные микроорганизмы противодействуют эффектам комплемента.** Взаимодействие между системой комплемента и микробами можно рассматривать как фактор продолжающейся эволюционной межвидовой борьбы. По мере развития системы комплемента, вероятно, под давлением отбора, связанного главным образом с инфекционными заболеваниями, у микробов, в свою очередь, появились механизмы выхода из-под удара комплемента и даже «использования» этой системы для развития инфекции. Фактически патогенные микробы патогенны именно благодаря своей способности обходить в известной мере механизмы защиты организма от инфекции.

Грамотрицательные бактерии экспонируют связывающие C3b и ЛМК структуры, на которых бактериолитическая активность комплемента лишена эффективности. Наружный слой клеточной стенки большинства грамотрицательных бактерий содержит липополисахарид (ЛПС) с длинными O-специфическими боковыми полисахаридными цепями, выступающими из мембраны наружу. Они эффективно активируют комплемент, но локализуют ковалентное связывание C3 и фиксацию ЛМК на таком удалении от цитоплазматической мембраны бактериальной клетки, при котором опсонизация и лизис невозможны. В подобных случаях в качестве фактора приобретенного иммунитета могут функционировать только бактерицидные антитела. Они активируют комплемент в непосредственной близости к тем участкам бактериальной поверхности, где его опсонизирующий и литический эффекты могут реализоваться.

Некоторые бактерии имеют наружный покров, устойчивый к опсонизации. Ряд микроорганизмов устойчив к действию комплемента благодаря присутствию на их поверхности молекул, препятствующих альтернативной активации комплемента и усилению фиксации C3. Например, штаммы патогенных грамположительных бактерий отличаются от своих непатогенных аналогов наличием богатой сиаловыми кислотами капсулы, на которой C3b связывает фактор H, а не фактор B, в результате чего подвергается расщеплению.

Микробы могут экспрессировать молекулы, подавляющие активацию комплемента. Другая стратегия обхода микробами действия комплемента — это экспрессия ингибиторов, подобных тем,



которыми обладает организм-хозяин. Известны присутствующие на поверхности бактериальных клеток молекулы с Fc-рецепторными свойствами, например стафилококковый белок А и Fc-рецептор, имеющийся у многих герпесвирусов. Недавно обнаружена также экспрессия рецептора (гликопротеид С) для компонента вирусом простого герпеса. Грибы *Candida albicans* экспрессируют молекулы, подобные CR2 и CR3 и имеющие даже антигенное сходство с CR3 человека. Все эти молекулы способны защитить микроорганизмы от обычных последствий связывания антител и компонента. Так, IgG или C3, связавшись с рецепторами на поверхности микробов, могут утратить способность к взаимодействию с Fc-рецепторами на фагоцитарных клетках. Еще один стратегический путь заключается в экспрессии регуляторных молекул, подавляющих активацию компонента. Так, например, трипаносомы образуют ФУД- и СД59-подобные молекулы, тогда как шистосомы просто адсорбируют ФУД организма-хозяина, достигая той же цели.

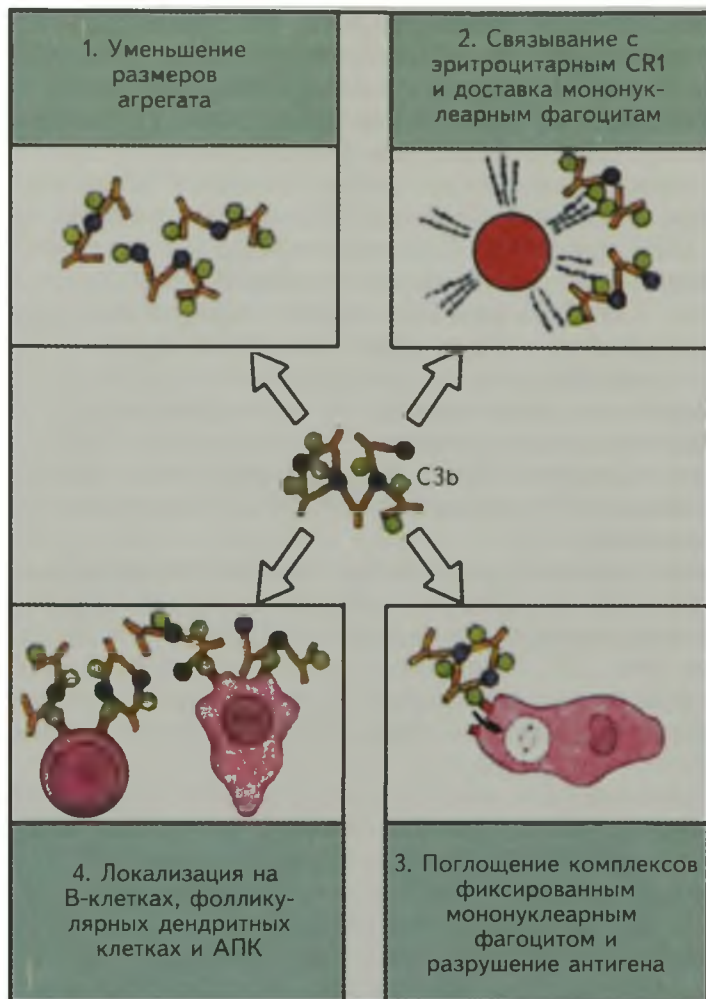
**Комплементу принадлежит важная вспомогательная роль в индукции иммунного ответа.** Система компонента облегчает контакт и взаимодействие антигенпрезентирующих клеток и В-лимфоцитов с антигеном (рис. 25). Например, от компонента зависит необходимая для формирования В-клеток памяти локализация иммунных комплексов в центрах размножения внутри лимфатических узлов.

На В-клетках и АПК выявлены следующие рецепторы компонента: В-клетки: CR1, связывающий C3b и iC3b, а также CR2, связывающий iC3b и C3dg; моноциты и макрофаги: CR1 и CR3; фолликулярные дендритные клетки (единственный тип клеток, обладающий всеми тремя рецепторами): CR1, CR2 и CR3.

Организмы с наследственным дефицитом C3 страдают лишь умеренным нарушением продукции антител. Однако у морских свинок, дефицитных по C2, C3 или C4, наблюдается заметное угнетение первичного и вторичного иммунных ответов на малые дозы Т-зависимых антигенов. Эти факты свидетельствуют о вспомогательной (но не решающей) роли компонента в эффективной индукции образования антител.

Комплемент участвует в процессинге иммунных комплексов. В 1940-х гг. в эксперименте было установлено, что комплемент препятствует формированию решетчатой структуры преципитирующих комплексов антиген—антитело. На структуру и размеры иммунных комплексов влияют многие факторы, включая следующие: концентрация реагентов (антител и антигена); аффинность антител к гомологичному антигену; валентность как антител, так и антигена (чем выше валентность, тем крупнее образующиеся комплексы).

Активация компонента по классическому пути подавляет образование преципитатов иммунных комплексов в плазме крови.



**Рис. 25. Роль С3 в процессинге иммунных комплексов.**

Компонент С3 связывается с иммунными комплексами и благодаря этому 1) обуславливает уменьшение размеров иммунных агрегатов решетчатой структуры, 2) опосредует связывание циркулирующих иммунных комплексов с CR1 на эритроцитах, которые транспортируют эти комплексы в кровотоке, 3) способствует поглощению иммунных комплексов фиксированными мононуклеарными фагоцитами и тем самым разрушению антигена и 4) способствует локализации антигена в виде иммунных комплексов на В-лимфоцитах и антигенпрезентирующих клетках, в том числе на специализированных фолликулярных (дендритных) клетках лимфатических узлов

Подобным же образом активация по альтернативному пути может вызвать растворение иммунных комплексов, уже образовавших преципитаты в плазме, а также в тканях. Растворение происходит в результате ковалентного включения С3 в решетчатую структуру иммунного преципитата: С3 разрушает связь антител с эпитопами антигена, ограничивая тем самым возможность образования крупных агрегатов.

Активация комплемента иммунными комплексами в норме физиологически полезна, так как связанные с С3 комплексы эффективно удаляются из тканей и кровотока моноцитами и прочими фагоцитарными клетками (см. рис. 25). Однако в некоторых случаях интенсивное образование иммунных комплексов продолжается хронически, и тогда активация ими комплемента имеет вредные последствия; в частности, это происходит при подостром бактериальном эндокардите и системной красной волчанке.

Комплемент способствует развитию некоторых заболеваний. Системная активация комплемента приводит к образованию больших количеств анафилатоксинов. В определенных условиях активация комплемента *in vivo* играет вредную, а не полезную роль. Например, шок при бактериемии, вызванной грамотрицательными бактериями, отчасти обусловлен системной активацией комплемента эндотоксином. Возникающие при этом в больших количествах С3а и С5а вызывают активацию и дегрануляцию нейтрофилов, базофилов и тучных клеток. Внутрисосудистая агрегация нейтрофилов приводит к диссеминированному свертыванию крови и задержке образовавшихся микроэмболов в капиллярах легких, где продукты лейкоцитарного происхождения (включая эластазу и свободные радикалы) могут вызвать синдром «шокового легкого». Он характеризуется интерстициальным отеком легкого вследствие повреждения мелких сосудов, образованием нейтрофильного экссудата в альвеолах и артериальной гипоксемией.

Искусственное кровообращение через аппараты сердце—легкие или купрофановые диализаторы может стать причиной экстракорпоральной активации комплемента, которая сопровождается временной лейкопенией, примерно такой же, как при агрегации нейтрофилов в легких.

Тканевой некроз активирует комплемент. Повреждение ткани вследствие ишемического некроза способно вызвать локальную активацию комплемента и интенсивную фиксацию ЛМК на клеточной мембране. О возможной патофизиологической роли активации комплемента в этом случае свидетельствуют данные экспериментального моделирования инфаркта миокарда, при котором снижение концентрации комплемента уменьшает масштабы повреждения ткани. Подобный же эффект, как установлено недавно, вызывает введение растворимого рекомбинантного CR1.

Активация комплемента вследствие образования иммунных комплексов *in vivo* — возможная причина повреждения тканей. Активация комплемента имеет существенное значение в патогенезе тканевой деструкции при заболеваниях, обусловленных образованием иммунных комплексов. Формирование таких комплексов возможно в тканях, например в почечных клубочках при нефропатии, вызванной образованием аутоантител к гломерулярной базальной мембране, или на концевых пластинках двигательных нейронов при злокачественной миастении с образованием

аутоантител к холинорецепторам. В других случаях циркулирующие иммунные комплексы могут отлагаться в стенках кровеносных сосудов. Например, при бактериальном эндокардите инфицированный сердечный клапан представляет собой источник образования иммунных комплексов, которые оседают в почках или других участках микрососудистого русла.

При болезнях иммунных комплексов комплемент провоцирует воспаление главным образом двумя следующими путями: с C3b и C4b, фиксированными на иммунных комплексах, связываются лейкоциты, активируемые и привлекаемые в места отложения этих комплексов образовавшимися здесь анафилатоксинами; так начинается повреждение тканей, и для подавления воспалительной реакции на экспериментальных моделях этого заболевания достаточно уменьшить содержание в крови комплемента или нейтрофилов; ЛМК (лизирующий мембрану комплекс) повреждает клеточную мембрану и стимулирует при этом образование простагландинов из арахидоновой кислоты. Этим обусловлено повреждение тканей при мембранозном нефрите, который в эксперименте удается вызвать антителами к субэпителиальным антигенам. Воспалительную реакцию в этом случае не подавляет устранение нейтрофилов, однако она почти полностью отсутствует у животных, дефицитных по C5. Базальная мембрана, вероятно, служит физическим барьером на пути миграции нейтрофилов, поэтому наблюдаемая высокая протеинурия обусловлена только фиксацией лизирующей мембрану комплекса.

**Контрольные вопросы и задания.** 1. Перечислите и дайте характеристику факторам неспецифического иммунитета. 2. Назовите центральные и периферические органы иммунной системы. 3. В чем состоят основные функции лимфоцитов в иммунной системе? 4. Перечислите клетки, осуществляющие иммунный ответ. 5. Назовите функции Т-, В- и НК-клеток. 6. В чем состоят иммунные функции антигенпрезентирующих клеток (АПК), тромбоцитов, тучных и эндотелиальных клеток? 7. Назовите функции цитотоксических клеток. 8. Какие клетки осуществляют фагоцитоз? 9. Назовите места локализации и функции АПК. 10. Какие иммунные функции выполняют антитела? 11. Назовите пять классов антител и их основные функции. 12. Опишите структуру антител и их основную структурную единицу. 13. С рецепторами каких клеток взаимодействуют иммуноглобулины? 14. Дайте определение комплементу. 15. Назовите два главных пути активации комплемента. 16. Перечислите пять групп эффекторных механизмов комплемента. 17. Как защищаются микробы от действия системы комплемента? 18. Каков химический состав комплемента?



---

## Глава 3

# ИММУННЫЙ ОТВЕТ ОРГАНИЗМА



### 3.1. МЕХАНИЗМЫ ИММУННОГО ОТВЕТА

Современные теории иммуногенеза можно подразделить на инструктивные и селективные. Инструктивные теории предусматривают образование комплементарных антигенным структурам антител путем видоизменения синтезируемых в рибосомах полипептидов в результате непосредственного контакта с ними антигена (теория прямой матрицы Гауровитца—Полинга) или путем стойкого изменения генотипа клеток-предшественниц антителопродуцентов (теория непрямо́й матрицы Бернета—Феннера). Селективные теории предусматривают отбор комплементарных антигену молекул нормальных антител с последующей передачей иммунного комплекса через фагоциты продуцентам антител (теория естественной селекции Эрне) или иммунокомпетентных клеток, обладающих соответствующими рецепторами, которые пролиферируют в клоны плазматических клеток, образующих гомологичные антитела (клонально-селекционная теория Бернета).

По современным представлениям, иммунный ответ основан на функционировании Т- и В-лимфоцитов, которые кооперативно взаимодействуют между собой и с макрофагами, или клетками А (от англ. *adherent* — свойство прилипать к стеклу). Развитие иммунных реакций начинается с распознавания антигена. Наиболее сложен механизм распознавания белкового тимусзависимого антигена. Т-хелперы и эффекторы гиперчувствительности замедленного типа реагируют на комплекс носителя антигена (а не гаптена) с белком Ia, образование которого кодируется генами иммунного ответа. Т-киллеры лизируют измененные клетки организма, на поверхности которых антигены образуют комплекс с белками, кодируемыми генами гистосовместимости. При этом генотип взаимодействующих клеток-мишеней, Т-, В- и А-клеток должен быть идентичным. В таком случае Т-лимфоциты при помощи рецепторов для Fc-фрагментов иммуноглобулинов воспринимают модифицированный антиген макрофагов, дополнительно усиливают его Ia-белком и передают В-лимфоцитам. Последние, получив дополнительный митогенный сигнал от иммунного комплекса, присоединенного при помощи рецептора для СЗ, начинают пролиферировать и трансформироваться в клоны плазматических клеток. Процессы бласттрансформации начинаются в результате

активации аденилциклазы и образования циклического аденил-монофосфата (цАМФ).

Полисахариды и агрегированные белковые антигены с регулярной жесткой структурой (например, полимеризованный флагеллин) вызывают трансформацию В-лимфоцитов в плазмоциты без вспомогательной функции Т-лимфоцитов. На полимерный белковый антиген без участия Т-хелперов образуются только IgM.

Иммуноглобулины синтезируются под действием мРНК в виде отдельных цепей полипептидов в полирибосомах, связанных с мембранами цитоплазматического ретикулула плазмоцитов. Экскреция иммуноглобулинов плазматическими клетками осуществляется отдельными цепями полипептидов или целыми молекулами. Основная сборка иммуноглобулинов происходит в цистернах цитоплазматического ретикулула. При этом L-цепи из легких рибосом подходят к H-цепям из тяжелых рибосом и объединяются с ними в молекулу иммуноглобулина. Каждая плазматическая клетка секретирует от 50 до 700 молекул иммуноглобулина в секунду.

Синтез мембранных и секретируемых иммуноглобулинов, как и образование вариабельного и константного участков каждого полипептида, кодируется разными генами. Поскольку образование иммуноглобулинов подчинено общим закономерностям биосинтеза белков, на индукции антителиобразования сказывается положительно действие соматотропного гормона и отрицательно — адренкортикостероидов.

На антигенное раздражение организм может отвечать антителиобразованием, гиперчувствительностью немедленного типа, гиперчувствительностью замедленного типа, иммунологической памятью и иммунологической толерантностью. Все эти реакции развиваются в организме на один и тот же антиген, носят специфический характер и являются самостоятельной формой иммунного ответа. Основу различий каждой формы иммунного ответа организма составляют разные эффекторы, механизмы и результаты реакций. Важно поэтому представлять сущность каждой формы иммунного ответа и методы их регистрации.

Итак, любой иммунный ответ имеет две основные фазы:

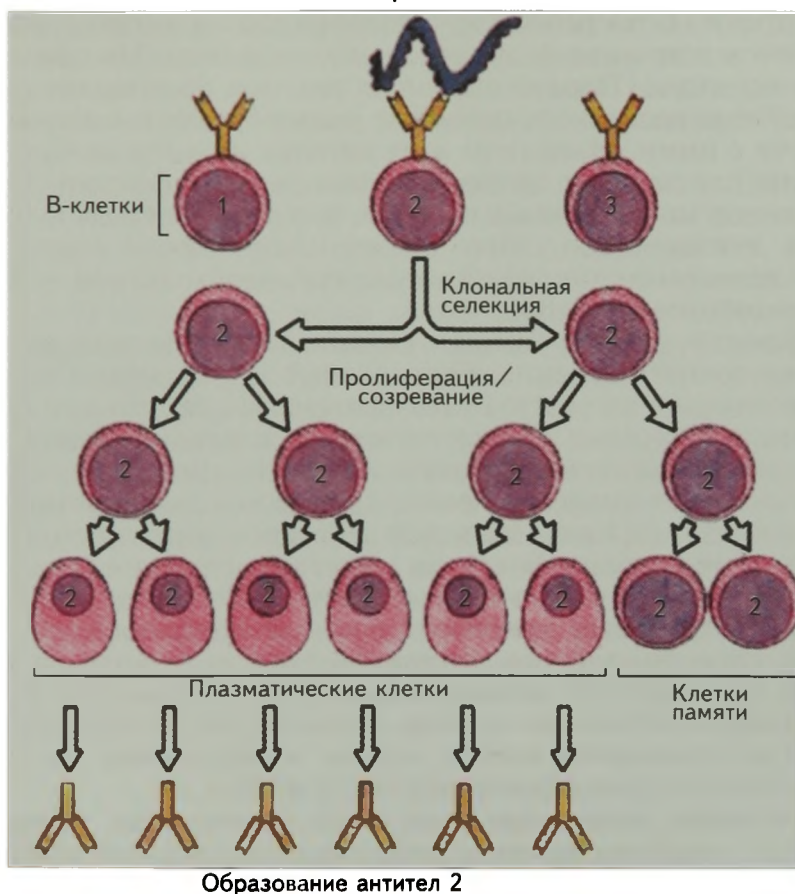
распознавание антигена;

реакции, направленные на устранение антигена.

**Клональная селекция.** Это пролиферация клеток, связавших специфический антиген. В реакциях приобретенного иммунитета распознавание антигена осуществляют лимфоциты, избирательно пролиферирующие благодаря клональной селекции.

Каждый лимфоцит (как В-, так и Т-популяции) генетически запрограммирован распознавать в основном только один антиген, но иммунная система в целом может специфически распознать многие тысячи разных антигенов. Поэтому лимфоциты, способные распознать тот или иной антиген, должны составлять лишь очень малую часть общей популяции. Как же в таком случае орга-

## Селекция антигеном



**Рис. 26. Клональная селекция В-лимфоцитов.**

Каждая антителообразующая клетка (В-клетка) запрограммирована синтезировать антитела только одной специфичности. Они расположены на ее поверхности в виде антигенсвязывающих рецепторов. Антиген связывается только с теми В-клетками, которые несут соответствующий поверхностный рецептор — в нашем примере В-клетка 2. Это взаимодействие стимулирует пролиферацию таких клеток и их созревание в клетки, образующие антитела, а также в долгоживущие клетки иммунологической памяти, все с той же исходной специфичностью связывания антигена

низм адекватно отвечает на инфекцию? Объяснение состоит в том, что антиген, связавшись с теми немногими клетками, которые способны его распознать, вызывает их быструю пролиферацию. В течение нескольких дней появляется достаточно клеток для адекватного иммунного ответа. Иными словами, сам антиген выбирает и способствует образованию специфических клонов клеток, связывающих этот антиген, — процессу, названному клональной селекцией и свойственному как В-, так и Т-клеткам (рис. 26).

Кажется непостижимым, каким образом иммунная система может «предугадать» репертуар специфичностей антител, которые потребуются в течение будущей жизни индивида. На самом деле все обстоит иначе. Просто иммунная система производит антитела, способные распознать огромное разнообразие антигенов, еще до встречи с ними. Многие из этих антител никогда не будут востребованы для защиты данного индивида от инфекции. Однако бесчисленное множество патогенных микроорганизмов и их способность к изменению своего антигенного состава в результате мутаций делает наличие всех этих антител необходимым — на случай, если они понадобятся.

Лимфоциты, активированные связыванием антигена, вступают в цикл клеточного деления. Они экспрессируют новые рецепторы, позволяющие им реагировать на выделяемые другими клетками цитокины, которые служат сигналами к пролиферации. Лимфоциты могут также сами начать выделять цитокины. Обычно они проходят ряд циклов деления, прежде чем дифференцируются в зрелые клетки, опять-таки под действием цитокинов. Например, пролиферирующие В-клетки в итоге созревают в продуцирующие антитела плазматические клетки. Даже после устранения инфекции сохраняется некоторая часть новообразованных лимфоцитов, способных вновь активироваться, если антиген встретится им повторно. Их называют *клетками памяти*, так как они хранят иммунологическую память относительно отдельных антигенов. Существованием клеток памяти и обусловлен долгосрочный иммунитет к тому или иному возбудителю.

**Эффекторные механизмы иммунного ответа.** Для устранения патогенных микроорганизмов существуют различные эффекторные механизмы иммунного ответа. Иммунная система располагает множеством механизмов для разрушения патогенных микробов, и каждый из них соответствует данному типу инфекции и конкретной стадии жизненного цикла возбудителя. Эти механизмы защиты часто называют *эффекторными системами*.

**Нейтрализация.** При действии одной из самых простых эффекторных систем антителам достаточно только связаться с определенным возбудителем, чтобы оказать ему противодействие. Например, антитела к наружным белкам капсида некоторых риновирусов могут воспрепятствовать связыванию вирусных частиц с клетками организма и их инфицированию.

**Фагоцитоз.** Гораздо чаще антитела реализуют свой эффект, активируя комплемент или действуя в качестве опсоинов, усиливающих поглощение микробов фагоцитами. Связавшись с опсонизированным микробом, фагоцитарная клетка поглощает его, окружая выступающими псевдоподиями. Псевдоподии сливаются, и микроб оказывается заключенным (эндоцитированным, интернализированным) в фагосому. Перерабатывают фагоциты поглощенный материал по-разному. Макрофаги, например, восстанавливают молекулярный кисло-



род с образованием бактерицидных реакционноспособных метаболитов кислорода, которые секретируются в фагосому. Нейтрофилы содержат лактоферрин, который хелатирует железо, лишая некоторые бактерии этого необходимого элемента питания. Наконец, с фагосомой слипаются гранулы и лизосомы, наполняя возникшую фаголизосому ферментами, разрушающими ее содержимое.

Цитотоксические реакции и апоптоз. Цитотоксические реакции — это эффекторные иммунные механизмы, направленные против целых клеток, обычно против тех, которые слишком крупны для фагоцитоза. Такая клетка-мишень распознается либо специфическими антителами, взаимодействующими с компонентами ее поверхности, либо Т-клетками посредством антигенспецифических ТкР. В отличие от фагоцитоза, при котором содержимое лизосом изливается в фагосому, в цитотоксической реакции атакующая клетка направляет содержимое своих гранул наружу, к клетке-мишени. Гранулы цитотоксических Т-клеток содержат соединения, называемые перфоринами, которые способны создавать каналы в наружной мембране клеток-мишеней. (Подобно этому, антитела, связавшись с поверхностью клетки-мишени, могут привлечь комплемент для перфорирования ее цитоплазматической мембраны.) Некоторые цитотоксические клетки способны также своим сигналом включать программу саморазрушения клетки-мишени — процесс *апоптоза*.

### **3.2. ИСТОЧНИКИ РАЗНООБРАЗИЯ АНТИГЕНРАСПОЗНАЮЩИХ СТРУКТУР. ТЕОРИИ ОБРАЗОВАНИЯ АНТИТЕЛ**

- Благодаря огромному разнообразию антител, синтезируемых В-лимфоцитами, и антигенраспознающих рецепторов, экспрессируемых Т-лимфоцитами, иммунная система способна распознавать множество различных антигенов и отвечать на них.
- Молекула иммуноглобулина состоит из тяжелых и легких цепей; легкие цепи могут относиться к  $\kappa$ - или  $\lambda$ -типу. Общее число возможных вариантов антигенсвязывающих центров рассчитывается как произведение чисел различных тяжелых и легких цепей.
- Легкие цепи иммуноглобулинов кодируются генными сегментами V и J; в кодировании тяжелых цепей также участвуют сегменты V и J, но дополнительное разнообразие вносят сегменты D.
- Рекомбинации ограниченного числа генных сегментов V, D и J создают бесконечное число переменных доменов разной специфичности.
- После антигенной стимуляции в генах легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов происходят точечные соматические мутации. Гены Т-клеточных рецепторов при этом не подвергаются изменениям.



- В кодировании ТкР участвуют четыре группы генов: гены  $\alpha$  экспрессирует большинство периферических Т-клеток, а гены  $\gamma$  и  $\delta$  — одна из субпопуляций Т-клеток тимуса и небольшая часть периферических Т-клеток.

- Разнообразию ТкР, подобно разнообразию антител, создается в результате рекомбинаций между генными сегментами V, D и J, происходящих в каждом из локусов  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - или  $\delta$ -цепей с небольшими различиями в механизмах.

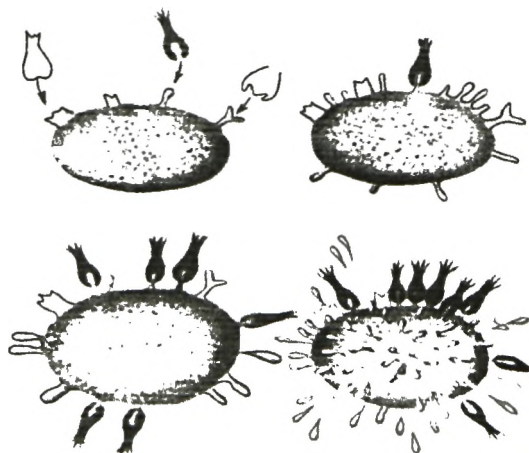
- Рекомбинацию генных сегментов V, D и J, кодирующих иммуноглобулины и Т-клеточные рецепторы, регулируют (по крайней мере отчасти) два активирующих ее гена (RAG-1 и RAG-2).

- Кроме простых перестановок генных сегментов V, D и J в создании разнообразия иммуноглобулинов и ТкР имеют значение вставки добавочных нуклеотидов («N-региональная» вариабельность), изменение позиций стыковки генных сегментов и рамок считывания сегментов D.

- Переключение изотипа иммуноглобулинов обусловлено рекомбинацией VDJ-генов с различными С-генами и дифференциальным сплайсингом РНК.

Способность иммунной системы распознавать антигены целиком зависит от антител, синтезируемых В-лимфоцитами, и антигенсвязывающих рецепторов, экспрессируемых Т-лимфоцитами. Обе эти клеточные популяции способны распознать множество разнообразных антигенов, но разными путями. Хотя антитела отличаются от Т-клеточных рецепторов (ТкР), разнообразие антигенной специфичности тех и других формируется посредством весьма сходных механизмов.

Благодаря своему поразительному разнообразию по специфичности центров связывания антигена антитела обеспечивают распознавание миллионов различных антигенов, встречающихся в



**Рис. 27. Предложенная Эрлихом теория боковых цепей.**

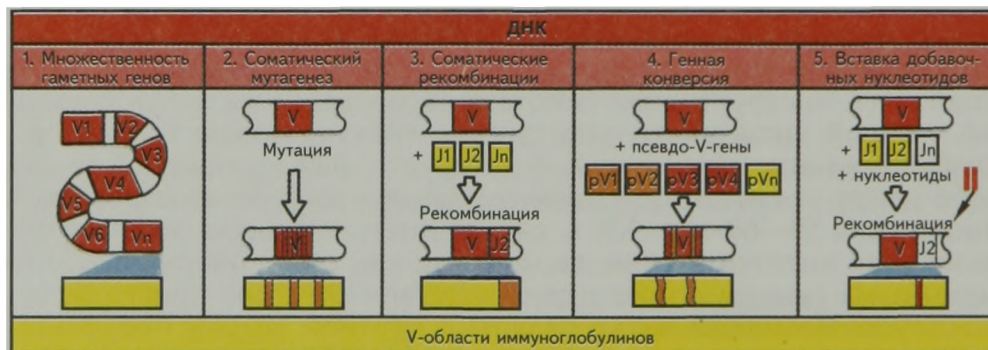
Эрлих предположил, что соединение антигена с уже имеющимся рецептором на поверхности В-клетки (теперь известно, что это мембраносвязанный иммуноглобулин) заставляет ее синтезировать и секретировать повышенное количество таких рецепторов. Хотя, как показано на рисунке, Эрлих считал, что одна клетка способна производить антитела, связывающие более чем один тип антигена, тем не менее он предвосхитил и клонально-селекционную теорию иммунитета, и фундаментальное представление о существовании рецепторов к антигену еще до контакта с ним иммунной системы

окружающей среде. Кроме того, у антител каждого класса имеется характерная эффекторная область молекулы: например, IgE может связываться с Fc-рецепторами тучных клеток, тогда как IgG способен присоединяться к фагоцитам. Подсчитано, что структурных вариантов антител в организме образуется гораздо больше, чем всех прочих белков вместе взятых. Число синтезируемых организмом вариантов антител фактически превышает количество генов в нашем геноме. Как может возникать разнообразие такого масштаба? Первоначальные представления о процессах образования антител с годами существенно изменились, но все же вызывает удивление, как удалось П. Эрлиху в начале столетия своей гипотезой боковых цепей вплотную приблизиться к современным взглядам (рис. 27)? Его идея о селекции антигеном клеток, образующих антитела, почти совпадает с современной клонально-селекционной теорией, исключая размещение нескольких рецепторов разной специфичности на одной и той же клетке.

В послеэрлиховский период представления об образовании антител утратили первоначальную простоту. Необходимость их пересмотра возникла в связи с тем, что химики научились синтезировать новые, отсутствующие в природе органические соединения и, как показал К. Ландштейнер, иммунная система оказалась способной отвечать образованием специфических антител на каждое из них. Сама возможность появления в результате естественного отбора в клетках иммунной системы тех генов, которые необходимы для образования антител ко всем этим новым, синтетическим веществам, казалась невероятной. В итоге появилась инструктивная гипотеза образования антител, согласно которой антиген, воздействуя на гибкую молекулу иммуноглобулина («инструктируя»), формирует в ней комплементарный себе центр связывания. Стремительный прогресс молекулярной биологии в 50—60-х гг. XX в. сделал инструктивную гипотезу образования антител неприемлемой, так как стало очевидным, что механизма «инструктирующего» действия антигена просто не существует. На новом витке развития научной мысли предпочтительные вновь завоевали селекционные идеи. Почти одновременно Н. Эрне и Ф. Бернетом была выдвинута клонально-селекционная теория, утверждавшая, что каждый лимфоцит образует иммуноглобулины только одной специфичности и что антиген выбирает и стимулирует клетки, несущие специфичные именно к нему антитела.

Однако еще оставался без ответа вопрос об источниках разнообразия антител. Теоретическое допущение существования своего особого гена для антител каждой из множества специфичностей немедленно породило другую проблему. Половина аминокислотной последовательности любой легкой и четверть любой тяжелой цепи иммуноглобулинов всегда переменна, а осталь-

ная часть константна. Каким образом в случае предполагаемого множества генов антител возможно сохранение неизменной последовательности в константных областях иммуноглобулиновых цепей? На этот вопрос ответили Драйер и Ф. Беннетт, предположив, что переменные и константные области кодируются отдельными генами, причем существует множество генов для переменных (V) и один или весьма ограниченное число генов для константных (C) областей. Теперь оставалось только объяснить источник многообразия переменных областей! Основой для этого стала идея соматического мутагенеза, согласно которой из относительно небольшого числа гаметных генов (гены зародышевой линии) в течение жизни индивида возникает множество модифицированных, т. е. подвергшихся мутациям генов. Кроме того, было высказано предположение, что полный V-ген может появляться в результате рекомбинации ряда генных сегментов. При разрезании и соединении фрагментов ДНК между ними могут встраиваться добавочные нуклеотиды, создавая дополнительную переменность, названную N-региональной, поскольку новая нуклеотидная последовательность отличается от гаметной. Вместо мутаций источником разнообразия переменных областей могла бы служить, как предполагалось, генная конверсия с участием набора псевдогенов. В итоге было определено пять возможных источников разнообразия антигенраспознающих струк-



**Рис. 28. Источники разнообразия антител.**

Пять возможных источников структурного разнообразия V-областей H- и L-цепей иммуноглобулинов. 1. Многочисленность гаметных генов. Имеется большое число отдельных неперестроенных генов (V1...Vn), каждый из которых кодирует V-домен отдельной специфичности. 2. Соматический мутагенез. В онтогенезе В-клеток в результате мутаций гаметного V-гена в разных В-клеточных клонах возникают различные V-гены. 3. Соматическая рекомбинация. В онтогенезе В-клеток происходит рекомбинация ряда генных сегментов (J1...Jn), соединяющихся с основной частью V-гена. В результате синтезируется белок, отдельные элементы которого кодируются разными генными сегментами. 4. Генная конверсия. Отрезки ДНК, принадлежащие ряду псевдо-V-генов, могут копироваться в функциональном V-гене, меняя его исходную нуклеотидную последовательность. 5. Вставка добавочных нуклеотидов. При рекомбинации перед соединением вырезанных V- и J-сегментов ДНК возможно встраивание между ними добавочных нуклеотидов, кодирующих дополнительные аминокислотные остатки V-областей. Все эти пять механизмов служат источниками разнообразия антител у млекопитающих

тур: множественность гаметных генов V-областей; соматический мутагенез; соматические рекомбинации между сегментами, образующими полный V-ген; генные конверсии; вставки добавочных нуклеотидов.

Сегодня известно, что у млекопитающих для создания разнообразия антител могут действовать все эти пять механизмов (рис. 28). Примечательно, что акулы располагают значительным числом кодирующих антитела генов и «не испытывают необходимости» в соматических рекомбинациях, тогда как у курицы число гаметных генов антител ограничено, и для этого вида характерен высокий уровень генной конверсии.

### 3.3. РАСПОЗНАВАНИЕ АНТИГЕНА

- Антитела высокоспецифичны по отношению к трехмерной конформации эпитопов антигена, вызвавшего их образование.

- Аффинность (сродство) антитела — мера прочности связи антигенсвязывающего центра молекулы антитела с отдельным эпитопом антигена. Функциональная аффинность, или авидность, взаимодействия антител с антигеном определяется также числом антигенсвязывающих центров в молекуле антитела и их способностью связываться с многочисленными эпитопами данного антигена.

- Т-клетки распознают связанные (презентируемые) другими клетками антигены в ассоциации с молекулами МНС класса I или класса II. Пептидные фрагменты процессированных антигенов связываются в специальной полости молекул МНС.

- Молекулы МНС класса I и класса II презентируют пептиды соответственно эндогенных и экзогенных антигенов. В зависимости от своего происхождения процессированные антигены встречаются и связываются с молекулами МНС в различных внутриклеточных органеллах.

- Антигенные пептиды, связываемые молекулами МНС класса I, образуются в цитоплазме в результате расщепления антигенов органеллами, названными протеасомами. Движение этих пептидов по эндоплазматическому ретикулуму обеспечивают транспортные белки из суперсемейства ABC. Комплекс из трех компонентов — тяжелая цепь класса I —  $\beta_2$ -микроглобулин — пептид — перемещается на клеточную поверхность.

- Антигенные пептиды, связываемые молекулами МНС класса II, образуются из поглощенных путем эндоцитоза экзогенных антигенов, в результате их процессинга в эндосомах или лизосомах. Молекулы МНС класса II в составе комплекса с инвариантной (Ii) полипептидной цепью транспортируются через комплекс Гольджи в эндосомы, где утрачивают Ii-цепь в результате диссоциации и присоединяют антигенные пептиды.

- Комплексы антигенных пептидов с молекулами МНС, экспонированные на клеточной поверхности, могут распознаваться специфическими рецепторами Т-лимфоцитов. Однако для последующей активации Т-лимфоцитов требуется ряд дополнительных взаимодействий с участием вспомогательных молекул.

Антитела и антигенраспознающие рецепторы Т-клеток обладают рядом общих свойств. В составе тех и других имеются константные (С) и переменные (V) домены; кроме того, сходным образом происходит рекомбинация генных V-, D- и J-сегментов, кодирующих V-домены этих молекул. Тем не менее механизмы распознавания антигена В- и Т-клетками различны. Антитела способны распознавать антигены и в растворе, и на поверхности клеток, но всегда в нативной конформации. Для распознавания же антигена рецепторами Т-клеток обязательно требуется его ассоциация с молекулами МНС на клеточной поверхности. Часто антиген, распознаваемый Т-клетками, подвергается предварительному расщеплению, или, иначе, процессингу, и в результате детерминанта, которую распознает ТкР, представляет собой лишь небольшой фрагмент исходного антигена. Еще одно отличие антител от ТкР заключается в том, что первые существуют в двух формах — в виде В-клеточных антигенсвязывающих рецепторов и в виде выделяемых клеткой молекул, а ТкР — это всегда сложный комплекс белков клеточной мембраны. Секретируемые клеткой антитела чаще всего представляют собой бифункциональные молекулы: их V-домены предназначены для связывания с антигенами, тогда как С-домены взаимодействуют с рецепторами на клетках организма-хозяина или с компонентами комплемента.

В этом разделе рассмотрено строение антигенсвязывающих центров молекул антител и ТкР, а также их взаимодействие со специфическими антигенами или комплексами антиген — МНС. Избирательность таких взаимодействий лежит в основе специфичности приобретенного иммунитета.

### 3.3.1. СВЯЗЫВАНИЕ АНТИТЕЛ С АНТИГЕНОМ

Между антителом и антигеном образуется множество нековалентных связей. Методом рентгеноструктурного анализа V-доменов установлено, что на концах Fab-ветвей молекул антител сосредоточены гипервариабельные участки полипептидной цепи. Отдельные аминокислотные остатки в этих участках специфически взаимодействуют с эпитопами антигена. Каркасные остатки в тех же участках, обычно не принимающие участия в связывании антигена, имеют весьма существенное значение для укладки V-домена, которая обеспечивает адекватную конформацию антигенсвязывающего центра.



При контакте специфических антител с антигеном между аминокислотными остатками антигенсвязывающего центра и эпитопом антигена образуются многочисленные нековалентные связи. По сравнению с ковалентными связями силы нековалентного межмолекулярного взаимодействия (водородные связи, электростатические, ван-дер-ваальсовы и гидрофобные взаимодействия) по отдельности весьма слабы, однако при большом числе слабых взаимодействий суммарная энергия связывания получается значительной.

Конформации антигенсвязывающего центра антитела и антигена-мишени комплементарны. Сила нековалентной связи зависит прежде всего от расстояния ( $d$ ) между взаимодействующими химическими группами. При электростатических взаимодействиях она пропорциональна  $1/d^2$ , а при ван-дер-ваальсовых —  $1/d^7$  т. е. становится значительной только при тесном сближении молекул (рис. 29). Для связывания антигенной детерминанты (эпитопа) с антигенсвязывающим центром антитела (паратопом) требуется взаимное притяжение атомных групп на участках молекул

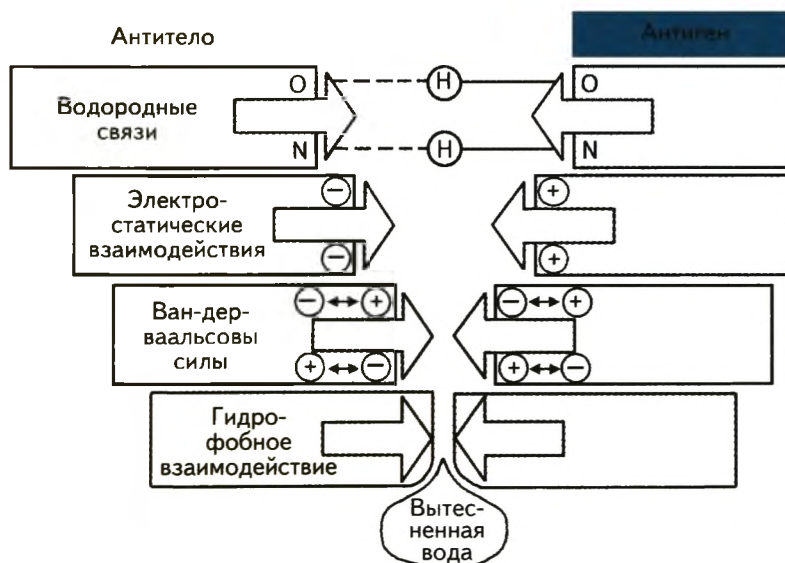


Рис. 29. Силы межмолекулярного притяжения.

Для возникновения сил связывания (между антителом и антигеном) требуется тесное сближение взаимодействующих атомных групп. Водородные связи образуются за счет водородных мостиков между такими группами. Электростатическое взаимодействие возникает вследствие притяжения противоположно заряженных атомных групп, расположенных на боковых цепях связывающихся белков. Ван-дер-ваальсовы силы обусловлены взаимодействием между электронными оболочками молекул (в данном случае между индуцированными колебательными диполями). Гидрофобное взаимодействие, способное обеспечивать до  $1/2$  общей энергии связи между антигеном и антителом, — это сильное притяжение в воде между неполярными (гидрофобными) группами, которое почти полностью устраняет их контакт с водой. В зависимости от типа связи различаются величины оптимального для связывания расстояния между взаимодействующими группами

антигена и антитела, контактирующих благодаря соответствию (комплементарности) конформации эпитопа и паратопа, и одновременное образование в результате нескольких нековалентных связей. При определенном уровне комплементарности величина энергии притяжения становится достаточной, чтобы не происходило термодинамического разрыва связей. В то же время при перекрывании электронных оболочек молекул антигена и антитела между ними возникают силы отталкивания, величина которых обратно пропорциональна 12-й степени величины межмолекулярного расстояния  $F \propto 1/d^{12}$ . Именно действием этих сил обусловлена специфичность антител к данному антигену (т. е. способность различать антигены), поскольку любое искажение идеально комплементарных конформаций вызывает снижение общей энергии связывания вследствие нарастания сил отталкивания и уменьшения сил притяжения.

При изучении взаимодействия между лизоцимом и Fab-фрагментом антилизоцимных антител было обнаружено, что поверхности эпитопа и паратопа комплементарны, причем и за пределами гипервариабельных участков. В общей сложности 17 аминокислотных остатков молекулы антитела контактируют с 16 остатками в молекуле лизоцима. В формирование антигенсвязывающего центра вносят вклад все гипервариабельные участки легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина, но, по-видимому, важнее других при этом участок CDR-3, кодируемый V—D—J-сегментом гена тяжелой цепи. Вероятно, это обусловлено его большей вариабельностью за счет рекомбинации V-, D- и J-сегментов.

**Аффинность и авидность антител.** Аффинность антител — это прочность связи одного антигенсвязывающего центра с индивидуальным эпитопом антигена. Аффинностью, или сродством, антител к антигену называют силу их взаимодействия (прочность связи), результирующую перечисленные выше силы притяжения и отталкивания (рис. 30). Взаимодействие антигенсвязывающего центра с антигеном можно исследовать термодинамическим методом. Для измерения аффинности отдельного антигенсвязывающего центра используют моновалентный антиген, или, точнее, изолированную антигенную детерминанту (гаптен). Поскольку нековалентные связи между паратопами и эпитопами способны диссоциировать, образование иммунных комплексов — процесс обратимый; применив к нему закон действующих масс, можно определить константу равновесия  $K$ , которая, собственно, и представляет собой константу аффинности (сродства).

**Авидность антител** — это суммарная сила взаимодействия антитела с антигеном. Основная единица молекул иммуноглобулинов, состоящая из четырех полипептидных цепей, содержит два антигенсвязывающих центра, поэтому антитела потенциально поливалентны по отношению к антигену. Кроме того, сами антиге-

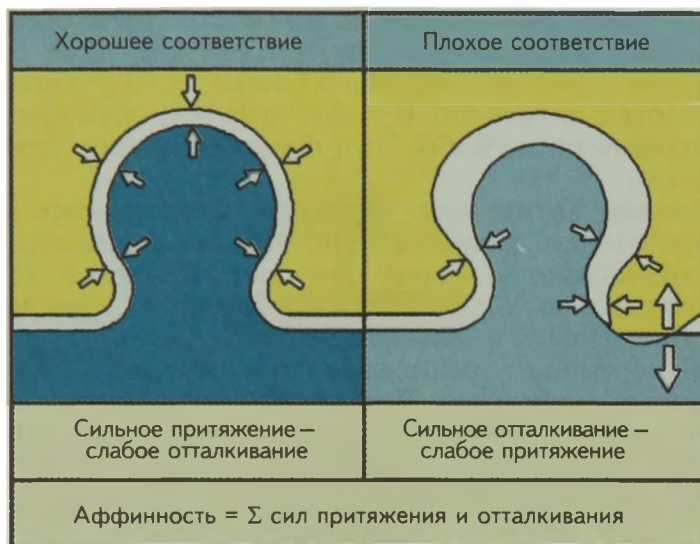


Рис. 30. Хорошее и плохое пространственное соответствие.

Аффинность антитела к антигену — это результирующая возникающих между ними сил притяжения и отталкивания. Высокоаффинные антитела точно комплементарны по конформации антигену, а низкоаффинные, напротив, неточно

ны могут быть моновалентны (например, гаптены) или поливалентны (в частности, микробные клетки). В отличие от аффинности как меры сродства между отдельной антигенной детерминантой и антигенсвязывающим центром сила взаимодействия поливалентных антител с поливалентным антигеном названа *авидностью*. Она зависит от сродства индивидуальных антигенсвязывающих центров к детерминантам данного антигена, но всегда больше их арифметической суммы, если с антигеном могут связаться оба центра. Поливалентность антигена и антител существенно усиливает прочность их соединения, поскольку для диссоциации иммунных комплексов необходим разрыв сразу всех связей. Применительно к физиологическим условиям более адекватно рассматривать авидность, а не аффинность антител, поскольку природные антигены обычно поливалентны. Однако для изучения иммунохимических аспектов взаимодействия антител с антигеном требуется точное измерение аффинности антител к гаптенам.

**Специфичность и аффинность антител.** Реакциям антиген—антитело свойственна высокая специфичность. Например, противокоревые антитела связываются с вирусами кори и создают иммунитет к этому заболеванию, но не способны связаться с вирусами других видов, в частности с вирусами полиомиелита, и не защищают от них организм. Специфичность антисыворотки суммарно отражает специфичность содержащихся в ней антител, в популя-

ции которых может присутствовать множество паратопов, способных связываться с различными эпитопами или даже с разными частями одного и того же эпитопа. Однако, если антиген А имеет общие эпитопы с антигеном Б, часть антител, специфичных к А, будет реагировать также и с Б. Этот феномен назван перекрестной реактивностью.

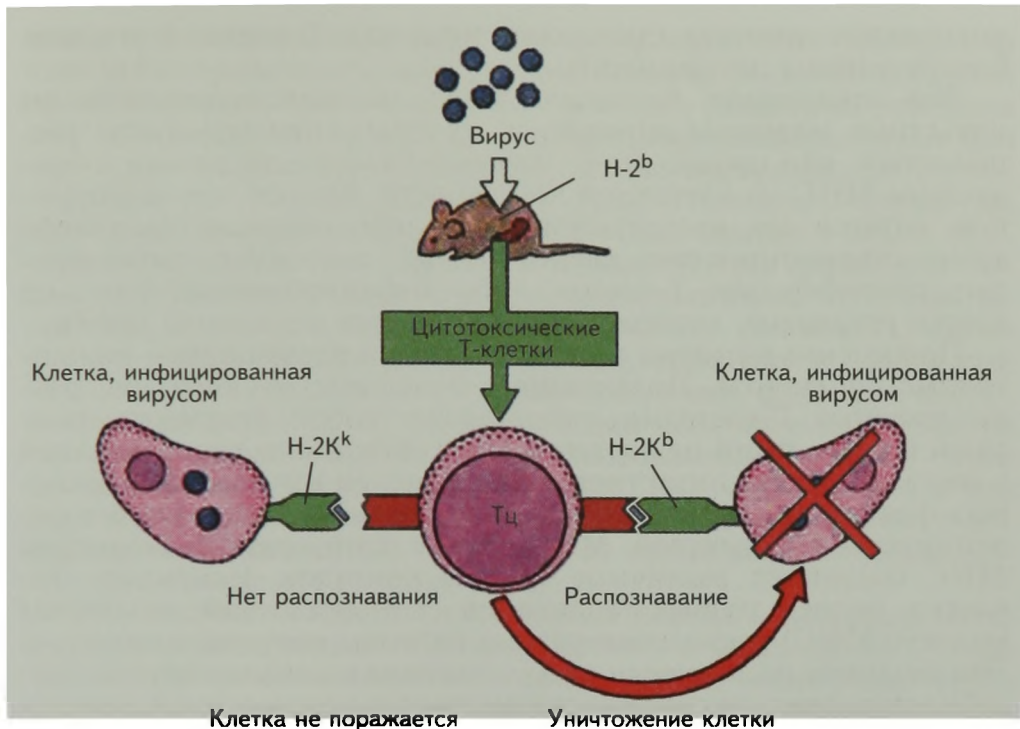
**Распознавание антителами наружной конформации антигенов.** Антитела распознают, разумеется, не отдельные химические группы, а пространственную форму эпитопов, причем с поразительной специфичностью, улавливая кроме различий в распределении зарядов (в оптической и стереоизомерии) также и минимальные различия в первичной аминокислотной последовательности (в случае белковых антигенов). Вследствие столь тонкой специфичности большая часть антител способна связываться только с нативными (не денатурированными) антигенами или с такими фрагментами антигена, которые сохраняют третичную структуру, необходимую для множественных взаимодействий при образовании связи между паратопом и эпитопом.

В связи с этим в иммунологических исследованиях при получении специфических антител могут возникать затруднения. Для упрощения работы в качестве антигена часто используют специально синтезированный короткий полипептид известной первичной структуры, поскольку это легче, чем путем очистки получить достаточное количество нативного антигена. Однако антитела, образующиеся в результате иммунизации синтетическими пептидами, часто не обладают требуемой специфичностью и аффинностью к антигену в его нативной форме.

### 3.3.2. РАСПОЗНАВАНИЕ АНТИГЕНА Т-КЛЕТКАМИ

Т-клетки распознают антиген, связанный другими клетками и представленный на их поверхности в ассоциации (комплексе) с молекулами МНС класса I или II, функционирующими как «системы наведения» для Т-клеток. Необходимость ассоциации с молекулами МНС называют иначе *МНС-рестрикцией*. Принцип такой рестрикции (ограничения) наиболее очевидно выявляется при Т-клеточном иммунном ответе на экспериментальную вирусную инфекцию у мыши (рис. 31). Цитотоксические Т-лимфоциты (Тц) зараженного животного способны поражать инфицированные вирусом клетки-мишени того же самого, но не иного H-2-гаплотипа.

Преимущество такой системы двойного распознавания чужеродных антигенов состоит в том, что свободный (не ассоциированный с молекулами МНС) вирус не может полностью заблокировать все специфичные к нему Тц-рецепторы. Еще более важно, что благодаря МНС-рестрикции Т-клетки способны отличать эндогенные антигены от экзогенных.



**Рис. 31. МНС-рестрикция цитотоксической активности Т-лимфоцитов.**

Рестриktированное по гаплотипу поражение инфицированных вирусом клеток-мишеней цитотоксическими Т-лимфоцитами (Тц). Мышей гаплотипа H-2<sup>b</sup> примировали вирусом, после чего из селезенки выделяли Тц и определяли их способность поражать инфицированные тем же вирусом клетки-мишени гаплотипов H-2<sup>b</sup> и H-2<sup>k</sup>. Тц поражают клетки-мишени H-2<sup>b</sup>, но не H-2<sup>k</sup>, т. е. Т-клетки распознают специфическую структуру, возникающую в результате ассоциации продукта класса I H-2К (или H-2D) с вирусным антигеном (например, комплекс вирус/H-2К). В контрольном эксперименте клетки-мишени обоих гаплотипов обработаны антителами, распознающими отпочковывающийся вирус и не ограниченными в своем эффекте гаплотипом. В результате противовирусные антитела и комплемент поражают инфицированные клетки-мишени независимо от гаплотипа

На сходных принципах рестриktированного по МНС распознавания основано функционирование хелперных Т-клеток (Тх). Они распознают антиген, например, на макрофагах и В-клетках, в ассоциации с молекулами МНС класса II, которые служат для передачи сигналов распознавания между антигенпрезентирующими клетками (в частности, макрофагами) и Тх.

### 3.3.3. ПРОЦЕССИНГ И ПРЕЗЕНТАЦИЯ АНТИГЕНА

Презентации антигенов Т-клеткам предшествует процессинг. Циркулирующие антитела и реакции клеточного иммунитета, как правило, специфичны в отношении разных детерминант одного и того же антигена. Например, у мыши В-клетки распознают ами-



ноконцевые эпитопы глюкагона, тогда как Т-клетки — его карбоксиконцевые детерминанты.

Это происходит благодаря тому, что презентруются не интактные молекулы антигена, а их фрагменты (продукты расщепления, или процессинга — переработки) в ассоциации с продуктами МНС на клеточной поверхности. Клетки, процессирующие антиген для презентации, — это либо специализированные антигенпрезентирующие клетки (АПК), способные стимулировать пролиферацию Т-клеток, либо инфицированные вирусами клетки организма, которые затем становятся мишенями для Тц.

Процессинг антигена заключается в его расщеплении на пептидные фрагменты. Подавляющее большинство эпитопов, распознаваемых Т-клетками, представляет собой фрагменты пептидной цепи, часто не доступные для иммунного распознавания в составе молекул интактного белка. Только малая часть пептидных фрагментов белкового антигена способна связаться с соответствующей молекулой МНС. Более того, разные молекулы МНС связывают различные наборы пептидов. Например, Тх-клетки мышей разных гаплотипов (т. е. носителей различных молекул МНС) распознают разные пептиды вирусного антигена. Эти различия распознавания обусловлены главным образом способностью данного пептида связываться с определенной молекулой МНС класса II.

Перед связыванием с молекулами МНС белковые антигены расщепляются на пептиды. Процессинг антигенов, в результате которого образуются пептиды, способные связаться с молекулами МНС, происходит во внутриклеточных органеллах антигенпрезентирующих клеток (рис. 32).

Для целей исследования процесс расщепления антигена можно исключить, используя в качестве антигенов синтетические пептиды. Применение именно таких легко синтезируемых пептидов с

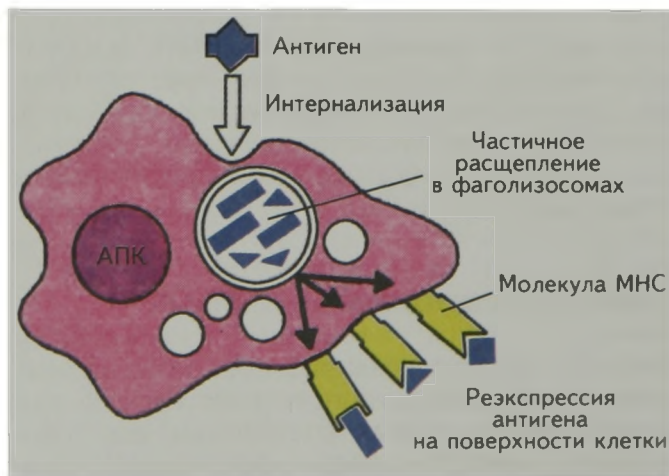


Рис. 32. Процессинг антигена.

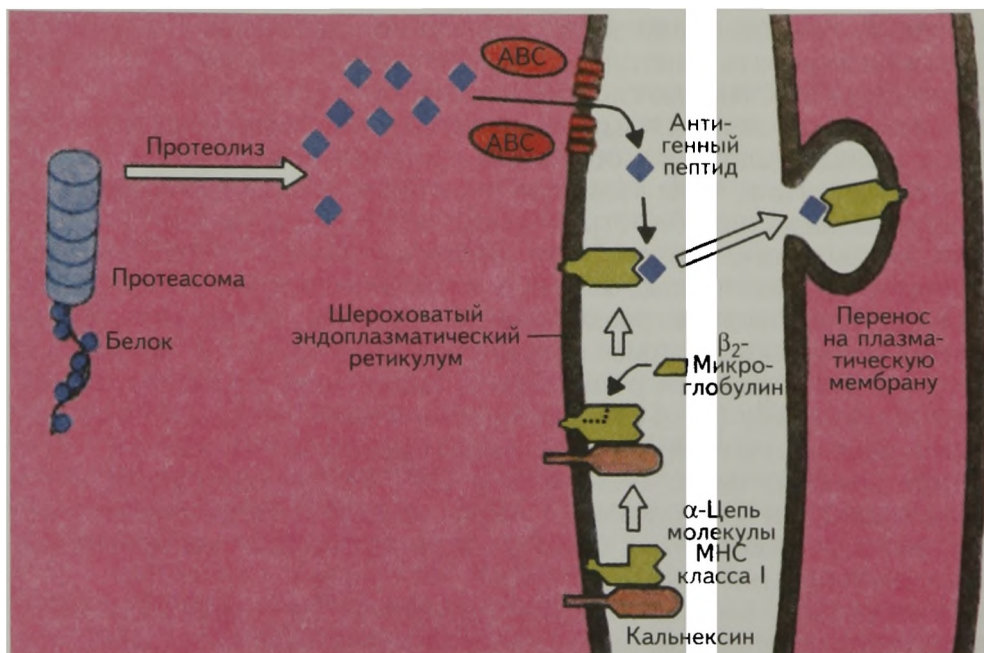
Экзогенные антигены захватываются антигенпрезентирующими клетками, а затем расщепляются их протеолитическими ферментами в специализированных внутриклеточных отделах (компартментах). Антигенные пептиды образуют комплекс с молекулами МНС класса II в везикулах, которые, направляясь к поверхности клетки, движутся навстречу эндоцитарным везикулам

известной аминокислотной последовательностью позволило идентифицировать эпитопы, распознаваемые Т-клетками разной специфичности. Аминокислотные замены в различных позициях дали возможность выяснить сравнительное значение того или иного аминокислотного остатка в составе определенных эпитопов. Кроме того, при помощи пептидов известной структуры была доказана способность молекул МНС классов I и II к прямому связыванию фрагментов антигена. Путем сравнения эффектов аминокислотных замен, т.е. их влияния на МНС-связывание и Т-клеточную реактивность, удалось установить, какие именно аминокислотные остатки контактируют с молекулой МНС и с Т-клеточным рецептором. Например, фрагмент, состоящий из остатков 52...61 полипептидной цепи лизоцима яичного белка, распознают H-2-IA<sup>K</sup>-рестриктированные Т-клетки. Этот пептид связывается с молекулами IA<sup>K</sup>. Как установлено, в его взаимодействии с продуктами МНС класса II принимают участие три аминокислотных остатка, в то время как три других остатка осуществляют контакт с ТкР

Образование комплекса антигенный пептид — молекула МНС происходит следующим образом. Полость в молекуле МНС, где происходит связывание антигенных пептидов, имеет разнообразные карманы и щели, а также выступающие и утопленные участки поверхности. Их тонкая топология отчасти зависит от «выстилающих» эту полость аминокислотных остатков и поэтому различается у молекул МНС разных гаплотипов. Параметры связывания пептида с молекулой МНС зависят от природы его боковых цепей и от взаимной комплементарности контактирующих участков обоих партнеров ассоциации. Определенная часть боковых цепей пептида не участвует во взаимодействии с молекулой МНС и предназначена для контакта с ТкР

Образование комплексов из антигенных пептидов и молекул МНС происходит в специализированных внутриклеточных органеллах, при этом взаимодействие с молекулами класса I и класса II происходит в различных участках клетки.

Как установлено недавно, при процессинге эндогенных антигенов партнеры взаимодействия могут и физически, и функционально ассоциировать друг с другом. Например, новосинтезированные комплексы из молекул МНС класса I и  $\beta_2$ -микроглобулина ассоциируют с ТкР в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и диссоциируют после переноса из ЭР на *цис*-сторону комплекса Гольджи. Компартиментализация различных продуктов процессинга способствует, предположительно, наиболее эффективному накоплению антигенных пептидов и антигенпрезентирующих клеток. Антигенные пептиды, перенесенные в ЭР, образуют комплексы с молекулами МНС класса I (рис. 33). Образование таких комплексов — это сложный процесс, в котором принимают участие белки-«шепероны» (т.е. спутники, помощники), такие, как



**Рис. 33. Образование комплексов антигенных пептидов эндогенного происхождения с молекулами МНС класса I.**

Предполагаемая последовательность образования комплексов антигенный пептид — молекула МНС. Цитоплазматические антигены процессируются протеасомами, две субъединицы которых кодируются генами LMP2 и LMP7 из комплекса МНС. Перенос пептидов осуществляют два транспортных белка (из суперсемейства ABC), кодируемых генами TAP1 и TAP2, также относящимися к МНС. Антигенные пептиды образуют комплекс с тяжелыми цепями молекул МНС класса I и  $\beta_2$ -микроглобулином в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Молекулярные шапероны, такие как кальнексин, присоединяются к еще не полностью готовым комплексам антигенный пептид — молекула МНС класса I. После этого готовые комплексы транспортируются на поверхность клетки

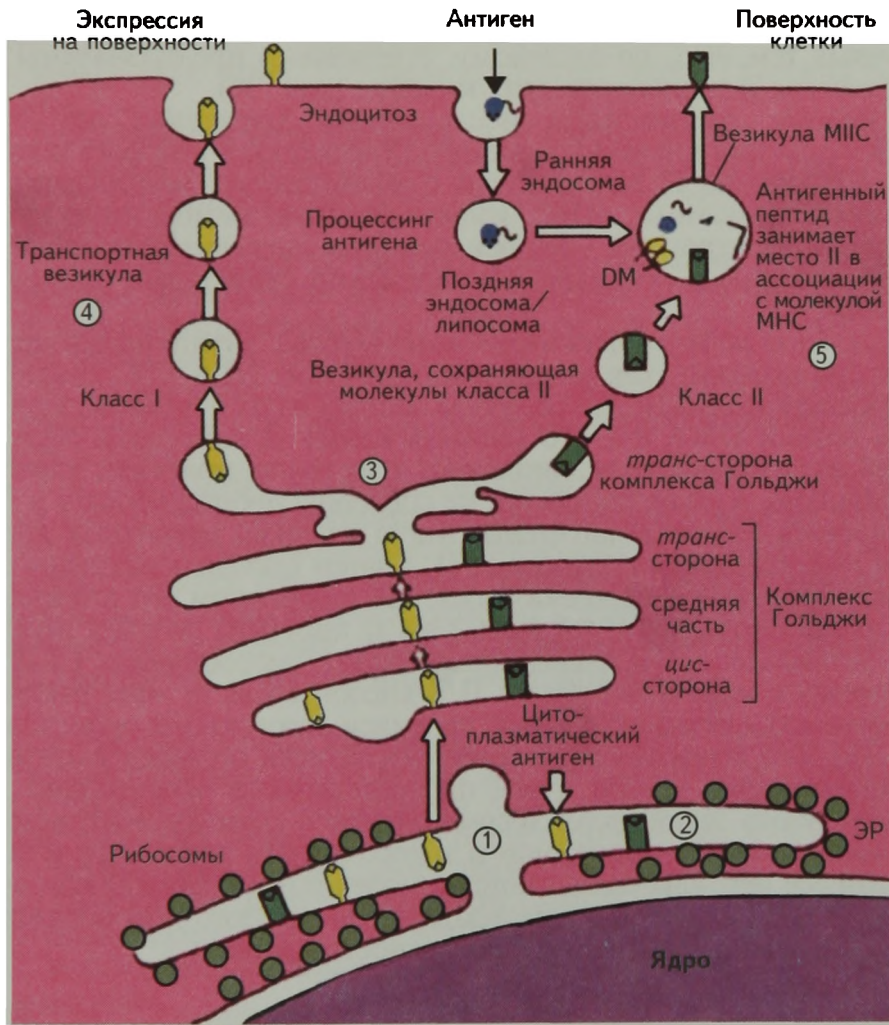
кальнексин. Шапероны инициируют и организуют сборку стабильного, транспортируемого на поверхность клетки комплекса, состоящего из тяжелой цепи класса I,  $\beta_2$ -микроглобулина и антигенного пептида. В отсутствие антигенного пептида такие комплексы нестабильны, поэтому Т-клеткам могут быть представлены (презентированы) только комплексы, полностью функционально активные.

Молекулы МНС класса II образуют комплексы с антигенными пептидами экзогенного происхождения в эндосомах. Установлено, что  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи молекул МНС класса II находятся в ЭР в виде комплексов с полипептидом, который был назван инвариантной цепью (Ii); этот белок кодируется геном, не относящимся к МНС. Комплекс  $\alpha\beta$ —Ii транспортируется через аппарат Гольджи в эндосому или лизосому, где в кислой среде происходит освобождение Ii. На основании экспериментальных данных можно предполагать, что диссоциация Ii из  $\alpha\beta$ -комплекса позволяет антигенному



пептиду занять его место. Комплекс молекул МНС класса II с антигенным пептидом находится в эндосоме/лизосоме 1...3 ч, прежде чем поступает на клеточную поверхность.

Каким образом пептиды экзогенных антигенов встречаются с молекулами класса II в соответствующих клеточных органеллах? Для ответа на этот вопрос нужно рассмотреть пути внутриклеточ-



**Рис. 34.** Предполагаемые пути внеклеточных перемещений молекул МНС, связанных с презентацией антигена.

Новосинтезированные молекулы класса I ассоциируют с антигенным пептидом (1). Молекулы класса II присоединяют цепи Ii в полости ЭР (2). Белок Ii препятствует ассоциации молекул класса II с антигенными пептидами и содержит последовательности, которые позволяют этим молекулам выйти из ЭР. Молекулы класса I и класса II разделяются после прохождения через комплекс Гольджи (3). Молекулы класса I направляются непосредственно к клеточной поверхности (4). Молекулы класса II поступают в кислотный компартмент — везикулы МНС, где образуют комплекс с пептидами антигенов экзогенного происхождения, после того как инвариантный пептид CLIP покинет пептидосвязывающую полость

ных перемещений молекул МНС. После сборки комплексов в ЭР молекулы обоих классов МНС проходят через комплекс Гольджи — молекулы класса I в ассоциации с антигенными пептидами эндогенного происхождения и молекулы класса II, связанные с инвариантной цепью (Ii). Молекулы МНС одного класса отделяются от молекул другого на *транс*-стороне комплекса Гольджи. Затем молекулы класса II на пути к плазматической мембране попадают в особые эндосомы или лизосомы, которые отличаются от обычных тем, что, по-видимому, специально предназначены для накопления и транспорта этих молекул (рис. 34).

Главным достижением исследований последних лет стала идентификация клеточных органелл (везикул), в которых молекулы МНС класса II ассоциируют с антигенными пептидами. Эти везикулы, названные МПС, имеют сложную мембранную структуру (при электронной микроскопии она выглядит наподобие луковой кожуры) и обладают одновременно свойствами эндосом и лизосом.

Ключевая роль в образовании комплексов с антигенными пептидами принадлежит, как выяснилось, молекуле HLA-DM, сходной с молекулами класса II. Эта молекула состоит из  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей, кодируемых генами DMA и DMB (область класса II комплекса HLA). У линий мутантных клеток, лишенных этих генов, молекулы класса II нестабильны, а сами эти клетки не способны процессировать и презентировать белковые антигены. Когда из таких мутантных клеток были выделены молекулы класса II, а затем проанализированы связанные с ними пептиды, оказалось, что в основном это инвариантный полипептид, CLIP (от англ. class II associated invariant peptide). Как установлено, HLA-DM катализирует диссоциацию CLIP из комплекса с молекулой класса II в кислой среде *in vitro*, открывая возможность связывания с ней пептидов экзогенного происхождения. По всей вероятности, экзогенный антиген попадает в антигенпрезентирующие клетки путем опосредованного рецепторами или жидкофазного эндоцитоза. Ферментативное расщепление эндоцитированных белков происходит в эндосомах или лизосомах, и образовавшиеся пептиды связываются с молекулами класса II при участии HLA-DM в качестве катализатора. После этого новообразованный комплекс направляется к поверхности клеток.

### 3.4. РЕАКЦИИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА

- Цитокинам принадлежит центральная роль в положительной и отрицательной регуляции иммунного ответа, а также в его интеграции с физиологическими функциями других систем организма — эндокринной и гемопозитической.
- Распознавание микробных структур происходит в самом начале реакции организма на инфекцию, до развития специфичес-



кого иммунного ответа. Тип последующего ответа зависит в основном от выделяемых цитокинов.

- Регуляцию иммунного ответа осуществляют хелперные Т-клетки (Тх). Отвечая на антиген, они выделяют различные наборы цитокинов и тем самым иницируют разные эффекторские функции. Так, Тх1-клетки активируют макрофаги, а Тх2-клетки способствуют образованию антител. Если активирована неадекватная эффекторная функция, элиминации возбудителя не происходит и развивается хроническая иммунопатология.

- Иммунный ответ Тх1-типа подавляет ответ Тх2-типа и наоборот.

- Большинство цитотоксических Т-клеток распознает антиген, презентированный в ассоциации с молекулами МНС класса I, тогда как НК-клетки реагируют на мишени, не экспрессирующие эти молекулы.

- Цитотоксическая активность клеток-киллеров — это комбинированное воздействие на клетки-мишени путем прямого контакта, выделения цитокинов и экзоцитоза белков из гранул, в частности перфорины и гранзимов.

- Активированные макрофаги уничтожают поглощенные ими микроорганизмы при помощи высокоактивных метаболитов кислорода и азота.

- Когда реакции клеточного иммунитета не обеспечивают устранения инфекции или персистирующего антигена и поэтому не могут завершиться, в тканях возникает хронический деструктивный воспалительный процесс или образуются гранулемы. При этом непосредственное разрушение жизненно важных клеток или вторичные микрососудистые нарушения, обусловленные избыточным выделением цитокинов, могут стать причиной иммунопатологии.

Термин «клеточный иммунитет» (иммунитет, опосредованный клетками) первоначально служил для обозначения местных реакций (обычно на внутриклеточно локализующиеся возбудители), осуществляемых лимфоцитами и фагоцитами без участия антител — эффекторов гуморального иммунитета. Теперь этот термин часто используют в более широком смысле для описания такого противои инфекционного или противоопухолевого иммунного ответа, в котором антителам принадлежит не ведущая, а вспомогательная роль.

Однако полностью разделить клеточный и гуморальный иммунитет невозможно: в инициации образования антител участвуют клетки, а в некоторых реакциях клеточного иммунитета важную связующую функцию выполняют антитела. Более того, не существует, по-видимому, клеточного иммунитета без образования антител, которые способны различными путями модифицировать опосредованный клетками иммунный ответ. Так, комплексы антиген—антитело вызывают высвобождение хемотаксических

фрагментов комплемента, усиленно привлекающих лейкоциты в очаг воспаления, и, кроме того, благодаря Fc-рецепторам антитела могут принимать участие в связывании антигенов с клетками и тем самым влиять на реакции клеточного иммунитета, в частности обеспечивать прикрепление фагоцитов и цитотоксических Т-клеток к клеткам-мишеням. Вообще, при скоординированном иммунном ответе происходит многосторонний обмен сигналами между различными типами вступающих в него лейкоцитов и тканевыми клетками.

Межклеточная сигнализация в иммунной системе осуществляется путем непосредственного контактного взаимодействия клеток, в котором участвуют их поверхностные молекулы, или при помощи цитокинов, называемых «белками связи». Эти белки действуют как растворимые медиаторы межклеточных взаимодействий. Вместе с гормонами и нейромедиаторами они составляют основу языка химической сигнализации, путем которой в многоклеточном организме регулируется морфогенез, регенерация тканей и иммунный ответ. Наряду с сигналами, возникающими при взаимодействии клеток с антигеном или друг с другом, существует цитокиновая сигнальная сеть, регулирующая реакции врожденного и приобретенного иммунитета, в том числе воспаление, противовирусную защиту, клональную пролиферацию антигенспецифических Т- и В-лимфоцитов и их функции.

### 3.4.1. ЦИТОКИНЫ И ИХ КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Цитокины — это небольшие белки (молекулярная масса от 8000 до 80 000), действующие аутокринно (т. е. на клетку, которая их продуцирует) или паракринно (на клетки, расположенные вблизи). Образование и высвобождение этих высокоактивных молекул обычно происходят кратковременно и жестко регулируются. К настоящему времени идентифицировано уже более ста различных цитокинов, и постоянно появляются сообщения об открытии новых. Цитокины воздействуют на клетку, связываясь со специфическими рецепторами на цитоплазматической мембране и вызывая этим каскадную реакцию, ведущую к индукции, усилению или подавлению активности ряда регулируемых ими генов.

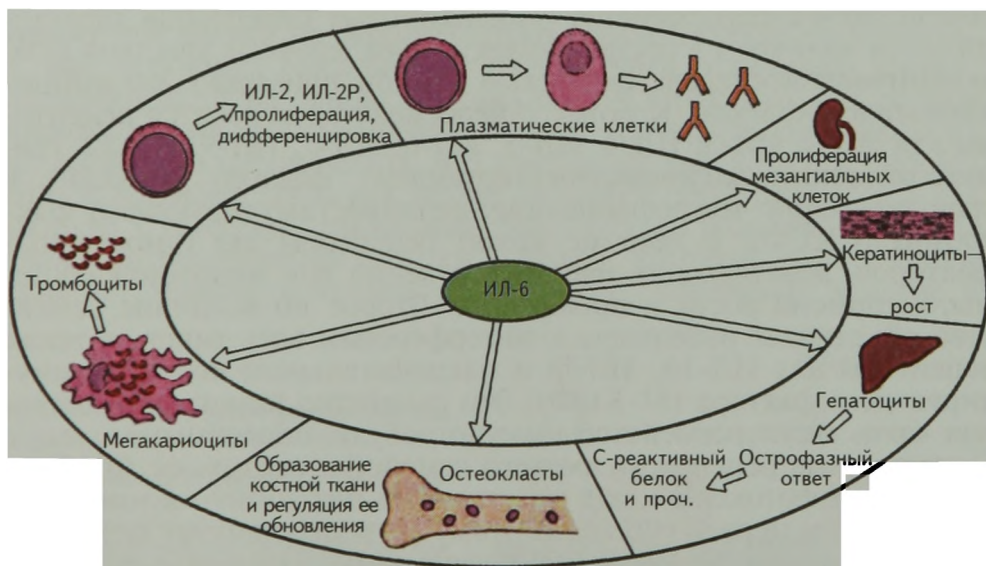
Многие цитокины имеют по несколько названий. Это связано с тем, что они были независимо открыты в различных областях исследований — иммунологии, вирусологии, гематологии, клеточной биологии и онкологии. К цитокинам относятся интерлейкины (ИЛ), обозначаемые сейчас номерами от ИЛ-1 до ИЛ-18, интерфероны (ИФ), колониестимулирующие факторы (КСФ), факторы некроза опухолей (ФНО), факторы роста и хемокины (хемотаксические цитокины) (см. ниже).

### Наиболее известные цитокины

Колонистимулирующие факторы	КСФ	М-КСФ, Г-КСФ, ГМ-КСФ
Хемокины	—	RANTES, MCP-1
Интерлейкины	ИЛ	ИЛ-1, ИЛ-2 и т. д.
Интерфероны	ИФ	ИФ $\alpha$ , ИФ $\beta$ , ИФ $\gamma$
Факторы некроза опухолей	ФНО	ФНО $\alpha$ , ФНО $\beta$
Факторы роста	ФР	ФРН, ФРЭ

**Примечание.** Номенклатура цитокинов отчасти отражает ту функциональную активность, по которой каждый из них был впервые обнаружен, а также очередность их обнаружения.

Причина многих недоразумений в номенклатуре цитокинов состоит в том, что они, по крайней мере *in vitro*, проявляют многообразные активности; примером может служить ИЛ-6, эффекты которого очень разнообразны (рис. 35). Кроме того, в ряде случаев один и тот же цитокин был выделен независимо в нескольких лабораториях при использовании совершенно разных экспериментальных систем. Путаницу с названиями усугубляет еще и частичное совпадение активностей у ряда цитокинов, создающее впечатление некоторой избыточности их функций. Дополнительные трудности в изучении цитокинов возникают из-за того, что эти медиаторы редко образуются по отдельности и, как правило, нередко действуют поодиночке.



**Рис. 35.** Функциональная активность интерлейкина-6 (ИЛ-6).

Цитокин ИЛ-6 оказывает типичное для цитокинов разноплановое воздействие на многие системы органов. В частности, он стимулирует образование и активность остеокластов, особенно после падения концентрации эстрогенов

Для цитокинов характерен сложный сетевой характер функционирования, при котором продукция одного из них влияет на образование или проявление активности ряда других. *In vivo* отдельная клетка организма редко становится мишенью какого-либо одного цитокина. Гораздо чаще отдельные цитокины служат как бы буквами некоего алфавита, образующими целое цитокиновое «слово», и реакция клетки возникает в результате воздействия на ее поверхность именно такого «слова».

Наиболее важные функции цитокинов и их рецепторов в иммунном ответе будут рассмотрены ниже; вначале необходимо остановиться на основных аспектах молекулярной биологии этих белков.

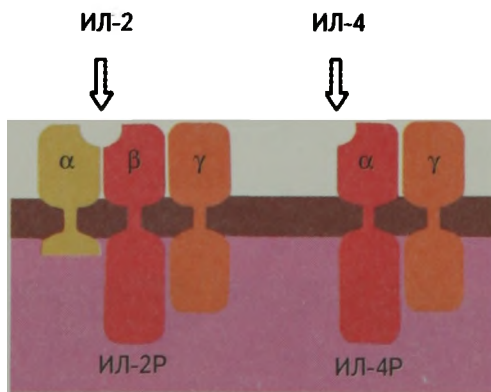
Цитокины и их рецепторы подразделяются на ряд семейств. Между индивидуальными цитокинами или их группами существует лишь небольшое сходство на уровне ДНК и аминокислотной последовательности, но все же они распределяются по гомологии на несколько больших семейств. Из них наиболее значительны три семейства: первое состоит из не менее чем 15  $\alpha$ -интерферонов (ИФ $\alpha$ ), второе — более чем из 50 хемокинов (по данным анализа генома), и третье включает цитокины, которые связываются с рецепторами для ФНО. Гораздо легче, однако, сгруппировать цитокины не по функциям, а по характеру их трехмерной структуры, и такое подразделение четко отражает внутригрупповое сходство (по конформации и аминокислотной последовательности) клеточных цитокиновых рецепторов. Наиболее крупное семейство — суперсемейство — цитокиновых рецепторов характеризуется наличием в составе молекул внеклеточных участков с гомологичной последовательностью длиной примерно 200 аминокислотных остатков. К этому суперсемейству относятся рецепторы для ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-9, ИЛ-12, гранулоцитарному колониестимулирующему фактору (Г-КСФ) и гранулоцитарно-макрофагальному колониестимулирующему фактору (ГМ-КСФ). В него же входят рецепторы для гуморальных факторов, действующих преимущественно вне иммунной системы, — гормона роста и пролактина. Второе по величине семейство объединяет рецепторы к интерферонам всех типов, а также рецепторы для ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и макрофагального колониестимулирующего фактора (М-КСФ). Это семейство входит как составная часть в суперсемейство иммуноглобулиноподобных молекул. Цитокиновые рецепторы третьего семейства связывают ФНО $\alpha$  и ФНО $\beta$ , лимфотоксин и ряд родственных цитокинов, в том числе фактор роста нервов (ФРН). К этому же рецепторному семейству относится молекула Fas (CD95), связывание которой с лигандом FasL служит сигналом клеточной гибели.

Большинство цитокиновых рецепторов — это мембранные гликопротеиды типа 1, состоящие из одного-единственного трансмембранного домена. Однако действительно функциональные ре-

цепторы, как правило, состоят из двух или большего числа субъединиц, которые могут иметь одинаковую структуру даже у различных по специфичности рецепторных комплексов. Обычно рецептор содержит «частную» высокоспецифичную субъединицу, способную связывать определенный цитокин, и «общую» субъединицу, которая встречается в рецепторах для других цитокинов. Например, рецепторный комплекс для ИЛ-2 состоит из трех субъединиц ( $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ). Субъединица ИЛ-2 $\beta$  встречается также в рецепторе для ИЛ-15, а ИЛ-2 $\gamma$  — в рецепторах для ИЛ-4, ИЛ-7 и ИЛ-9 (рис. 36). Подобным же образом ИЛ-6 $\beta$  (известный как gp130) содержится в качестве субъединицы в рецепторах для таких цитокинов, как LIF (от англ. leukaemia inhibitory factor — фактор подавления лейкоза), онкостатин М и ИЛ-11. Сходная функциональная активность некоторых цитокинов отчасти объясняется, возможно, наличием одинаковых субъединиц в их клеточных рецепторах. Поэтому, видимо, ИЛ-6, ИЛ-11 и онкостатин М одинаково действуют на гепатоциты, мегакариоциты и остеокласты, а дублирующий эффект ИЛ-2 и ИЛ-4 в качестве факторов роста Т-клеток обусловлен, по всей вероятности, присутствием в рецепторах для того и другого цитокина идентичной ИЛ-2 $\gamma$ -цепи. В то же время благодаря дифференциальной экспрессии частных рецепторных субъединиц каждый цитокин обладает и уникальной активностью в отношении клеток определенного типа. Например, LIF может задерживать дифференцировку эмбриональных стволовых клеток, тогда как ИЛ-6 такой активностью не обладает, поскольку эти клетки не экспрессируют соответствующего рецептора. Все хемокины связываются рецепторами отдельного класса, объединенными на основе их уникальной структуры под общим названием семи трансмембранных гликопротеидов. Некоторые из них настолько специфичны, что связывают только один определенный хемокин, тогда как другие обладают сродством к ряду хемокинов. Существует также один рецептор (он известен как групповой эритроцитарный антиген Даффи), который «без разбора» связывает многие хемокины и, вероятно, принимает участие в

**Рис. 36.** Схема строения рецепторов для интерлейкинов.

Высокоаффинный рецептор для ИЛ-2 образован тремя полипептидными цепями;  $\alpha$ -цепь и  $\beta$ -цепь обеспечивают связывание цитокина,  $\gamma$ -цепь передает возникающий при этом сигнал внутрь клетки. Рецептор для ИЛ-4 имеет уникальную  $\alpha$ -цепь, специфически распознающую именно этот цитокин, и сигнальную  $\gamma$ -цепь, идентичную  $\gamma$ -цепи рецептора для ИЛ-2





ликвидации образующегося в очаге воспаления избытка этих медиаторов. Хемокины связываются также с  $\beta$ -адренорецепторами. Это еще одно свидетельство перекрывания системы цитокинов и других сетевых сигнальных систем, образуемых растворимыми медиаторами.

Связывание цитокиновых рецепторов активирует механизм внутриклеточной передачи сигналов. Современные представления о биологической роли цитокинов основаны на данных структурного анализа их молекул и изучении механизмов внутриклеточной передачи вызываемых ими сигналов. Благодаря таким исследованиям сейчас можно уже довольно детально проследить эту цепь последовательных событий белок-белкового распознавания, от момента связывания цитокина с клеточной поверхностью до мобилизации различных факторов транскрипции в ядре клетки. Как известно, первая стадия цитокиновой сигнализации — это вызванная присоединением цитокина агрегация субъединиц рецептора. Цитоплазматические «хвосты» этих субъединиц, взаимодействуя между собой, запускают нисходящий каскад сигнализации. В самом простом случае одинаковые субъединицы рецепторной молекулы, связавшись с цитокином, образуют гомодимер, в другом случае «частная» субъединица после присоединения цитокина вызывает гетеро- или гомодимеризацию «общих» субъединиц, передающих сигнал внутрь клетки (рис. 37).

Большая часть (если не все) функции цитокиновых рецепторов осуществляется с обязательной активацией Jaks, или Jak-киназ (от англ. Janus kinases). Выполняя свою главную функцию, т. е. агре-

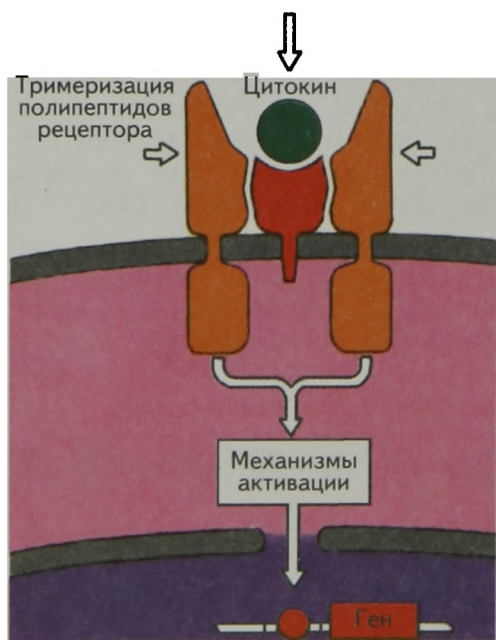
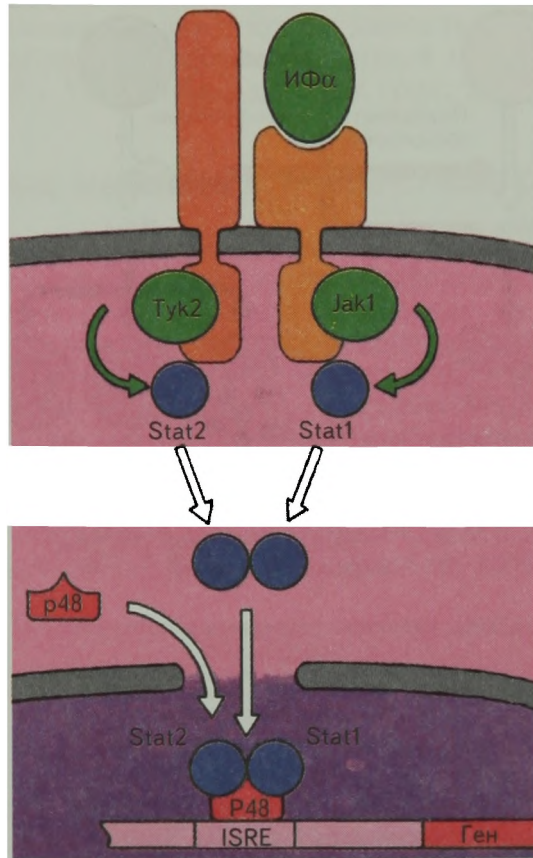


Рис. 37. Принципиальная схема взаимодействия цитокинов с клеткой.

Упрощенная схема активации клетки цитокином. (Представлено взаимодействие ИЛ-6 с его рецептором.) Связавшись с рецептором на поверхности клетки, цитокин вызывает димеризацию или полимеризацию его полипептидных цепей, в результате которой активируются механизмы внутриклеточной сигнализации (например, киназные каскады). Это приводит к образованию активных факторов транскрипции, которые мигрируют в ядро и связываются с энхансерами — нуклеотидными последовательностями, усиливающими транскрипцию генов, активируемых данным цитокином

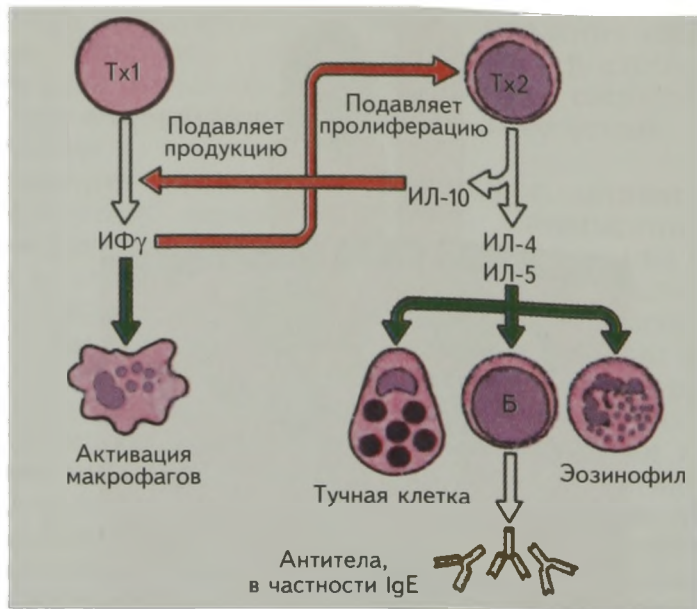


**Рис. 38. Пути внутриклеточной передачи сигнала.**

Схема активируемых ИФ $\alpha$  механизмов внутриклеточной передачи сигнала. Связывание с ИФ $\alpha$  вызывает агрегацию двух субъединиц клеточного рецептора. В результате происходят активация и фосфорилирование Jak-киназ — Jak1 и Tyk2, которые затем фосфорилируют молекулы Stat1 и Stat2. Эти факторы транскрипции образуют комплекс с белком p48, который связывается с ДНК. Образовавшийся комплекс достигает ядра клетки и индуцирует транскрипцию генов, несущих регуляторный элемент ответа на интерферон (ISRE, от англ. interferon response element)

гируя субъединицы рецептора, цитокин одновременно вызывает агрегацию Jak-киназ. Затем под действием этих Jak-киназ происходит сопряженное с присоединением цитокина фосфорилирование остатков тирозина в составе различных сигнальных белков, в том числе переносчиков сигнала и активаторов транскрипции (Stats, от англ. signal transducers and activators of transcription). Димеры белков Stats перемещаются к ядру клетки и связываются непосредственно с ДНК. Этот вид сигнализации изображен на рис. 38 на примере связывания ИФ $\alpha$  с его клеточным рецептором.

Как специфическое, так и плейотропное действие хемокинов в конечном итоге влияет на перемещение клетки, но это сложный



**Рис. 39. Избирательная индукция хелперных механизмов Тх1- и Тх2-клетками.**

Выделяя разные наборы цитокинов, Тх1- и Тх2-клетки не только стимулируют различные эффекторные механизмы иммунного ответа, но и взаимно подавляют иммунорегуляторную активность друг друга

эффект: вслед за присоединением хемокинов к рецепторам происходит передача сигнала на G-белки, затем мобилизация вторых, внутриклеточных посредников, реорганизация цитоскелета, образование ограниченных адгезивных контактов, прилипание и отлипание клеточной поверхности, вытяжение и сокращение псевдоподий — все эти этапы необходимы для направленной миграции.

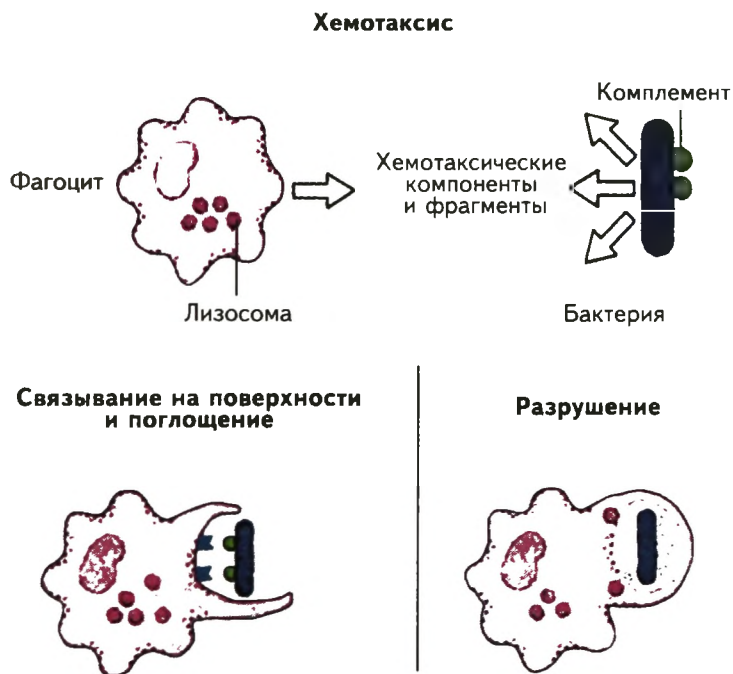
Дифференцировка Т-хелперов на субпопуляции составляет важный этап в определении эффекторных механизмов иммунного ответа. Как теперь установлено, существуют две субпопуляции Тх-клеток  $CD4^+$ , различающихся по набору (профилю) синтезируемых ими цитокинов, и от этого профиля зависит, какой из двух основных типов иммунного ответа будет реализован. У человека Тх1-клетки, как правило, продуцируют ИФγ, ФНОβ и ИЛ-2 и участвуют в опосредованных клетками воспалительных реакциях. Некоторые из цитокинов, выделяемых Тх1, обладают провоспалительной активностью, а также стимулируют цитотоксические клетки и Т-эффекторы гиперчувствительности замедленного типа. В противоположность Тх1-клеткам клетки Тх2 синтезируют ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-10 и ИЛ-13 и усиливают образование антител, особенно класса IgE. В результате они стимулируют гиперпродукцию антител и ал-

аллергические реакции. Помимо всего прочего цитокины, выделяемые Тх1-клетками, подавляют активность Тх2-клеток и наоборот. Таким образом, любой иммунный ответ развивается в направлении либо Тх1-, либо Тх2-типа (рис. 39).

### 3.4.2. ЗАЩИТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, НЕЗАВИСИМЫЕ ОТ Т-КЛЕТОК

**Фагоцитоз — важный компонент антимикробной защиты.** Первоначальная защитная реакция на любую инфекцию в значительной степени зависит от распознавания общих для разных микробов компонентов особыми клеточными рецепторами, которые отличаются от антигенспецифических рецепторов Т- и В-клеток.

Многочисленные компоненты микробных клеток способны вызывать хемотаксис фагоцитов в очаг инфекции (рис. 40). Некоторые из этих веществ, например бактериальный эндотоксин, привлекают фагоциты, индуцируя активацию комплемента по альтернативному пути с высвобождением С5а и С3а. Другие обладают собственной прямой хемотаксической активностью. Так,



**Рис. 40. Функции, независимые от Т-клеток: фагоцитоз**

Большинство микроорганизмов выделяет вещества, вызывающие хемотаксис фагоцитов, и поглощаются этими клетками. Последующее уничтожение фагоцитированных микробов не требует дополнительной активации фагоцитов. Этим процессам способствует не зависящая от антител альтернативная активация комплемента

присущие всем бактериям формилпептиды вызывают хемотаксис и, кроме того, непосредственно стимулируют фагоциты, всегда имеющие к ним рецепторы.

Начальная стадия фагоцитоза — это связывание микроба на поверхности фагоцитарной клетки. Связыванию способствует активация комплемента и фиксация на поверхности микробной клетки СЗb, с которым затем взаимодействуют рецепторы CR3 фагоцитов. Аналогичным образом, если предварительно с микробной клеткой связываются антитела, в ее поглощении участвуют затем Fc-рецепторы фагоцитов, тем самым способствуя фагоцитозу.

Микроорганизмы, для которых характерна внутриклеточная локализация в организме-хозяине, обладают особыми возможностями связывания с поверхностью фагоцитов: несмотря на то что поглощение осуществляется обычным путем, последующей активации бактерицидных механизмов не происходит.

**Роль компонентов микробных клеток в выделении цитокинов.** Другой независимый от Т-клеток и антител механизм противомикробной защиты, весьма важный в начальной стадии инфекции, — это выделение цитокинов и хемокинов из макрофагов и прочих клеток. По-видимому, все инвазивные микробы содержат или выделяют молекулы, способные вызывать такой эффект. Среди микробных активаторов высвобождения цитокинов наиболее сильное действие оказывает эндотоксин, или липополисахарид (ЛПС). Сложным образом ЛПС взаимодействует с мембраносвязанными рецепторами на поверхности лейкоцитов и, вероятно, эндотелиальных клеток, в результате чего происходит активация соответствующих эффекторных функций этих клеток (рис. 41). Подобным образом может распознаваться и действовать и ряд других консервативных микробных структур.

Среди цитокинов, выделяемых макрофагами под действием микробных компонентов, особая роль принадлежит ФНО $\alpha$  и ИЛ-12. Высвобождаемые на ранней фазе иммунного ответа, эти и другие медиаторы выполняют три следующие фундаментальные функции (рис. 42):

служат сигналами для эндотелиальных клеток, начинающих в результате их получения привлекать лейкоциты из кровотока;

активируют фагоцитарные клетки в тканях, обеспечивая тем самым «врожденную резистентность» в тот период, когда еще только развивается Т-клеточный иммунитет;

служат одним из сигналов, предопределяющих тип Т-клеточного иммунного ответа — Тх1 или Тх2.

Цитокины необходимы для привлечения лейкоцитов из кровотока. Последовательные стадии привлечения лейкоцитов из кровотока представлены на рис. 43. Вначале цитокины вызывают экспрессию на эндотелиальных клетках молекул адгезии, благодаря которой лейкоциты слегка прилипают к поверхности эндотелия и на-



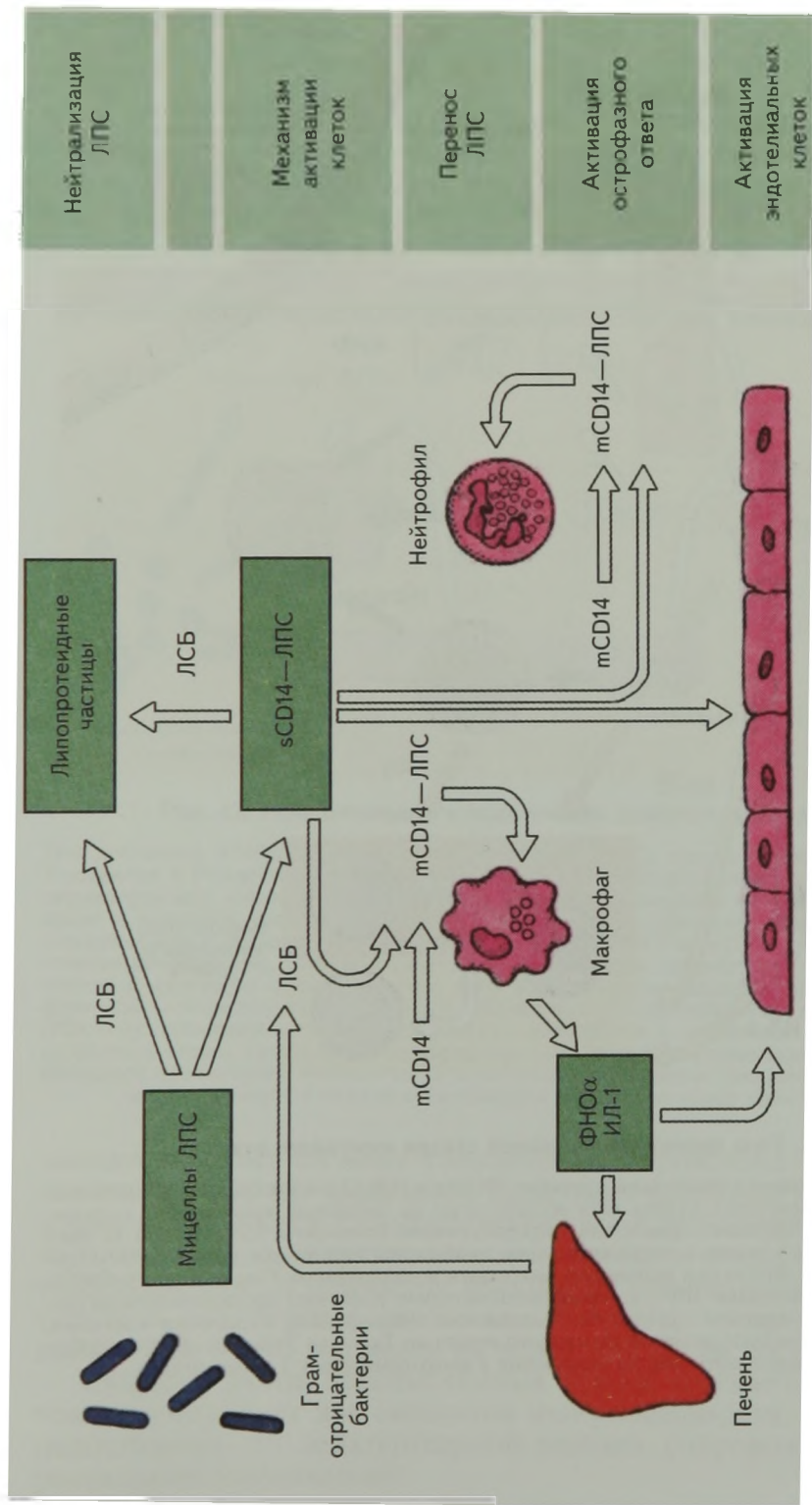
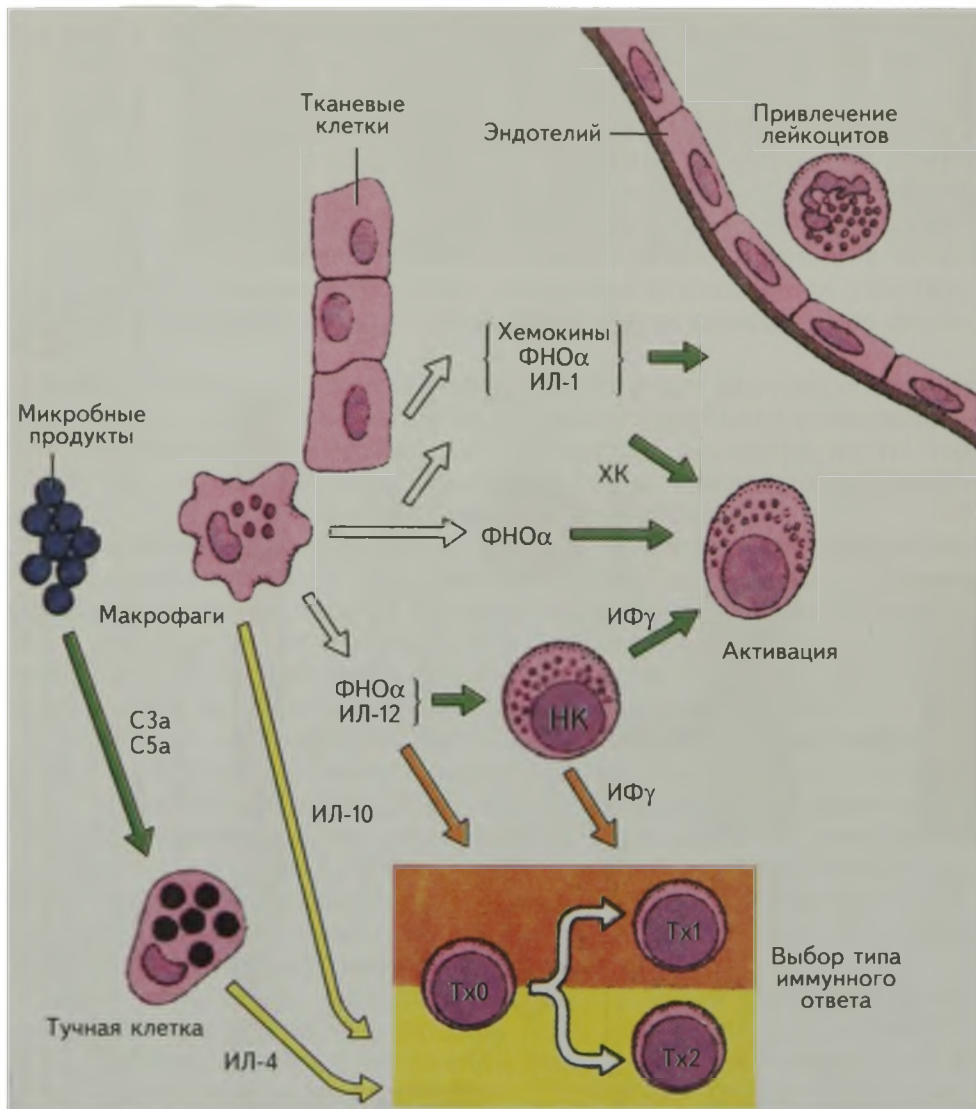


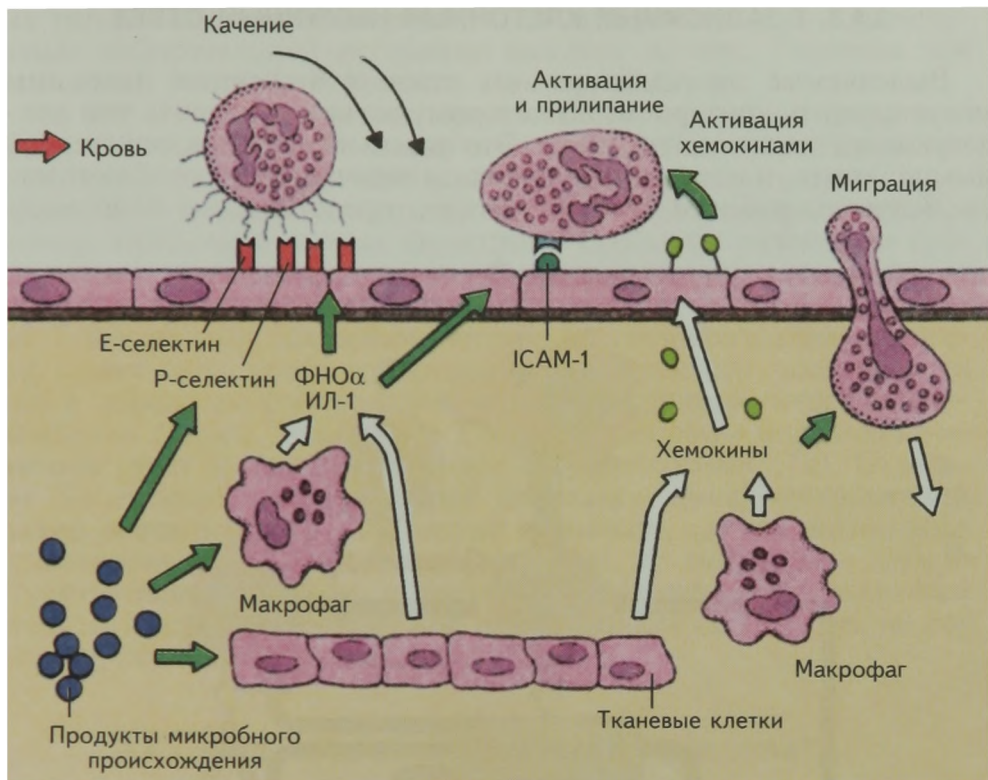
Рис. 41. Эффекты ЛПС.

Липополисахарид (ЛПС) — компонент наружной мембраны грамотрицательных бактерий — связывается в плазме крови с растворимым маркером CD14 (sCD14) и липопротеидными частицами. Катализатором этого взаимодействия служит липидпереносящий белок, названный ЛПС-связывающим (ЛСБ). Связывание липопротеидной частицей приводит к нейтрализации ЛПС, связывание же sCD14 вызывает клеточную активацию, поскольку CD14 присутствует в организме также и в форме GPI-связанного мембранного белка (mCD14) нейтрофилов и макрофагов, и ЛПС из комплекса с растворимым CD14 переходит в комплексе с его мембраносвязанной формой. Комплекс mCD14-ЛПС, ассоциируя с другими мембраносвязанными факторами, передает внутрь клетки сигналы, повышающие экспрессию интернов (молекул межклеточной адгезии) и выделение ФНО $\alpha$  и ИЛ-1. В свою очередь, эти цитокины активируют эндотелиальные клетки и вызывают острого ответ в печени. Один из продуктов острого ответа — это ЛСБ.



**Рис. 42. Роль цитокинов на ранней стадии иммунного ответа.**

Выделяемые макрофагами и тканевыми клетками ФНО $\alpha$  и ИЛ-12 имеют существенное значение в ранней фазе иммунного ответа. Они воздействуют на эндотелий кровеносных сосудов, который после этого начинает привлекать циркулирующие лейкоциты. Следующую за этим миграцию лейкоцитов в ткани, а также активацию прибывших туда клеток вызывают хемокины (ХК). Кроме того, ФНО $\alpha$  сам активирует макрофаги и нейтрофилы. Под действием ФНО $\alpha$  и ИЛ-12 НК-клетки выделяют ИФ $\gamma$ , который дополнительно усиливает бактерицидную активность фагоцитов. И, наконец, цитокины, выделяемые макрофагами и другими клетками, включая тучные, направляют развитие иммунного ответа по Th1- или Th2-типу. Все эти события могут происходить еще до включения в иммунный ответ Т-лимфоцитов



**Рис. 43. Роль цитокинов в привлечении лейкоцитов из кровотока.**

Под действием ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 и липополисахарида (ЛПС) клетки эндотелия экспрессируют Е-селектин и Р-селектин, которые связываются с олигосахаридными цепями на поверхности циркулирующих лейкоцитов. В результате лейкоциты замедляют свое продвижение с током крови и начинают «катиться» по поверхности эндотелия. Цитокины повышают также экспрессию ICAM-1. Хемокины, в том числе MCP-1, RANTES и MIP-1 $\alpha$ , выделяемые соответственно макрофагами, тканевыми клетками и эндотелием, оседают на поверхности эндотелиоцитов и, активируя прикрепившиеся здесь же лейкоциты, усиливают функциональную аффинность лейкоцитарных интегринов. Интегрины взаимодействуют со своим лигандом (ICAM-1), дополнительно усиливая адгезию лейкоцитов к эндотелию. В итоге лейкоциты мигрируют сквозь эндотелий и перемещаются по градиентам хемотаксических медиаторов. Механизм привлечения лейкоцитов из кровотока, а также набор экспрессируемых ими адгезивных молекул у каждой субпопуляции лейкоцитов имеет свои особенности

чинают катиться по нему в направлении кровотока. На следующей стадии происходит выделение тканевыми клетками хемокинов, которые связываются с эндотелиоцитами и активируют экспрессию ими интегринов, запуская тем самым механизм усиления лейкоцитарной адгезии. В результате лейкоциты прочно прилипают к эндотелию и прекращают движение. Последняя стадия привлечения лейкоцитов — это миграция их через эндотелий сосудов в ткань.

Существование перечисленных стадий привлечения лейкоцитов иллюстрирует два синдрома иммунодефицита. Оба синдрома недостаточности лейкоцитарной адгезии сопровождаются бактериальными инфекциями.



### 3.4.3. Т-ЗАВИСИМЫЙ КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ

Выделяемые на самых ранних стадиях инфекции цитокины могут служить критерием, по которому легко определить тип последующего иммунного ответа. Это важный аспект клинической иммунологии, и в настоящее время он интенсивно разрабатывается. Такие разработки требуют четкого представления о возмож-

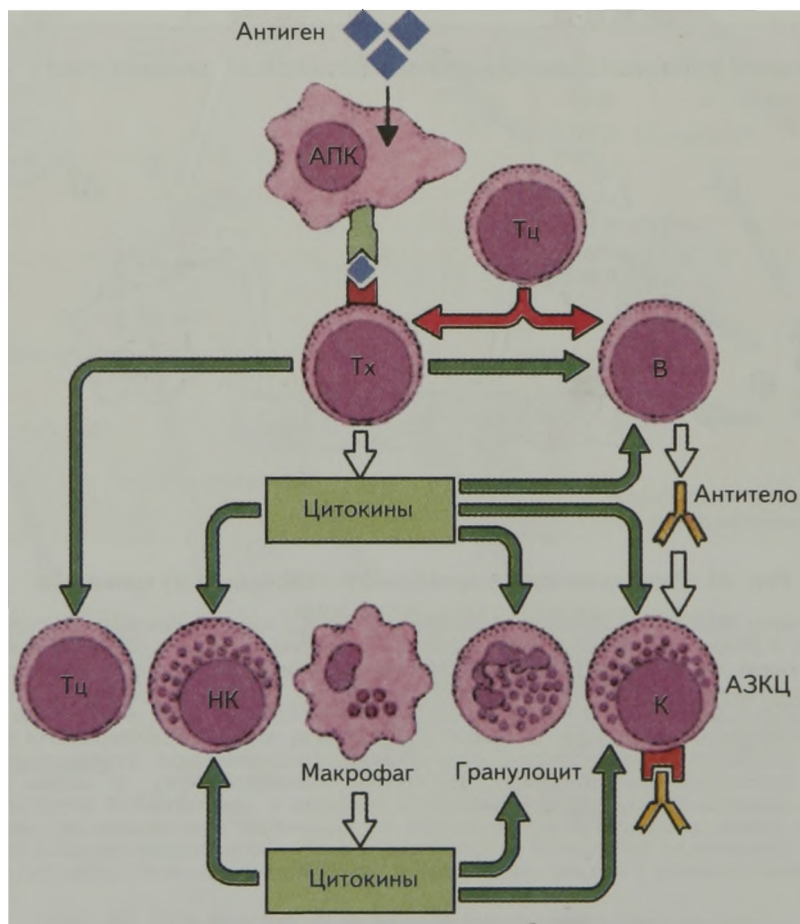


Рис. 44. Центральная роль Т-клеток в клеточном иммунитете.

Антигенпрезентирующие клетки (АПК) представляют процессированный антиген Т-хелперным (Тх) клеткам, которым принадлежит центральная роль в развитии иммунного ответа. Распознавая определенные эпитопы антигена, эти клетки тем самым выбирают его в качестве своей мишени. Затем Тх-клетки «выбирают» и активируют соответствующие эффекторные механизмы иммунного ответа; кроме того, они могут оказывать помощь В-клеткам в образовании антител и активировать или подавлять функции других эффекторных клеток, к которым относятся цитотоксические Т-клетки (Тц), нормальные киллерные клетки (НК-клетки), макрофаги, гранулоциты и зависимые от антител цитотоксические (К) клетки. Эффекты Тх-клеток во многих случаях опосредованы их собственными цитокинами, но не прямое воздействие Тх-клеток через другие клетки, в частности макрофаги и их цитокины, также имеет значение. Как Т-, так и В-клетки, в свою очередь, находятся под контролем «супрессорных» (Тс), или регуляторных, клеток

ных типах опосредованного клетками иммунного ответа и механизмах избирательной активации каждого из них. Понимая эти механизмы, можно регулировать иммунный ответ.

На рис. 44 схематически представлены основные функциональные взаимодействия между клетками, осуществляющими реакции клеточного иммунитета, и центральная роль в этом Т-хелперов CD4<sup>+</sup> (Следует отметить, что отдельные клетки могут выполнять несколько разных функций.) Тх-клетки различных субпопуляций, выделяя тот или иной набор цитокинов, по-разному влияют на многообразные виды клеточной кооперации. Активация Т-клеток при повторной встрече со специфическим антигеном может быть причиной гиперчувствительности замедленного типа с образованием гранулем или иммунопатологического повреждения тканей. Некоторые Т-клетки способны подавлять иммунный ответ и поэтому названы Т-супрессорами (Тс). Отдельные Тс выделяют регуляторный цитокин — трансформирующий фактор роста β (ТФРβ), и, вполне возможно, служат истинными «супрессорными» Т-клетками; остальные же могут быть просто регуляторными клетками, которые не подавляют, а переключают иммунный ответ с наблюдаемой в опыте формы на другую, не регистрируемую экспериментатором.

#### 3.4.4. РОЛЬ МАКРОФАГОВ В ИММУННОМ ОТВЕТЕ

Макрофаги принимают участие в иммунном ответе на всех его этапах (рис. 45). Во-первых, как уже было отмечено, они осуществляют немедленную защитную реакцию до тех пор, пока не произойдет усиление иммунного ответа, регулируемое антигенспецифическими Т-клетками. Во-вторых, они вызывают активацию Т-клеток, осуществляя процессинг и презентацию им антигена. И, наконец, активированные, в свою очередь, Т-клетками, они выполняют важные функции в эффекторных механизмах клеточного иммунитета, вызывая воспаление и уничтожая микроорганизмы, а также опухолевые клетки (рис. 46).

Цитокины усиливают некоторые функции макрофагов. Циркулирующие моноциты способны уничтожать некоторые микроорганизмы. При культивировании *in vitro* они в значительной степени теряют эту активность, но под действием добавленных цитокинов, в частности ИФγ, она восстанавливается и параллельно происходит активация дополнительных механизмов антимикробного действия, которые в норме не экспрессируются моноцитами. Такая «активация» цитокинами необходима макрофагам *in vitro* для разрушения многих внутриклеточных паразитов и некоторых опухолевых клеток. Классический эксперимент, демонстрирующий этот феномен, был проведен на животных, иммунизированных БЦЖ (BCG, сокращ. франц. bacillus Calmette—Guerin — «бацил-



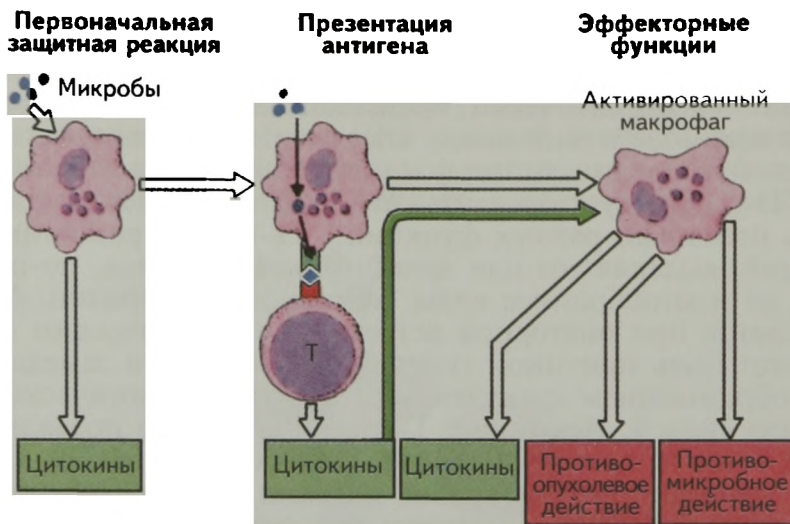


Рис. 45. Центральная роль макрофага в иммунной системе.

Макрофаги осуществляют защитную реакцию организма в ранней стадии ответа на инфекцию, до вступления в действие специфических механизмов иммунитета зависимых от Т- и В-клеток. Позже функция макрофагов сводится к переработке (процессингу) и представлению (презентации) антигена. Наконец, в эффекторной стадии иммунного ответа распознавшие антиген Т-клетки выделяют цитокины, активирующие макрофаги

ла» Кальметта—Герена; препарат авирулентных микобактерий — возбудителей туберкулеза бычьего типа).

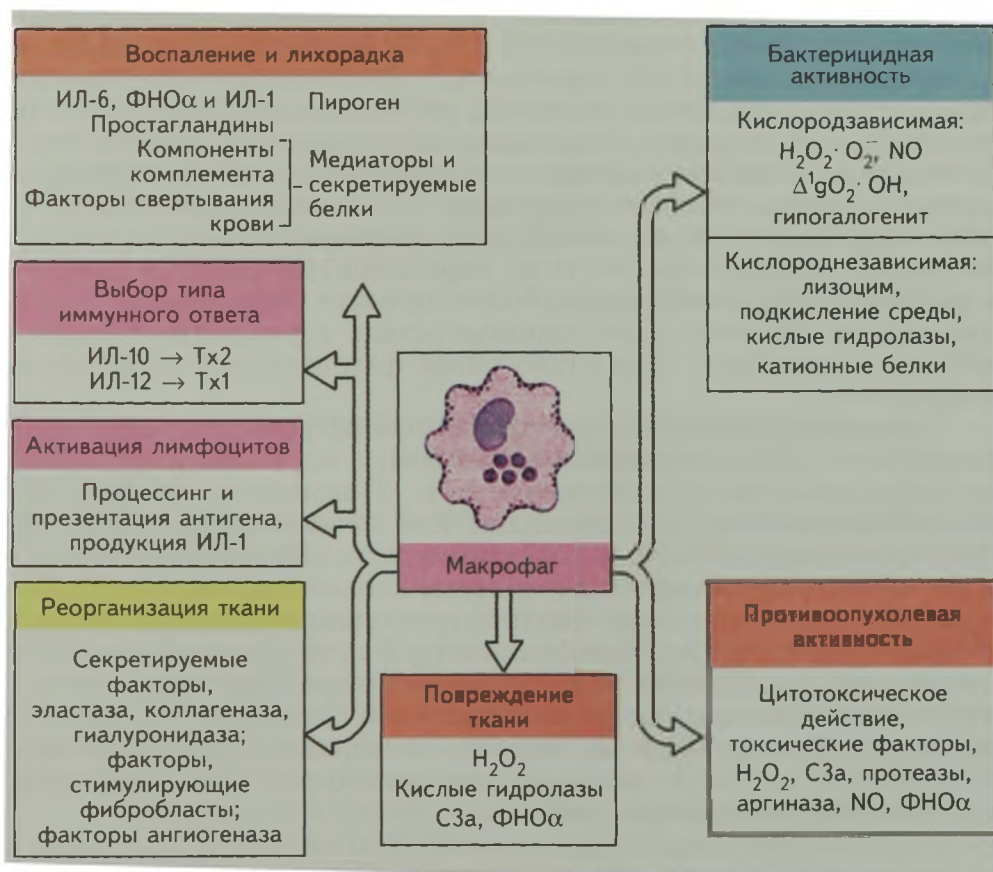
Введение им очищенных белков туберкулина, т. е. смеси антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, стимулирующих Т-клетки, вызывает помимо стимуляции противотуберкулезного иммунитета резистентность и к другому патогенному микроорганизму — *Listeria monocytogenes*. При анализе этого эффекта выяснилось, что стимуляция макрофагов происходит по антигенспецифическому механизму, но приводит к усилению их неспецифической бактерицидной активности. Как показали дальнейшие исследования, лимфоциты мышей, иммунизированных БЦЖ, при культивировании *in vitro* в присутствии соответствующего антигена (например, очищенного туберкулина) выделяют в среду цитокины, усиливающие способность макрофагов сдерживать размножение или уничтожать как микобактерии, так и другие микробы.

Макрофаги весьма разнообразны по характеру присущих им свойств. Активность макрофагов — это сложный феномен. Активированные фагоцитарные клетки приобретают повышенную способность уничтожать одни микроорганизмы, не затрагивая другие. Например, очищенный ИФγ стимулирует бактерицидную активность моноцитов человека в отношении *Legionella*, но при этом усиливает рост *Mycobacterium tuberculosis*. Такой неоднозначный характер эффекта обусловлен несколькими причинами:

множественностью эффекторных функций, выполняемых активированными макрофагами (см. рис. 46);

большим разнообразием моноцитов и макрофагов по характеру присущих им свойств; в зависимости от ткани и органа они различаются по экспрессии молекул МНС класса II и Fc-рецепторов, профилю выделяемых цитокинов и продукции пероксидазы. Тем не менее большинство исследователей считают, что все макрофаги принадлежат к одной клеточной линии, а наблюдаемые различия обусловлены последовательными стадиями их созревания и влиянием тканевого микроокружения;

кроме того, активация тех или иных функций может зависеть не только от природы макрофагов, но и от конкретного «спектра» цитокинов и других провоспалительных стимулов.



**Рис. 46. Центральная роль макрофагов в иммунитете и воспалении.**

Макрофаги и их продукты имеют существенное значение в индуктивной стадии воспаления, а также в реорганизации и поствоспалительной репарации ткани (левая часть схемы). Эффекторные функции макрофагов перечислены в правой части схемы. В результате их осуществления может произойти повреждение ткани, как, например, при реакциях гиперчувствительности замедленного типа

Предположительно активация макрофагов происходит в несколько этапов, под влиянием следующих один за другим стимулов, которыми могут служить цитокины, эндотоксин, различные медиаторы и регуляторные факторы воспаления. На каждом этапе активации макрофаги способны к осуществлению различных эффекторных функций и обладают характерными особенностями морфологии и физиологии.

В некоторых случаях для стимуляции определенной функциональной активности макрофагов требуется несколько сигналов. Например, чтобы вызвать наибольшую продукцию оксида азота NO, токсичного для бактерий и опухолевых клеток, макрофаги мыши необходимо стимулировать сначала ИФγ, а затем ФНОα. На макрофагах человека данный эффект получить гораздо труднее. В большинстве случаев для этого требуется серия стимулов, например, воздействие несколькими цитокинами с одновременной перекрестной сшивкой FcεRII (CD23). Макрофаги человека, выделенные из воспалительного очага, иногда экспрессируют индуцибельную синтазу оксида азота, но необходимый для его синтеза кофактор тетрагидробиоптерин они содержат в низкой концентрации. Поскольку оксид азота выполняет многочисленные сигнальные функции, не связанные с его токсическим действием, можно предполагать, что токсикантом служит не само это соединение азота, а преимущественно пероксинитриты, образующиеся в результате взаимодействия NO с продуктами восстановления кислорода. Обычно такое взаимодействие происходит только в очагах воспаления и при стимуляции фагоцитарной активности макрофагов.

Существует отрицательная регуляция эффекторных функций макрофагов. Как установлено, макрофаги могут быть не только активированы, но и дезактивированы. Подавление их функций способны вызывать простагландин E и отчасти (не по всем эффекторным механизмам), глюкокортикоиды. Недавно из среды, в которой культивировались опухолевые клетки, был выделен и получен в очищенном виде фактор, дезактивирующий макрофаги (MDF, от англ. macrophage deactivating factor), который способен отменить вызванное ИФγ увеличение образования высокоактивных метаболитов кислорода и в некоторой степени NO. Таким же эффектом обладают ИЛ-4 и пептид, связанный с геном кальцитонина (CGRP, от англ. calcitonin-gene-related peptide), а также семейство ТФРβ-подобных цитокинов.

### 3.4.5. ОБРАЗОВАНИЕ ГРАНУЛЕМ

Иногда клеточный иммунитет не обеспечивает устранения проникших в ткани микробов либо антигенный материал не элиминируется из-за того, что устойчив к ферментативному расщеп-

лению или просто относится к собственным компонентам организма. Если при этом Т-клетки продолжают накапливаться и выделять цитокины, образуется гранулема. Появление в тканях гранулем характерно для инфекций, возбудители которых локализируются, хотя бы отчасти, внутриклеточно (например, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Leishmania* spp. и *Listeria monocytogenes*), либо по размерам крупнее макрофагов, либо проявляют тенденцию персистировать в тканях (например, яйца шистосом).

Как правило, гранулемы содержат клетки — производные макрофагов, в том числе эпителиоидные и гигантские многоядерные клетки; функции этих клеток еще неполностью известны. По морфологии эти компоненты гранулем скорее относятся к секреторным, а не к фагоцитарным клеткам, и появляются, по-видимому, в результате хронической стимуляции макрофагов цитокинами.

Входящие в состав гранулем Тх-клетки CD4<sup>+</sup> располагаются в центре этих образований, а Т-клетки CD8<sup>+</sup> на их периферии. Это позволяет предполагать, что Т-клетки CD4<sup>+</sup> выполняют решающую роль в привлечении и активации других лимфоцитов и макрофагов. При культивировании гранулематозной ткани *in vitro* обнаружено выделение ею в среду различных цитокинов. Для максимального развития гранулем, по-видимому, требуются выделяемые Тх1-клетками цитокины и ФНО $\alpha$ , в случае мышинного шистосомоза для этого необходимы также цитокины, выделяемые Тх2-клетками.

#### 3.4.6. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОК ПРИ ГУМОРАЛЬНОМ ИММУННОМ ОТВЕТЕ

- Иммуноактивация, необходимая для синтеза антител, включает взаимодействие между Т-клетками и АПК и затем между этими примированными Т-клетками и В-клетками.

- Активация клеток осуществляется путем антигенспецифического взаимодействия с участием молекул клеточной адгезии и цитокинов. Наиболее сильным костимулирующим сигналом служит молекула В7 (CD80 или CD86). В отсутствие соответствующей костимуляции распознавание антигена может привести к развитию клональной анергии.

- Пролиферация лимфоцитов происходит опосредованно, т. е. зависит от индукции рецепторов для факторов роста лимфоцитов, которую вызывает активация. Факторы роста лимфоцитов (например ИЛ-2) синтезируются главным образом Т-клетками.

- Существуют два типа антигенов, вызывающих гуморальный иммунный ответ — Т-зависимые и Т-независимые. Т-зависимые антигены индуцируют вторичный иммунный ответ, характеризующийся образованием IgG и повышением аффинности антител.



- Для первичного иммунного ответа на Т-зависимые антигены характерно образование низкоаффинных IgM-антител. При вторичном иммунном ответе продуцируется большее количество антител и происходит переключение изотипов с образованием IgG, IgA и IgE. Одновременно с этим возрастает аффинность антител.
- Переключение изотипа и повышение (созревание) аффинности антител происходят в центрах размножения внутри вторичных лимфоидных тканей.

Гуморальный иммунный ответ (образование антител) представляет собой кульминацию ряда клеточных и молекулярных взаимодействий, происходящих в строгой последовательности:

Т-лимфоциты распознают антиген, представленный им антигенпрезентирующими клетками (АПК), и в результате переходят в активированное состояние;

Тх-клетки взаимодействуют с В-лимфоцитами, которые презентуют им антигенные фрагменты;

активированные В-лимфоциты пролиферируют и дифференцируются в антителообразующие клетки;

начинается синтез антител, и от их класса зависит характер последующего иммунного ответа.

**Презентация антигена Т-клетками.** Процессинг антигена. В пионерских исследованиях Эйде и Носсела было установлено, что лишь очень небольшая доля молекул (< 1 %) введенного антигена принимает участие в индукции иммунного ответа, а основное его количество быстро разрушается и выводится из организма. Эти данные позволяют предполагать, что презентация антигена является этапом, лимитирующим скорость иммунной реакции.

Проникшие в организм антигены подвергаются внутриклеточному процессингу — расщеплению на пептидные фрагменты, которые затем связываются с молекулами МНС класса I или II. Эти фрагменты определяют антигенспецифическую активацию Т-клеток: рецепторы Т-клеток распознают аминокислотные последовательности этих фрагментов, связываемых в полости молекул МНС (в отличие от этого антитела распознают конформационные детерминанты).

Взаимодействие с антигенпрезентирующими клетками. Этот процесс крайне важен для активации Т-лимфоцитов. Взаимодействие между Т-лимфоцитами и клетками, составляющими гетерогенную группу так называемых антигенпрезентирующих клеток, — это наиболее детально изученный пример клеточной кооперации в иммунной системе. Взаимодействие Т-клеток и АПК после введения антигена открывает всю последовательность дальнейших событий и в основном определяет их конечный результат: если активируется достаточное число хелперных Т-клеток (Тх) CD4<sup>+</sup>, то почти всегда происходит активация В-лимфоцитов или развитие реакций клеточного иммунитета; если же стимуляция Тх-клеток отсутствует, может возникнуть та или иная форма имму-



нологической толерантности, при которой дальнейшие иммунные реакции не развиваются.

**Типы АПК.** Существуют различные типы АПК. Презентировать антигены могут самые разнообразные клетки в зависимости от того, как и где происходит первичное взаимодействие антигена с иммунной системой. Наиболее эффективно начальную активацию покоящихся Т-клеток CD4<sup>+</sup> обеспечивают интердигитатные дендритные клетки (ИДК), присутствующие в изобилии в Т-клеточных зонах лимфатических узлов и селезенки. Для ИДК характерен высокий уровень экспрессии МНС-антигенов класса II, которые взаимодействуют с Т-клеточным рецептором (ТкР) и молекулой CD4 на поверхности Тх CD4<sup>+</sup>. Однако макрофаги и В-клетки также могут экспрессировать МНС-антигены класса II, поэтому объяснить большую эффективность ИДК в презентации антигенов только этим свойством невозможно.

Как предполагается, интердигитальные клетки — это главный тип антигенпрезентирующих клеток, действующих при первичном иммунном ответе, поскольку они индуцируют пролиферацию Т-клеток эффективнее АПК всех других типов.

Именно клеточная пролиферация служит ключевым этапом в развитии иммунного ответа, обеспечивая увеличение числа антигенспецифических Т-клеток, однако это лишь одна сторона эффективной активации Т-лимфоцитов. Способностью индуцировать и пролиферацию, и хелперную функцию Т-клеток обладают также моноциты крови (наиболее изученные АПК у человека).

В качестве АПК могут действовать и В-лимфоциты — они способны связывать, интернализировать и расщеплять специфический антиген на пептиды, которые образуют комплекс с молекулами МНС класса II. При очень низкой концентрации антигена В-лимфоциты с высокоаффинными антигенными рецепторами (IgM или IgD) служат наиболее эффективными АПК, поскольку АПК других типов просто не могут захватить достаточное для презентации количество антигенного материала. При вторичном иммунном ответе (протекающем с участием большого числа антигенспецифических В-клеток) В-клетки могут стать главным типом АПК. Свойства и функции АПК представлены в таблице 2.

## 2. Антигенпрезентирующие клетки

Тип клеток	Фагоцитоз	Тип клеток	Локализация	Экспрессия молекул МНС класса II
Фагоциты (моноциты/макрофаги)	+	Моноциты	Кровь	—
	+	Макрофаги	Ткань	—
	+	Макрофаги краевой зоны	Селезенка и лимфатические узлы	(-) → + + +
	+	Клетки Купфера	Печень	Индукцибельная —

Тип клеток	Фагоцитоз	Тип клеток	Локализация	Экспрессия молекул МНС класса II
	+	Клетки микроглии	Головной мозг	—
Нефагоцитарные конститутивные АПК	—	Клетки Лангерганса	Кожа	++
	—	Интердигитатные дендритные клетки (ИДК)	Лимфоидная ткань	Конститутивная
	—	Фолликулярные дендритные клетки	То же	—
Лимфоциты	—	В-клетки и Т-клетки	Лимфоидные ткани и фазы иммунной реакции	— → ++ Индукцибельная
Факультативные АПК	+	Астроциты	Головной мозг	Индукцибельная
	+	Фолликулярные клетки	Щитовидная железа	Индукцибельная
	—	Эндотелий	Сосуды и лимфоидная ткань	— → +++
	—	Фибробласты	Соединительная ткань	Индукцибельная —

Примечание. Многие АПК не способны фагоцитировать антиген, однако могут поглощать его другими способами, например путем пиноцитоза. Эндотелиальные клетки, которые обычно не рассматриваются как АПК, под действием ИФУ экспрессируют молекулы класса II и могут презентировать антигены, как и некоторые эпителиальные клетки.

«+» — клетки обладают антигенпрезентирующими свойствами и способны экспрессировать молекулы МНС класса II;

«—» — клетки такими свойствами не обладают.

Презентацию антигена Т-клеткам обеспечивает взаимодействие множества молекул клеточной поверхности. Т-клеточный рецептор (ТкР) — димер, состоящий из  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи, — распознает специфический пептид, находящийся в пептидсвязывающей полости молекулы МНС. Это связывание является определяющим для иммунологической специфичности, так как пептид, ассоциированный с МНС-молекулой определенного гаплотипа, образует уникальную структуру, распознаваемую ТкР. Однако в презентации участвуют и другие молекулы. Доказательство этого получено в экспериментах с трансфекцией комплементарной ДНК (кДНК), кодирующей молекулы МНС человека, в мышинные фибробласты. Клетки мыши, экспрессируя молекулы МНС человека, приобретали способность функционировать как АПК человека, но менее эффективно по сравнению с клетками, которые экспрессировали также и другие связанные с презентацией молекулы. Одной из таких молекул служит молекула 1 межклеточной адгезии (ICAM-1, от англ.

intercellular adhesion molecule-1), взаимодействующая с функциональным антигеном 1 лимфоцитов (LFA-1, от англ. lymphocyte functional antigen-1), имеющимся у всех клеток иммунной системы.

### 3.5. ВОСПАЛЕНИЕ

Воспаление — это реакция организма на внедрение инфицирующего агента, введение антигена или физическое повреждение тканей. Помимо усиления клеточной миграции, описанного выше, воспаление вызывает приток различных растворимых молекул из плазмы крови. В противоположность лейкоцитам, которые мигрируют через эндотелий венул, молекулы плазмы крови попадают в воспалительный экссудат главным образом из капилляров, где кровяное давление выше. Этот процесс обеспечивается двумя механизмами: усилением кровенаполнения капилляров в области воспаления и увеличением проницаемости капилляров.

Проницаемость капилляров повышается вследствие втягивания (ретракции) клеток эндотелия и, возможно, также усиления транспорта везикул сквозь эндотелий. Это обеспечивает поступление в очаг воспаления более крупных молекул, чем те, которые обычно могут проникать сквозь эпителий. Таким образом в очаг воспаления поступают антитела, компоненты комплемента и другие ферментные системы плазмы крови.

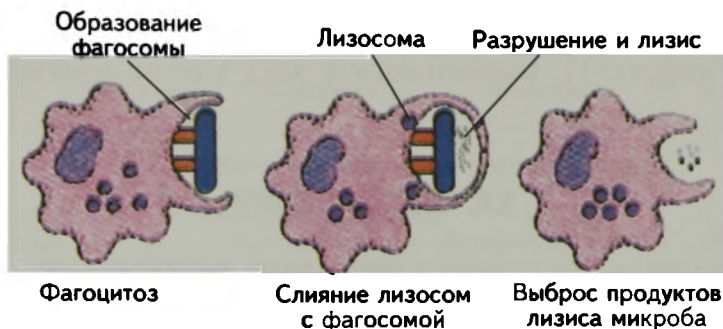
Клетки иммунной системы в норме рассеяны по всем тканям тела, но если возникает очаг инфекции, эти клетки и их продукты выделения концентрируются именно в нем. Обеспечивающий это процесс называют *воспалительной реакцией*. Для воспаления характерны три основных проявления:

увеличивается кровоснабжение инфицированной области;

благодаря сокращению эпителиальных клеток возрастает проницаемость кровеносных капилляров; за счет этого из капилляров выходят крупные молекулы и таким образом растворимые медиаторы иммунитета достигают очага инфекции;

лейкоциты мигрируют из венул в окружающие ткани. В самом раннем периоде воспаления в очаге инфекции больше всего нейтрофилов, но позднее к нему мигрируют также моноциты и лимфоциты.

**Хемотаксис и миграция клеток.** Ключевой момент миграции клеток — это их прилипание (распластывание, адгезия) к сосудистому эндотелию воспаленных тканей в результате взаимодействия особых молекул на поверхности лейкоцитов и активированных эндотелиальных клеток. Проникнув в ткани, клетки мигрируют в направлении очага инфекции под влиянием химического притяжения, называемого хемотаксисом.



**Рис. 47. Фагоцитоз.**

Фагоциты поступают в очаг воспаления благодаря хемотаксису. Затем их поверхностные неспецифические рецепторы связываются с микробами, либо, если микробная поверхность опсонизирована фрагментом третьего компонента комплемента (С3b и/или антителами), связывание происходит с участием фагоцитарных рецепторов для С3b и/или Fc. Когда в результате связывания фагоцит активируется, он окружает инфекционный агент псевдоподиями, заключая в фагосому; при этом происходит образование бактерицидных метаболитов кислорода. Как только микроб поступит внутрь клетки, лизосомы сливаются с фагосомой, образуя фаголизосому, в которой инфекционный агент уничтожается. Остатки микроба могут быть выделены клеткой наружу.

Фагоцитам свойственно активно мигрировать по градиенту концентрации определенных (хемотаксических) соединений. Особенно сильный хемотаксис вызывается фрагментом одного из компонентов комплемента, С5a (см. рис. 13), привлекающего нейтрофилы и моноциты. При нанесении на кожу *in vivo* препарата очищенного С5a можно вскоре наблюдать прилипание нейтрофилов к эндотелию расположенных вблизи венул. Проскальзывая затем между эндотелиальными клетками, нейтрофилы проникают через базальную мембрану венул в ткани. Связавшись с опсонированным микробом, фагоцитарная клетка поглощает его (рис. 47).

Воспаление регулируется хемокинами, ферментными системами плазмы, цитокинами, а также продуктами метаболизма тучных клеток, тромбоцитов и лейкоцитов. Развитие воспалительного процесса происходит при участии: 1) хемокинов, 2) продуктов активации ферментных систем плазмы и 3) вазоактивных медиаторов, выделяемых лейкоцитами (тучная клетка, базофил — гистамин; базофилы, нейтрофилы, макрофаги — фактор активации тромбоцитов; моноциты и лимфоциты — ИЛ-8). Воспалительные реакции разного типа регулируются различными медиаторами. Немедленный ответ зависит от быстродействующих вазоактивных аминов и продуктов кининовой системы. Позднее привлечение и активация лейкоцитов происходят под действием вновь синтезированных медиаторов, таких как лейкотриены.

Достигая очага инфекции или воспаления, лейкоциты ранней волны миграции выделяют медиаторы, которые обеспечивают

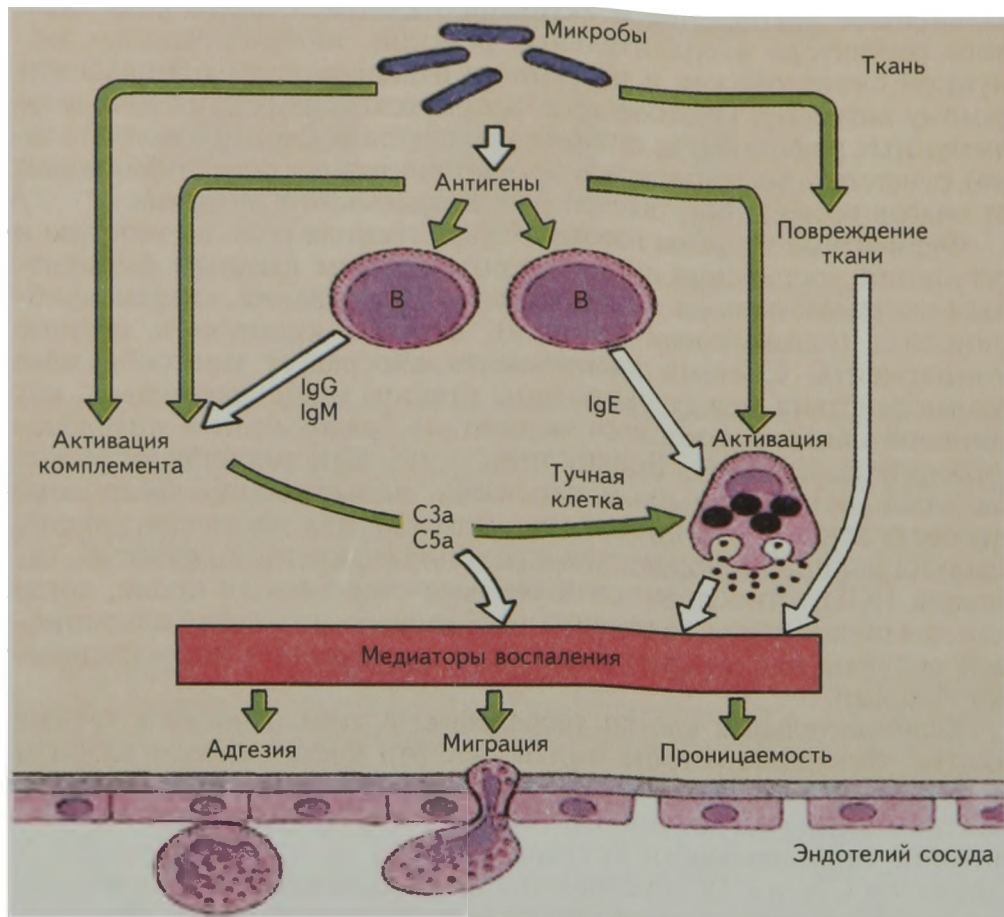
дальнейшее накопление и активацию клеток. Однако роль главного регулятора воспалительных реакций, инициированных иммунной системой, как и иммунного ответа вообще, принадлежит самому антигену. Поэтому очаг хронической инфекции или аутоиммунных реакций (где антиген не удастся устранить окончательно) существенно отличается по клеточному составу инфильтрата от очагов воспаления, быстро освобождаемых от антигена.

**Ферментные системы плазмы.** Существенная роль в гемостазе и регуляции воспаления принадлежит четырем главным ферментным системам плазмы крови: системе свертывания, системе фибринолиза (плазминовая система), системе кининов и системе комплемента. Система комплемента опосредует многообразные взаимодействия между иммунным ответом и воспалением. К кининовой системе относятся медиаторы брадикинин и лизилбрадикинин (каллидин). Брадикинин — это функционально весьма сильный вазоактивный нонапептид, вызывающий увеличение просвета венул и сосудистой проницаемости, а также сокращение гладких мышц. Он образуется в результате активации фактора Хагемана (XII), относящегося к системе свертывания крови, тогда как для образования каллидина необходимы активация плазминовой системы или участие ферментов, выделяемых поврежденными тканями.

**Вспомогательные клетки воспаления.** К ним относятся тучные клетки, базофилы и тромбоциты; все эти клетки служат важным источником вазоактивных медиаторов — гистамина и 5-гидроксиทริปтамина (серотонина), вызывающих вазодилатацию и увеличение проницаемости сосудов. Многие из провоспалительных эффектов C3a и C5a обусловлены их способностью вызывать высвобождение содержимого гранул из тучных клеток. Об этом свидетельствует факт подавления данных эффектов антигистаминными препаратами. Кроме того, тучные клетки и базофилы могут стать непосредственной причиной воспаления, вызванного специфическим иммунным ответом, так как IgE сенсibiliзирует их для дегрануляции при встрече с антигеном. Взаимодействие между механизмами приобретенного иммунитета и воспаления схематично представлено на рис. 48. Тучные клетки служат также важным источником медленно реагирующих медиаторов воспаления, в том числе лейкотриенов, простагландинов и тромбоксанов. Тромбоциты, как и тучные клетки, могут быть активированы продуктами иммунной системы — иммунными комплексами или фактором активации тромбоцитов, выделяемым нейтрофилами, базофилами и макрофагами. Предполагается, что этот механизм важен в реакциях гиперчувствительности II и III типов.

**Цитокины.** Подобно другим медиаторам цитокины служат для межклеточной сигнализации при развитии воспалительного процесса. На его начальных стадиях местные тканевые клетки могут выделять такие цитокины, как ИЛ-1 и ИЛ-6. Как только в очаге





**Рис. 48. Иммунный ответ на острое воспаление.**

Приобретенный иммунитет влияет на воспалительные процессы через систему комплемента. Антигены (например, микробного происхождения) стимулируют В-клетки для продукции антител, в том числе IgE, связывающихся с тучными клетками, а также IgG и IgM, активирующих комплемент. Кроме того, комплемент может активироваться и без участия антител (в частности, микробами) по альтернативному пути. Сенсибилизированные антителами тучные клетки, встретившись с антигеном, выделяют из своих гранул медиаторы и эйкозаноиды (продукты метаболизма арахидоновой кислоты, такие как простагландины и лейкотриены). Вместе с комплементом (который непосредственно своими субкомпонентами C3a и C5a может вызывать дегрануляцию тучных клеток) эти медиаторы индуцируют ограниченный очаг воспаления, способствуя накоплению в нем лейкоцитов и продуктов активации ферментных систем плазмы

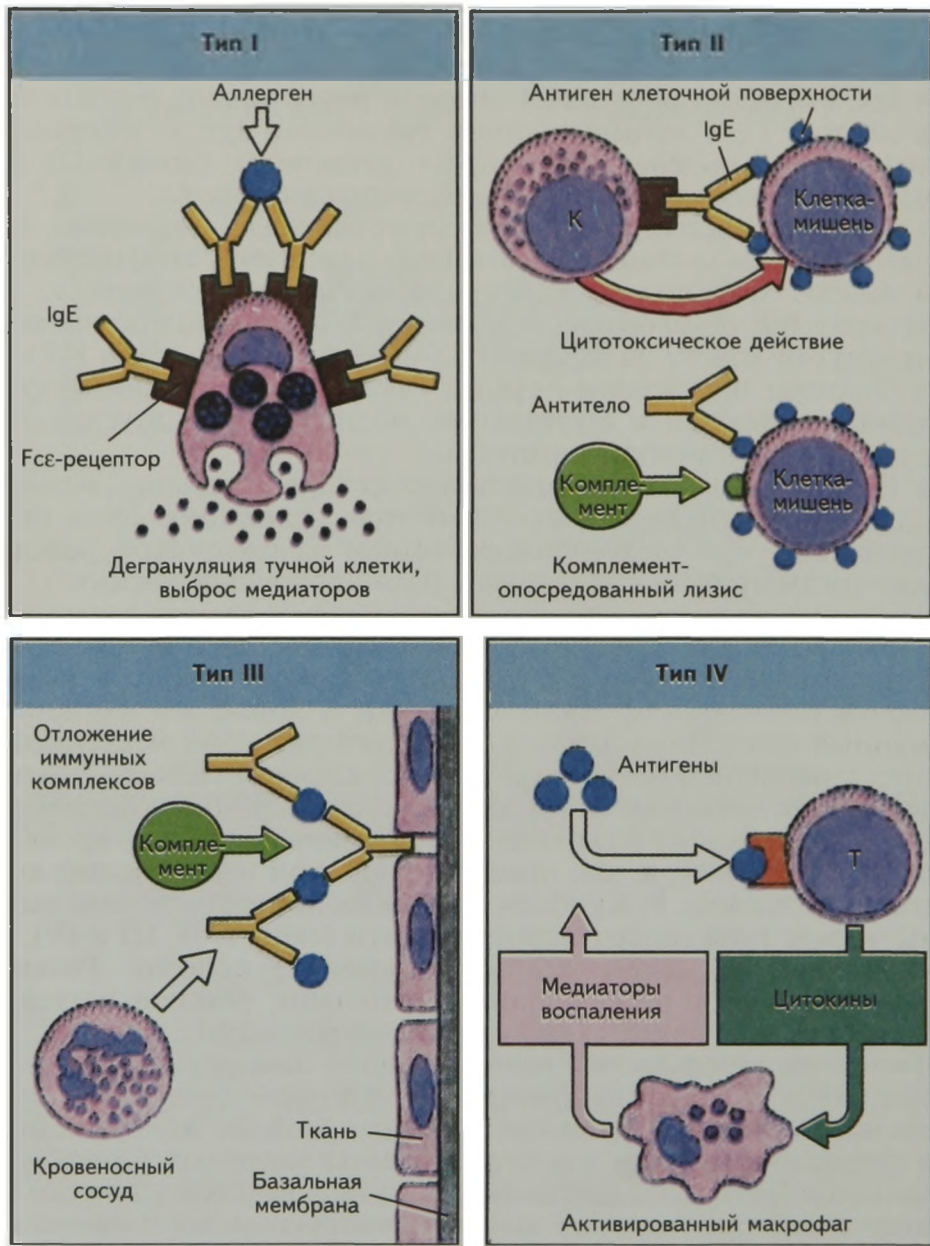
воспаления появляются лимфоциты и мононуклеарные фагоциты, они могут, активируясь под действием антигена, выделять свои собственные цитокины (ИЛ-1, ФНО, ИЛ-4, ИФγ), которые, воздействуя на эндотелий местных сосудов, дополнительно усиливают клеточную миграцию. Другие цитокины, например ИЛ-8, могут оказывать хемотаксическое или активирующее действие на прибывающие клетки.

### 3.6. ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ — ТИПЫ I, II, III И IV

- IgE связывается специфическими рецепторами (FcεRI) тучных клеток. При взаимодействии связанного IgE с аллергеном тучные клетки выделяют медиаторы (аутокоиды, цитокины), которые и вызывают клинические симптомы аллергии.
- Типичные примеры аллергических реакций — поллиноз, астма, атопическая экзема, лекарственная аллергия и анафилаксия.
- Анализ конкордантности среди близнецов показывает, что продукция IgE обусловлена генетической предрасположенностью к иммунному ответу на аллерген с участием Тх2-клеток и ИЛ-4.
- Факторы окружающей среды, такие, как аллергенный фон, вирусные инфекции и загрязнение, модифицируют и усиливают IgE-ответ и клинические симптомы.
- В процессе эволюции антитела класса IgE появились, возможно, для защиты организма от гельминтов. Продукцию IgE в ответ на аллергены с последующим развитием аллергической реакции можно рассматривать как нежелательный побочный эффект.

Гиперчувствительностью называют чрезмерное или неадекватное проявление реакций приобретенного иммунитета. В основе гиперчувствительности лежит полезный в норме для организма иммунный ответ, но в данном случае действующий неадекватно, иногда с развитием воспаления и повреждением тканей. Реакции гиперчувствительности могут провоцироваться многими антигенами, и причины их различны. Гиперчувствительность проявляется не при первом, а, как правило, лишь при последующих контактах с антигеном. Р Кумбсом и другими исследователями выделены четыре типа гиперчувствительности (типы I, II, III и IV), но на практике они необязательно встречаются порознь. Реакции первых трех типов опосредуются антителами; реакции четвертого — преимущественно Т-клетками и макрофагами..

Гиперчувствительность I (немедленного) типа развивается в том случае, когда IgE-ответ направлен против в норме безвредных антигенов внешней среды, таких как цветочная пыльца, домашняя пыль или слущенные частицы эпителия (перхоть) животных. Сенсибилизированные IgE тучные клетки выделяют при этом биологически активные медиаторы, которые вызывают острую воспалительную реакцию с симптомами астмы или ринита. Гиперчувствительность II типа, называемая также антителозависимой цитотоксической, возникает, когда антитела, обычно класса IgG, связываются на поверхности клеток с ауто- или чужеродным антигеном, вызывая в результате фагоцитоз, активацию киллерных клеток или комплемент-опосредованный лизис. Гиперчувствительность III типа развивается при образовании большого количества иммунных комплексов или при нарушении их элиминации ретикулоэндотелиальной системой; обе эти причины вызывают реакции, сходные с сывороточной бо-



**Рис. 49. Четыре типа реакций гиперчувствительности.**

Существует четыре типа реакций гиперчувствительности. Тип I характеризуется связыванием IgE с Fcε-рецепторами тучных клеток. При контакте с аллергеном происходит перекрестное связывание IgE; оно вызывает дегрануляцию тучных клеток и высвобождение ими медиаторов аллергических реакций. При гиперчувствительности II типа вырабатываются антитела к антигену поверхности собственных клеток организма (клеток-мишеней) или к чужеродному антигену, например эритроцитов при переливании крови. Связывание таких антител на клетках-мишенях может вызывать цитотоксический эффект К-клеток или комплементопосредованный лизис клеток-мишеней. Гиперчувствительность III типа обусловлена отложением в тканях иммунных комплексов. При этом происходит активация комплемента и в месте отложения комплексов накапливаются полиморфно-ядерные клетки, вызывая локальное повреждение тканей и воспаление. Гиперчувствительность IV типа связана с тем, что сенсibilизированные антигеном Т-клетки при повторной встрече с тем же антигеном выделяют цитокины

лезню. Гиперчувствительность IV, или замедленного, типа (ГЗТ) наиболее резко проявляется в тех случаях, когда макрофаги поглощают чужеродный материал (например, возбудителей туберкулеза), но не способны его элиминировать. При этом происходит стимуляция синтеза Т-клетками цитокинов, вызывающих различные воспалительные реакции. Другими проявлениями реакций ГЗТ являются отторжение трансплантата и аллергический контактный дерматит. Перечисленные четыре типа реакций гиперчувствительности проиллюстрированы на рис. 49.

### 3.6.1. ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ I (НЕМЕДЛЕННОГО) ТИПА

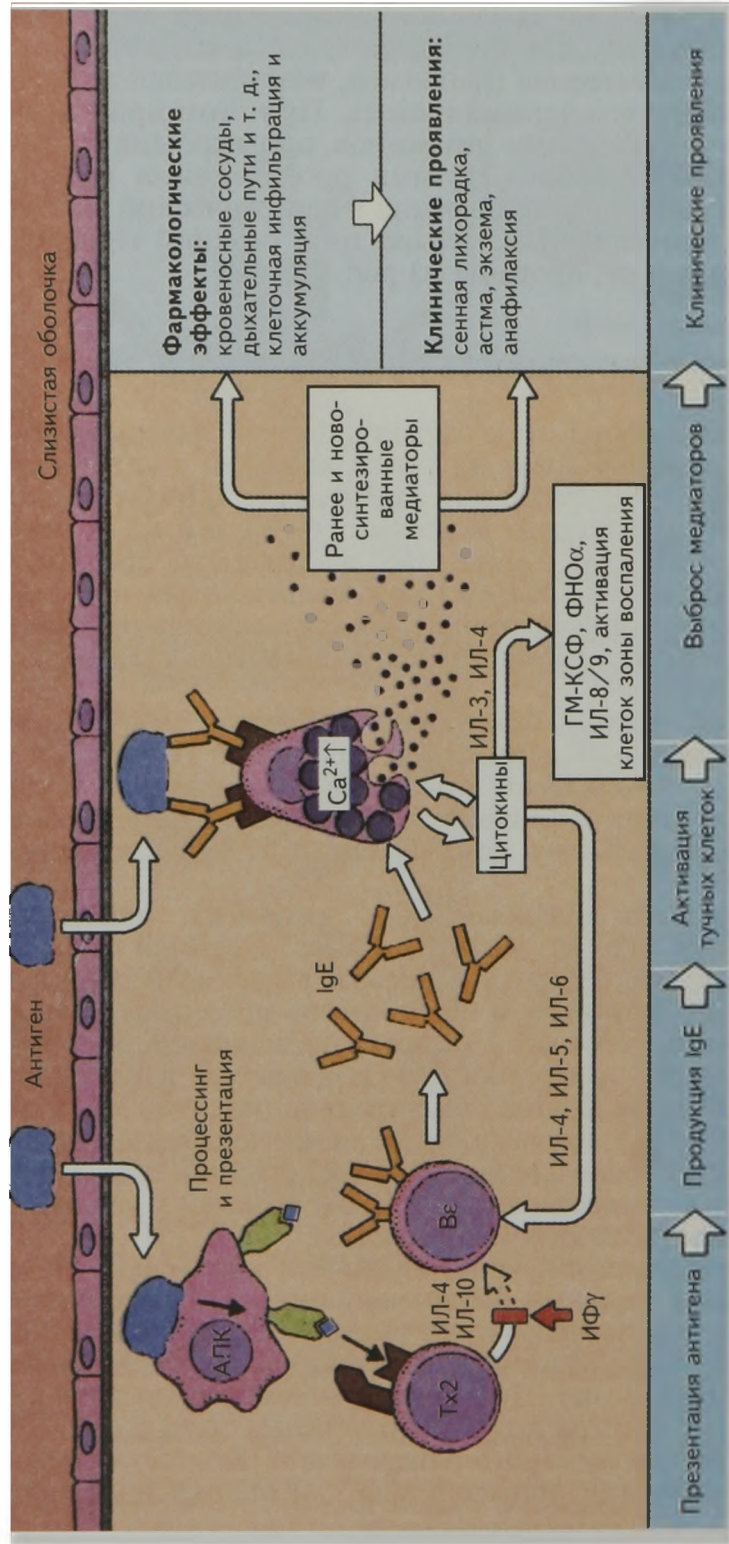
Гиперчувствительность I типа характеризуется аллергической реакцией, развивающейся сразу же после контакта с антигеном, который в данном случае называют аллергеном. Термин «аллергия», означающий измененную реактивность организма-хозяина при его повторных встречах с «агентом», впервые был предложен в 1906 г. К. фон Пирке (без разделения развивающихся при этом иммунологических реакций по типам). Синонимом для обозначения гиперчувствительности I типа термин «аллергия» стал лишь в последние годы.

*Атопия* — общий термин, объединяющий астму, экзему, поллиноз (сенную лихорадку) и пищевую аллергию. Термин «атопия» впервые был использован Кока и Р Куком в 1923 г. для описания клинических проявлений гиперчувствительности I типа, включая астму, экзему, сенную лихорадку, крапивницу и пищевую аллергию.

Отмечается сходство анафилаксии у животных, описанной П. Портье и Ш. Рише (Portier, Richet) в 1902 г., с сенной лихорадкой и астмой у человека. Однако у животных введение чужеродных белков или токсинов приводит к образованию преципитирующих антител в 90% случаев, тогда как у человека после воздействия присутствующих в воздухе аллергенов сенсibilизация наблюдается лишь в 10...20 % случаев. Другое существенное различие заключается в том, что аллергия у человека, но не анафилаксия у животных (насколько известно) тесно связана с наследственностью. Таким образом, исходные механизмы аллергических реакций у животных и атопии у человека, по-видимому, различны.

Аллергия опосредуется иммуноглобулинами класса IgE. Механизм аллергической реакции первыми описали Прауснитц и Кюстнер в 1921 г. Эти исследователи провели следующий эксперимент: сыворотку крови Кюстнера (он страдал аллергией к рыбе) ввели подкожно Прауснитцу. При последующем введении рыбьего антигена в тот же участок кожи у Прауснитца сразу же появилась гиперемия с волдырями. [Это напоминает ПКА-тест (пассивная кожная анафилаксия), применяемый для оценки продукции





**Рис. 50. Индукция и эффекторные механизмы гиперчувствительности I типа.**

Безвредные в норме антигены внешней среды (аллергены) проникают через слизистые оболочки и поглощаются местными антигенпрезентирующими клетками (АПК), которые осуществляют их презентацию Тх-клеткам. Тх2-клетки секретируют цитокины, вызывающие пролиферацию В-клеток и способствующие развитию аллергенспецифической IgE-реакции. Антитела IgE связываются с Fcε-рецепторами (FcεR1) тучных клеток, тем самым сенсбилизируя их. При повторной встрече аллергена с сенсibilизированной тучной клеткой он перекрестно связывается с фиксированными на ее поверхности IgE, что приводит к повышению внутриклеточной концентрации Ca<sup>2+</sup>. В результате клетка выделяет ранее синтезированные медиаторы, такие как гистамин и протеазы, а также новосинтезированные медиаторы липидной природы — лейкотриены и простагландины. Эти вещества и обуславливают развитие клинических симптомов аллергии. Дегранулированные тучные клетки выделяют также цитокины, усугубляющие воспалительную реакцию и IgE-ответ



IgE у экспериментальных животных.] Прауснитц и Кюстнер предположили, что в сыворотке страдающих аллергией лиц присутствует «атопический реагин». Спустя примерно 45 лет Исицака с сотрудниками выделили этот «атопический реагин» и продемонстрировали, что он представляет собой иммуноглобулин нового класса — IgE.

Реакции гиперчувствительности I типа развиваются вследствие активации IgE-сенсibilизированных тучных клеток аллергеном. Иными словами реакции гиперчувствительности I типа обусловлены активацией специфическим аллергеном тучных клеток, сенсibilизированных IgE. Тучные клетки выделяют при этом биологически активные медиаторы, которые и вызывают воспалительный ответ, типичный для такого рода реакций (рис. 50).

Согласно новейшим данным, в результате IgE-активации тучных клеток выделяется и ряд многофункциональных цитокинов. При этом ИЛ-3 и ИЛ-4 могут оказывать сильный аутокринный эффект на сами тучные клетки, другие цитокины — способствовать продукции IgE В-лимфоцитами. Кроме того, некоторые цитокины, в том числе ИЛ-5 и продукты семейств генов ИЛ-8 и ИЛ-9, могут принимать участие в хемотаксисе и активации клеток зоны воспаления в участке аллергической реакции.

Первоначальный контакт аллергена со слизистой оболочкой вызывает сложную последовательность событий, приводящих к продукции IgE. Этот IgE-ответ возникает локально, в участке проникновения аллергена в организм, т. е. на слизистых оболочках и/или в регионарных лимфатических узлах. Продукция В-лимфоцитами IgE зависит от презентации аллергена АПК и кооперации между В- и Тх2-клетками. Локально продуцируемые IgE вначале сенсibilизируют только местные тучные клетки, но затем проникают в кровь и связываются со специфическими рецепторами циркулирующих базофилов и тканевых тучных клеток во всем организме.

Важное свойство IgE — высокая аффинность к Fc-участкам рецепторов тучных клеток и базофилов. И хотя период полужизни свободных IgE в сыворотке составляет всего несколько суток, тучные клетки могут оставаться сенсibilизированными IgE в течение многих месяцев благодаря высокой аффинности связывания этих иммуноглобулинов с рецепторами FcεRI, которые защищают IgE от разрушения сывороточными протеазами. (FcεRII обладает гораздо меньшим средством к IgE.)

### 3.6.2. ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ II ТИПА

Реакции гиперчувствительности II типа опосредованы IgG-или IgM-антителами к антигенам клеточной поверхности и внеклеточного матрикса. Может происходить и образование антител

к внутриклеточным компонентам, но они обычно непатогенны, хотя могут иметь диагностическое значение. Трансфузионные реакции на эритроциты вызываются антителами к антигенам групп крови; образование таких антител может происходить независимо или в результате индукции предшествующим контактом с несовместимой тканью или кровью при трансплантации, переливании крови или беременности.

Антитела повреждают клетки и ткани вследствие активации комплемента, а также связывания и активации эффекторных клеток, несущих Fc $\gamma$ -рецепторы. Гемолитическая болезнь новорожденных развивается в тех случаях, когда материнские антитела к групповым антигенам крови плода проходят через плаценту и разрушают его эритроциты. Повреждение тканей могут вызывать антитела к базальным мембранам, молекулам межклеточной адгезии или рецепторам. Характер патологии зависит от молекул и тканей-мишеней.

Антитела IgG и IgM, связываясь с определенными клетками или тканями, вызывают развитие реакций гиперчувствительности II типа. Локализация возникающих повреждений ограничена, таким образом, клетками или тканями, экспонирующими соответствующие антигены. Патогенность, как правило, характерна для антител к антигенам клеточной поверхности, тогда как антитела к внутриклеточным антигенам обычно непатогенны. В отличие от этого в реакциях III типа участвуют антитела к растворимым антигенам сыворотки, вызывающие образование в крови комплексов антиген—антитело. Повреждения в данном случае связаны с неспецифическим отложением таких комплексов в тех или иных тканях и/или органах.

При гиперчувствительности II типа повреждение клеток-мишеней обусловлено взаимодействием антител к антигенам клеточной поверхности или тканей с комплементом и различными эффекторными клетками.

Прикрепившиеся к поверхности клеток или тканей антитела могут связывать и активировать компонент C1 комплемента, вызывая следующие эффекты.

Фрагменты комплемента (C3a и C5a), образующиеся при его активации, привлекают к данному участку макрофаги и полиморфно-ядерные клетки, а также стимулируют продукцию тучными клетками и базофилами молекул, привлекающих и активирующих другие эффекторные клетки. Активация комплемента по классическому пути и действие механизма усиления приводят к отложению C3b, C3bi и C3d на мембране клеток-мишеней. Активация комплемента по классическому пути на ее конечной стадии приводит к образованию лизирующей мембрану комплекса (C5b—9), который встраивается в мембрану клетки-мишени.

Эффекторные клетки — в данном случае макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы и НК-(киллерные) клетки — взаимодействуют

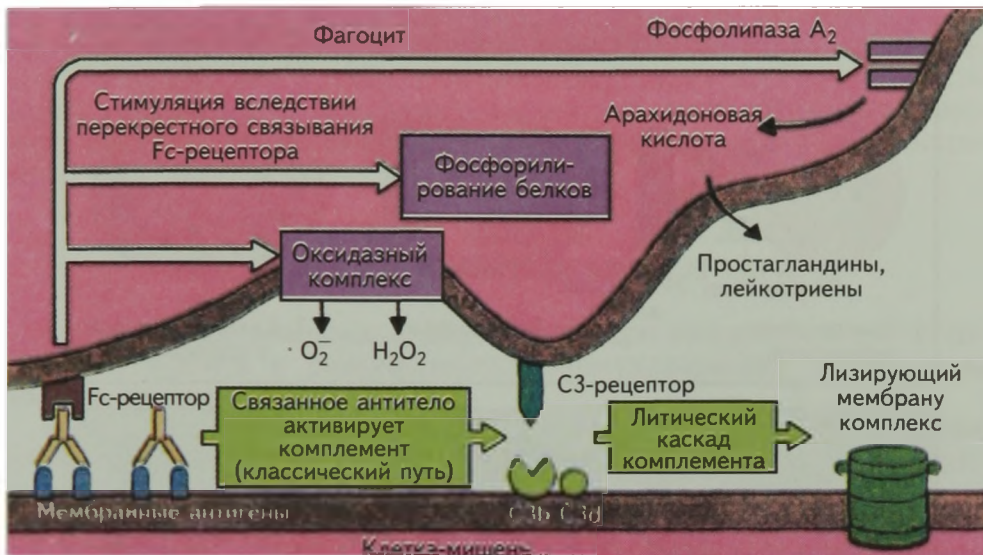
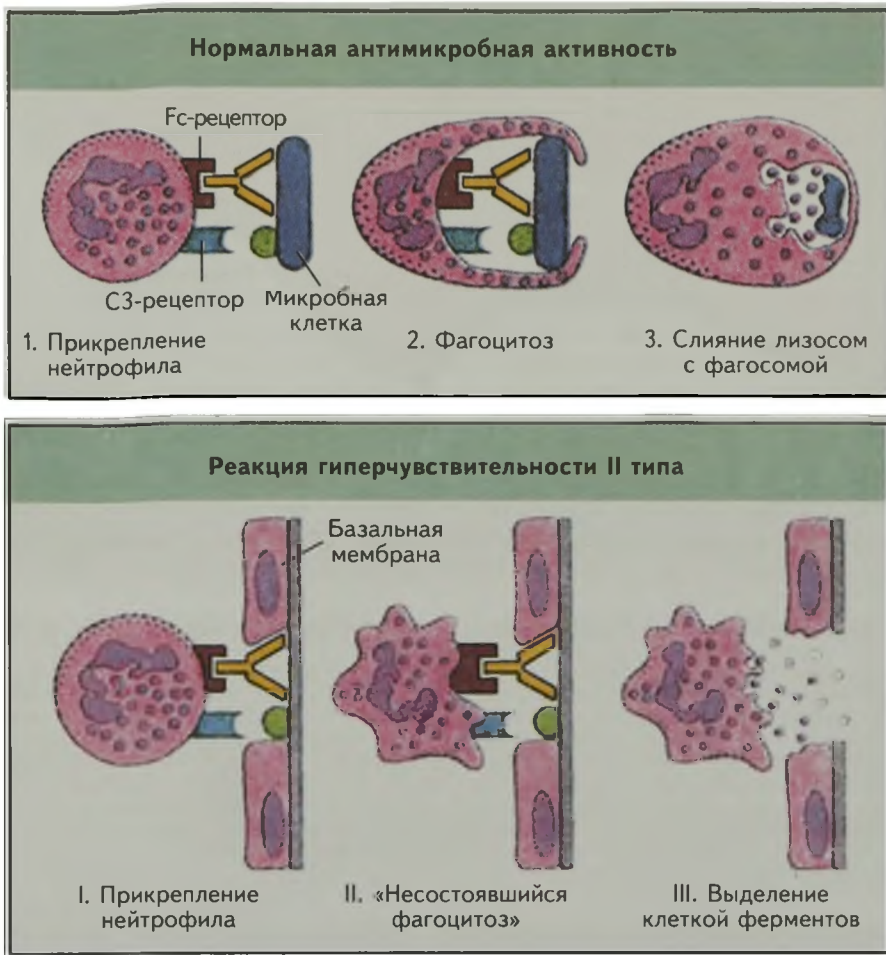


Рис. 51. Механизмы цитотоксических реакций при гиперчувствительности II типа.

Антитела, связываясь с мембранными антигенами клеток-мишеней, опсонизируют их, способствуя фагоцитозу. Перекрестное связывание антител с Fc-рецепторами на поверхности фагоцитов активирует мембранный оксидантный комплекс этих клеток, приводя к выделению ими кислородных радикалов; одновременно усиливается и фосфорилирование белков, т. е. происходит активация эффекторных клеток. Под действием фосфолипазы  $A_2$  из мембранных фосфолипидов высвобождается арахидоновая кислота. Иммунные комплексы индуцируют отложение фрагмента C3b комплемента, также способного взаимодействовать с рецепторами фагоцитов. Активация литического каскада приводит к сборке лизирующего мембрану комплекса (ЛМК) из компонентов комплемента C5b—C9

посредством своих Fc-рецепторов с фиксированными на клетках антителами или через свои C3-рецепторы с мембраносвязанными C3b, C3bi и C3d. Прочно связанные с клетками-мишенями и полностью активированные эффекторные клетки могут вызывать значительные повреждения.

Эффекторные клетки вызывают характерные для гиперчувствительности II типа повреждения клеток собственного организма посредством тех же механизмов, какими они действуют на инфекционные агенты (рис. 51). Так, большинство патогенных микробов (если они не резистентны к воздействию фагоцитов) уничтожаются внутри фаголизосом в результате совместного действия высокоактивных метаболитов кислорода и азота, радикалов, ионов, ферментов, изменения pH и влияния других факторов, обеспечивающих лизис. Если объект слишком крупный для фагоцитоза, эффекторные клетки выделяют содержимое своих гранул и лизосом в направлении сенсibilизированной мишени (экзоцитоз) (рис. 52). В определенных случаях, например при эозинофильной реакции на инвазию шистосом, выброс содержимого гранул обеспечивает защиту; когда же мишенью оказываются сен-



**Рис. 52. Механизмы повреждений.**

Повреждающее действие нейтрофилов на собственные ткани — это отражение нормальной антибактериальной функции этих клеток. 1. Нейтрофилы взаимодействуют с микробами через свои Fc- и C3-рецепторы. 2. Затем микробную клетку поглощает фагоцит, внутри которой она разрушается по мере слияния лизосом и фагосомы с образованием фаголизосомы (3). В реакциях гиперчувствительности II типа отдельные нагруженные антителами клетки хозяина также могут подвергаться фагоцитозу, но при крупных размерах мишени, если это, например, базальная мембрана (I), нейтрофилы неспособны фагоцитировать ее (II) и выделяют содержащее лизосом наружу, повреждая близлежащие клетки (III)

сенсибилизированные антителами клетки хозяина, эта реакция приводит к повреждению собственных тканей.

Антитела вызывают реакцию гиперчувствительности и путем перекрестного связывания НК-клеток с тканями-мишенями. НК-клетки присутствуют главным образом в популяции больных.

Наиболее яркие примеры гиперчувствительности II типа — это антиэритроцитарные реакции. Они могут вызывать тяжелые последствия в следующих случаях: переливание несовместимой кро-



ви, когда реципиент сенсибилизирован к поверхностным антигенам эритроцитов донора; гемолитическая болезнь новорожденных, возникающая в результате сенсибилизации беременной женщины эритроцитами плода, и аутоиммунные гемолитические анеми, когда больной сенсибилизирован собственными эритроцитами.

### 3.6.3. ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ III ТИПА

- Иммунные комплексы образуются при каждой встрече антигенов с антителом и разрушаются мононуклеарными фагоцитами после активации комплемента.

- Персистенция антигена при длительной инфекции или при аутоиммунном заболевании может приводить к болезни иммунных комплексов.

- Образование иммунных комплексов может происходить в крови, приводя к системным заболеваниям, или локально, например в легких.

- Комплемент способствует разрыву связей между антигеном и антителом и поддерживает иммунные комплексы в растворимом состоянии.

- При недостаточности комплемента происходит образование крупных, слабо растворимых комплексов с отложением их в тканях.

- Положительно заряженные антигены обладают способностью связываться с тканями, особенно с почечными клубочками, и способствовать локальному накоплению комплексов в почках.

- Факторы, повышающие проницаемость кровеносных сосудов, увеличивают отложение иммунных комплексов в тканях.

Иммунные комплексы образуются при каждой встрече антигенов с антителом и обычно эффективно разрушаются мононуклеарными фагоцитами, но иногда сохраняются в течение длительного времени и откладываются в различных тканях и органах. Развивающиеся в результате повреждения, опосредуемые комплементом и эффекторными клетками, называют реакциями гиперчувствительности III типа, или болезнью иммунных комплексов.

В каких местах произойдет отложение иммунных комплексов, отчасти зависит от локализации антигена в тканях и отчасти — от условий попадания комплексов из крови в ткани.

**Типы болезней иммунных комплексов.** Болезни, обусловленные образованием иммунных комплексов, можно разделить на три большие группы: связанные с персистенцией инфекции, связанные с аутоиммунными заболеваниями и связанные с вдыханием антигенного материала (табл. 3).

### 3. Три категории болезней иммунных комплексов

Причина	Антиген	Место отложения комплексов
Персистенция инфекции	Микробные антигены	Инфицированный орган(ы), почки
Аутоиммунитет	Аутоантиген	Почки, суставы, артерии, кожа
Вдыхаемые антигены	Антигены грибного, растительного или животного происхождения	Легкие

**Персистенция инфекции.** Сочетание хронической инфекции со слабым гуморальным ответом приводит к постоянному образованию иммунных комплексов и в конце концов к их отложению в тканях. К болезням с такой этиологией относятся лепра, малярия, геморрагическая лихорадка денге, вирусный гепатит и стафилококковый эндокардит.

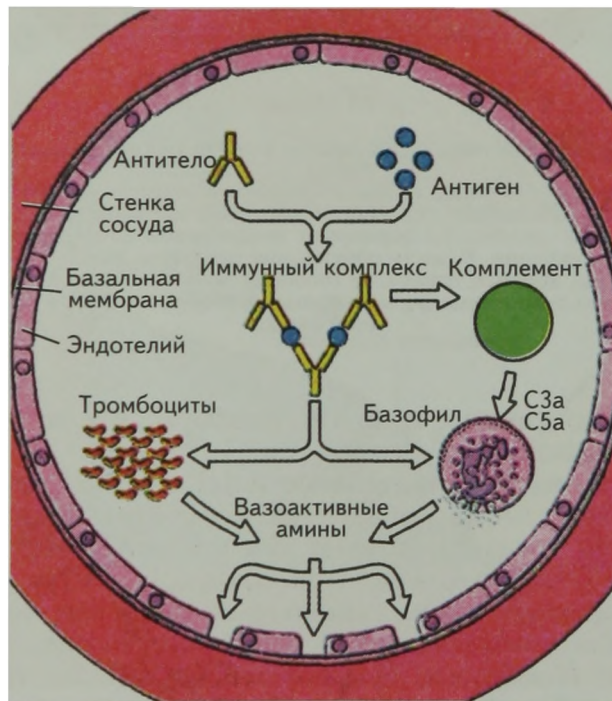
**Аутоиммунные заболевания.** Болезнь иммунных комплексов часто является осложнением аутоиммунных заболеваний, при которых хроническое образование комплексов обусловлено непрерывной продукцией антител к аутоантигенам. По мере увеличения количества иммунных комплексов в крови ответственная за их удаление система (мононуклеарные фагоциты, эритроциты и комплемент) перестает справляться со своей задачей, и комплексы начинают откладываться в тканях. Болезни с такой этиологией включают ревматоидный артрит, системную красную волчанку (СКВ) и полимиозит.

**Вдыхание антигенного материала.** При действии внешних антигенов иммунные комплексы могут образовываться на поверхности стенок полостей. Такие реакции наблюдаются в легких после повторного вдыхания антигенных компонентов актиномицетов, а также антигенов растительного или животного происхождения. К подобным болезням относятся, например, «легкое фермера» и «легкое голубевода», при которых в крови присутствуют антитела к антигенам актиномицетов (из заплесневевшего сена) или к белку из экскрементов голубей. Оба эти заболевания представляют собой формы экзогенного аллергического альвеолита и развиваются лишь при повторном воздействии антигена. (Антитела к таким антигенам относятся преимущественно к классу IgG, а не IgE, который характерен для реакций гиперчувствительности I типа.) Когда антиген вновь поступает в организм аэрогенным путем, в альвеолах образуются локальные иммунные комплексы, что приводит к воспалению и фиброзу (рис. 53). Преципитирующие антитела к антигенам актиномицетов обнаруживаются в сыворотке крови у 90 % больных с «легким фермера», но в то же время присутствуют у некоторых лиц, не страдающих этим заболеванием, и отсутствуют у части больных. Таким образом, в патогенезе этого экзогенного аллергического альвеолита прини-



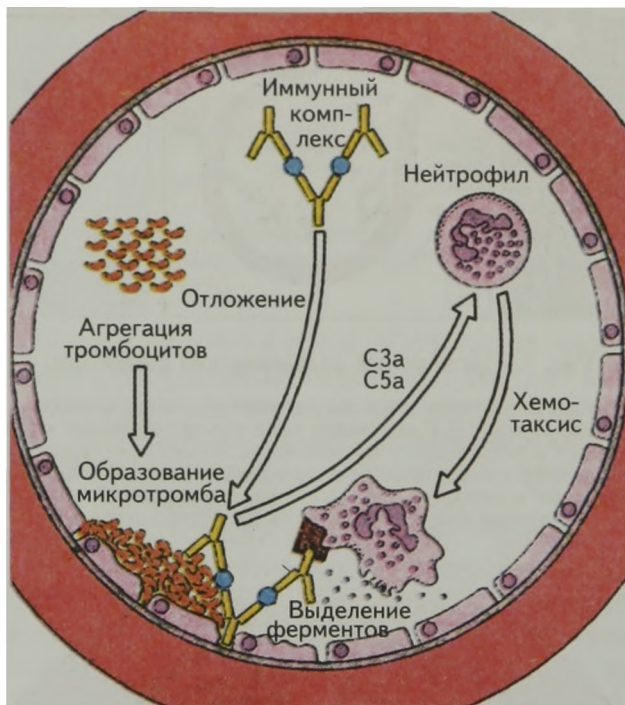
**Рис. 53. Экзогенный аллергический альвеолит.**

При попадании антигена актиномицетов в легкие сенсibilизированных лиц в альвеолах образуются иммунные комплексы (2). Связывание комплемента приводит к накоплению клеток, воспалению и фиброзу. Гистологическое исследование легких при экзогенном аллергическом альвеолите (1) обнаруживает сливающиеся участки клеточных скоплений. Преципитирующие антитела, присутствующие в сыворотке при болезни «легкое голубевода» (Р; 3), направлены против антигенных белков птичьего помета



**Рис. 54. Отложение иммунных комплексов в стенках кровеносных сосудов — I.**

Иммунные комплексы влияют на комплемент, стимулируя образование фрагментов С3а и С5а, которые, в свою очередь, усиливают выделение базофилами вазоактивных аминов. Комплексы непосредственно воздействуют также на базофилы и тромбоциты (у человека), вызывая выделение вазоактивных аминов. Выделившиеся амины (например, гистамин и 5-гидрокситриптамин) приводят к сокращению эндотелиальных клеток и тем самым увеличивают сосудистую проницаемость



**Рис. 55. Отложение иммунных комплексов в стенках кровеносных сосудов — II.**

Повышенная проницаемость сосуда создает возможность отложения иммунных комплексов в его стенке. Иммунные комплексы индуцируют агрегацию тромбоцитов и активацию комплемента. Агрегированные тромбоциты формируют микротромбы на обнаженном коллагене базальной мембраны эндотелия. К месту образования продуктов активации комплемента стягиваются нейтрофилы, которые, однако, не способны поглотить комплексы. Они путем экзоцитоза выделяют свои лизосомные ферменты, вызывающие дальнейшее повреждение сосудистой стенки

мают участие, очевидно, и другие факторы, в том числе реакция гиперчувствительности IV типа.

**Механизмы гиперчувствительности III типа.** Иммунные комплексы способны инициировать разнообразные воспалительные процессы. Они взаимодействуют с системой комплемента, способствуя образованию анафилатоксинов C3a и C5a, которые стимулируют выделение вазоактивных аминов (в том числе гистамина и 5-гидрокситриптамина) и хемотаксических факторов из тучных клеток и базофилов. Компонент C5 служит также хемотрактантом для базофилов, эозинофилов и нейтрофилов.

В присутствии иммунных комплексов активируются макрофаги, выделяющие цитокины, в частности ФНО $\alpha$  и ИЛ-1, которые играют важную роль в процессах воспаления. Комплексы непосредственно взаимодействуют с базофилами и тромбоцитами (через Fc-рецепторы), что приводит к высвобождению вазоактивных аминов (рис. 54).



Вазоактивные амины, выделяемые тромбоцитами, базофилами и тучными клетками, вызывают ретракцию клеток эндотелия, увеличивая тем самым проницаемость сосудов, и создают возможность отложения иммунных комплексов на их стенках (рис. 55). Откладывающиеся комплексы продолжают стимулировать образование С3а и С5а.

На обнаженном коллагене базальной мембраны сосуда происходит агрегация тромбоцитов, чему способствует их взаимодействие с Fc-участками отложившихся иммунных комплексов; в результате образуются микротромбы. Агрегированные тромбоциты продолжают продуцировать вазоактивные амины и стимулировать образование С3а и С5а. (Тромбоциты служат также богатым источником факторов роста, которые могут участвовать в клеточной пролиферации, наблюдаемой при таких болезнях иммунных комплексов, как гломерулонефрит и ревматоидный артрит.)

К месту образования С5а мигрируют полиморфно-ядерные клетки. Они пытаются поглотить иммунные комплексы, но не способны это сделать, поскольку последние прикреплены к стенке сосуда. Поэтому полиморфно-ядерные клетки выделяют свои лизосомные ферменты путем экзоцитоза непосредственно в место отложения

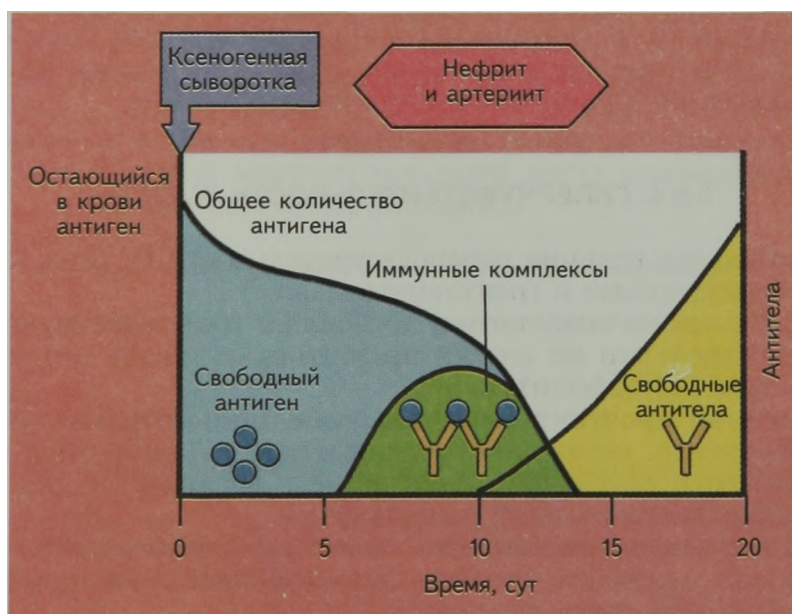


Рис. 56. Динамика экспериментальной сывороточной болезни.

После введения ксеногенной сыворотки наступает длящийся примерно 5 сут латентный период, в течение которого антиген в сыворотке присутствует только в свободной форме. Затем образуются антитела к чужеродным белкам и в сыворотке появляются иммунные комплексы; именно в это время возникают симптомы нефрита и артериита. Вначале, при избытке антигена, происходит образование лишь мелких растворимых иммунных комплексов. С увеличением титра антител формируются более крупные комплексы и происходит их отложение в тканях, но при этом и быстрое разрушение. На этой стадии симптомы заболевания исчезают

комплексов (см. рис. 54). При выделении лизосомных ферментов в кровь или тканевую жидкость они не вызывают сильного воспаления, поскольку быстро нейтрализуются сывороточными ингибиторами, но в том случае, когда фагоцит приходит в близкое соприкосновение с фиксированным в ткани комплексом, связываясь с его Fc-фрагментом, действие сывороточных ингибиторов исключается, и лизосомные ферменты могут повреждать ткань.

При внутривенном введении растворимого чужеродного белка, например бычьего сывороточного альбумина (БСА), спустя примерно 1 нед у животного образуются антитела, которые в крови связываются с антигеном. Поскольку эта реакция происходит при избытке антигена, образующиеся иммунные комплексы имеют небольшие размеры (рис. 56). Такие мелкие комплексы медленно удаляются лишь системой мононуклеарных фагоцитов и поэтому долго сохраняются в крови. Вслед за образованием комплексов происходит резкое падение общего содержания комплемента; клинические признаки сывороточной болезни обусловлены зернистыми отложениями комплексов антиген—антитело и образованием СЗ вдоль базальной мембраны почечных клубочковых капилляров и других мелких сосудов. По мере образования все большего количества антител и сдвиге реакции в сторону их избытка размеры комплексов увеличиваются и они начинают поглощаться быстрее; животное выздоравливает. При ежедневном введении антигена болезнь приобретает хроническое течение.

#### 3.6.4. ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ IV ТИПА

Известны три реакции гиперчувствительности IV типа: контактная, туберкулиновая и гранулематозная.

Нанесенный на кожу гаптен поглощают и процессируют клетки Лангерганса; эти же клетки презентируют гаптен антигенспецифическим Т-лимфоцитам.

Цитокины, продуцируемые иммунокомпетентными клетками кожи (например, кератиноцитами, клетками Лангерганса или Т-лимфоцитами), обуславливают участие в реакции антигеннеспецифических Т-лимфоцитов и макрофагов.

Реакцию гиперчувствительности туберкулинового типа можно использовать в качестве диагностической пробы на присутствие многих инфекционных агентов.

Персистенция антигена приводит к дифференцировке макрофагов в эпителиоидные клетки и их слиянию с образованием гигантских клеток. Этот патологический процесс, называемый гранулематозной реакцией, приводит к повреждению тканей.

Для гранулематозных реакций характерен определенный баланс между защитным иммунитетом к нерастворимому антигену и опосредованным Т-лимфоцитами повреждением ткани.

Формирование гранулемы связано с Т-клеточной активацией макрофагов и зависит от ФНО.

В отличие от других видов гиперчувствительности реакции IV типа могут быть перенесены от сенсibilизированного животного несенсибилизированному не сывороткой, а Т-лимфоцитами (у мыши Тс1-клетками). В основе таких реакций лежат механизмы защитного Т-клеточного иммунитета, однако полная корреляция между ним и гиперчувствительностью IV типа наблюдается далеко не всегда. Ответственные за осуществление замедленной реакции Т-клетки специфически сенсibilизированы антигеном в период предшествующего контакта с ним и действуют путем привлечения к месту реакции клеток других типов.

Известны три варианта реакций гиперчувствительности IV типа (см. ниже). Контактная и туберкулиновая реакции развиваются в течение 72 ч после начала действия антигена, тогда как гранулематозная реакция — лишь через 21...28 сут; гранулемы образуются в результате накопления и пролиферации макрофагов и могут сохраняться неделями. Эта форма гиперчувствительности IV типа вызывает наиболее серьезные клинические последствия. Необходимо отметить, что один и тот же антиген способен вызывать реакции разных видов, которые могут перекрывать друг друга. Названные три вида реакций замедленного типа исходно были выделены по характеру проявлений, возникающих при кожном нанесении или внутрикожном введении антигена. Степень реакции обычно оценивают у животных по толщине пораженного участка кожи. Вслед за местной реакцией могут развиваться и различные системные иммунные реакции.

##### 5. Варианты реакций гиперчувствительности замедленного типа

Замедленная реакция	Время максимального развития реакции
Контактная	48...72 ч
Туберкулиновая	48...72 ч
Гранулематозная	21...28 сут

**Примечание.** Контактная и туберкулиновая формы гиперчувствительности имеют сходную временную динамику и достигают максимума через 48...72 ч. В некоторых случаях (например, при воздействии нерастворимого антигена) через 21...28 сут развивается и гранулематозная реакция (например, при кожной пробе на лепру).

*Контактная гиперчувствительность* характеризуется экзематозной реакцией в месте воздействия антигена. Она часто возникает в результате контакта с такими веществами, как никель, хромат, применяемые в резиновой промышленности катализаторы. При контакте с токсически действующими раздражающими веществами экзема может возникать и без участия механизмов гиперчувствительности. Хотя начальные реакции в этих двух случа-

ях различны, иммунологические сдвиги, развивающиеся после воздействия раздражителей и аллергенов, сходны между собой. Ключевая роль при контактной гиперчувствительности принадлежит клеткам Лангерганса и кератиноцитам.

*Гиперчувствительность туберкулинового типа* впервые была описана Р. Кохом. При подкожной инъекции фильтрата из культуры вызывающих туберкулез микобактерий (он содержит так называемый туберкулин — комплекс антигенов этих бактерий) у больных туберкулезом повышается температура и развивается общее болезненное состояние. В участке инъекции возникают уплотнение и отек.

Аналогичные реакции вызывают у сенсibilизированных лиц растворимые антигены многих микроорганизмов, включая *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* и *Leishmania tropica*. Кожную реакцию часто используют для проверки сенсibilизации теми или иными микроорганизмами (рис. 57). Эту форму гиперчувствительности могут индуцировать и немикробные антигены, например бериллий и цирконий.

В реакции на туберкулиновую кожную пробу участвуют в основном моноциты. Кожная туберкулиновая проба позволяет выявить реакцию на растворимый антиген у ранее инфицированных лиц. После внутрикожной инъекции туберкулина сенсibilизированным лицам антигенспецифические Т-лимфоциты активируются и начинают секретировать цитокины, опосредующие реакцию гиперчувствительности. Выделяемые Т-клетками ФНО $\alpha$  и лим-

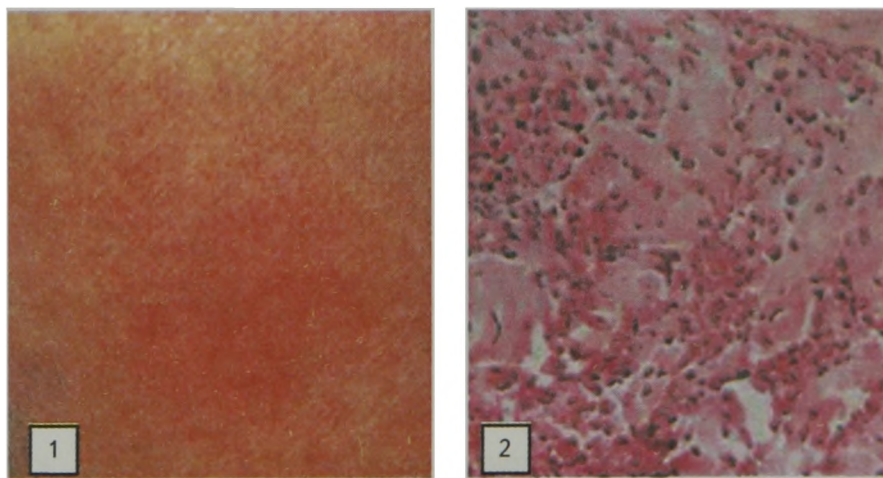


Рис. 57. Клиническое проявление и гистологическая картина реакции туберкулинового типа.

Реакцию сенсibilизированных лиц на инъекцию возбудителя лепры называют реакцией Фернандеса. Она проявляется покраснением и набуханием участка кожи и достигает максимума через 48...72 ч после введения антигена (1). Гистологически (2) в дерме выявляется плотный инфильтрат из лейкоцитов и макрофагов. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 80$

фотоксин (ФНО $\beta$ ) действуют на эндотелий кожных сосудов, индуцируя последовательную экспрессию молекул адгезии — E-селектина, ICAM-1 и VCAM-1. Эти молекулы связываются рецепторами на поверхности лейкоцитов и привлекают их к месту реакции. На протяжении первых 4 ч здесь скапливаются нейтрофилы, но через 12 ч их замещают моноциты и Т-лимфоциты. Инфильтрат, распространяясь и разрушая пучки коллагена дермы, увеличивается до максимальных размеров через 48 ч. Количество Т-клеток CD4<sup>+</sup> в инфильтрате примерно вдвое превышает число клеток CD8<sup>+</sup>. Через 24 и 48 ч в инфильтрате дермы присутствуют и клетки CD1<sup>+</sup> (сходные с клетками Лангерганса, но лишённые бербековых гранул); в период между 24 и 48 ч некоторые клетки CD4<sup>+</sup> проникают и в эпидермис.

Примерно 80...90 % всех клеток инфильтрата приходится на долю моноцитов. И лимфоциты, и макрофаги, присутствующие в инфильтрате, экспрессируют молекулы МНС класса II, что повышает способность активированных макрофагов презентировать антиген. Через 48...96 ч после появления лимфоцитарного инфильтрата покрывающие его кератиноциты начинают экспрессировать молекулы HLA-DR. Эти процессы проиллюстрированы на рис. 58.

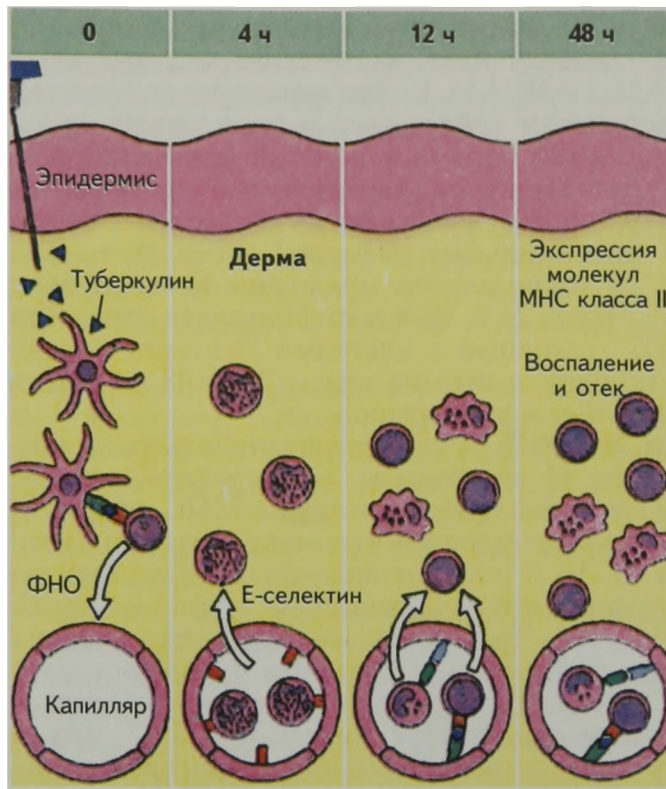
В реакциях гиперчувствительности туберкулинового типа основными АПК служат, вероятно, макрофаги. Однако в дермальном инфильтрате присутствуют и клетки CD1<sup>+</sup>, что указывает на возможное участие в реакции клеток Лангерганса или каких-то иных дендритных клеток. Перемещение иммуноцитов в регионарные лимфатические узлы и из них в данном случае происходит, по-видимому, так же, как в случае контактной гиперчувствительности.

Нарушения, вызванные туберкулином, обычно исчезают через 5...7 сут, но при персистенции антигена в тканях они могут прогрессировать в гранулематозную реакцию. Субэпидермальная инфильтрация базофилами для такой реакции не характерна, но может отмечаться при некоторых реакциях контактной гиперчувствительности и кожных пробах с гетерологичными белками, например при реакции Джонса—Моута.

*Гранулематозные реакции* представляют наиболее важную для клинической практики категорию гиперчувствительности IV типа; именно ими обусловлены многие проявления заболеваний, связанных с Т-клеточными иммунными реакциями. Обычно гранулематозные реакции развиваются при внутриклеточной персистенции в макрофагах микроорганизмов или других частиц, которые клетка не способна разрушить. Иногда (например, при аллергическом альвеолите) причиной таких реакций является персистенция иммунных комплексов. В результате реакции формируется эпителиоидно-клеточная гранулема.

Гистологически гранулематозная реакция резко отличается от реакции туберкулинового типа. Однако обе они часто развивают-





**Рис. 58. Туберкулиновая форма гиперчувствительности.**

Перемещение клеток после внутрикожной инъекции туберкулина. В первые 1...2 ч на эндотелии капилляров экспрессируется Е-селектин, что обуславливает кратковременный приток нейтрофильных лейкоцитов. Через 12 ч ICAM-1 и VCAM-1 на клетках эндотелия связываются с интегринами LFA-1 и VLA-4, экспрессированными на моноцитах и лимфоцитах, что приводит к накоплению этих клеток в дерме. Реакция достигает пика через 48 ч и сменяется экспрессией молекул МНС класса II на кератиноцитах. Отек эпидермиса при этом отсутствует

ся при сенсибилизации одними и теми же микробными антигенами, например *M. tuberculosis* и *M. leprae*. Формирование иммунологической гранулемы наблюдается также при гиперчувствительности к цирконию и бериллию. При попадании в организм талька, кремния и многих других частиц гранулемы содержат эти неорганические вещества. Такие неиммунологические гранулемы можно отличить по отсутствию в них лимфоцитов.

### **3.7. ИММУНИТЕТ К БАКТЕРИАЛЬНЫМ МИКОТИЧЕСКИМ ИНФЕКЦИЯМ**

- О механизмах защиты против той или иной бактериальной инфекции можно судить по строению клеток возбудителя, особенно клеточной стенки, и факторам патогенности.

- Нейтрализующие антитела могут полностью обеспечивать защиту, если патогенность возбудителя связана только с токсином или адгезином.

- Неспецифические, филогенетически древние механизмы иммунитета — фагоцитоз, альтернативная активация комплемента и выделение цитокинов — действуют вследствие распознавания консервативных бактериальных структур.

- Комплемент может уничтожать некоторые бактерии, в первую очередь — грамотрицательные, т. е. имеющие наружный липидный бислой, или наружную мембрану, в составе клеточной стенки.

- Фагоциты способны уничтожать клетки большинства бактерий, осуществляя последовательно хемотаксис, связывание, поглощение и лизис.

- Патогенные микроорганизмы обладают разнообразными свойствами для обхода защитного действия комплемента и фагоцитов или для направления Т-зависимой активации фагоцитоза по ложному пути.

- Избыточное выделение цитокинов, вызываемое микробами, может быть причиной иммунопатологических синдромов, таких, как эндотоксический шок и реакция Шварцмана.

- Хроническую иммунопатологию с повреждением тканей (как, например, при туберкулезе) вызывает, вероятно, дисбаланс в выделении цитокинов, приводящий к неадекватным эффектам.

- Иммунитет к грибам, вероятно, опосредован клетками и сходен с антибактериальным.

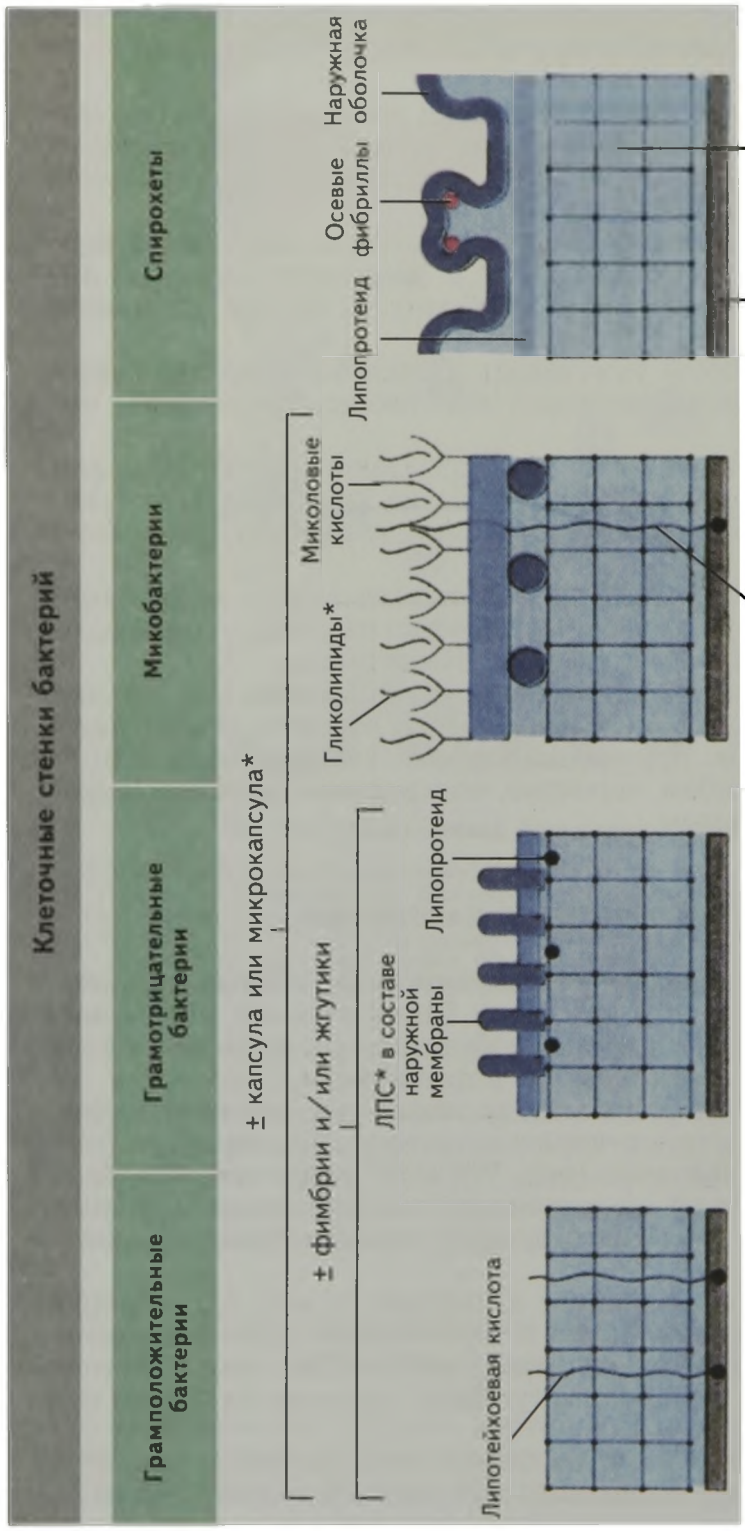
### 3.7.1. ИММУНИТЕТ К БАКТЕРИЯМ

**Механизм антибактериального иммунитета.** Защитные механизмы, действующие при той или иной бактериальной инфекции, соответствуют структуре клеток возбудителя (направлены на их уязвимые участки) и факторам его патогенности.

Механизм иммунитета зависит от типа поверхности бактериальных клеток. Существуют четыре основных типа строения бактериальной клеточной стенки (рис. 59), и по этому признаку бактерии распределяются на следующие группы: грамположительные бактерии; грамотрицательные бактерии; микобактерии; спирохеты.

Наружная мембрана в составе клеточной стенки грамотрицательных бактерий чувствительна к литическому действию комплемента и некоторых цитотоксических клеток. Бактерии с клеточной стенкой другого строения могут быть уничтожены только путем фагоцитоза.

Некоторые бактерии несут на поверхности фимбрии или жгутики, многие покрыты защитной капсулой. Эти поверхностные



Клеточная мембрана

Пептидогликан\* (муреин)

Липоарабиноманнан

**Рис. 59. Типы клеточных стенок микроорганизмов.**

Существуют различные иммунологические механизмы разрушения клеточных стенок различных микроорганизмов. Микробы всех типов обладают цитоплазматической мембраной и пептидогликановой клеточной стенкой. Грамотрицательные бактерии, кроме того, имеют наружную мембрану, внешний слой которой содержит липополисахарид (ЛПС). Лизосомные ферменты и лизоцим разрушают структуру пептидогликана, а катионные белки и комплекс — наружную мембрану грамотрицательных бактерий. Клеточная стенка микобактерий чрезвычайно устойчива к различным воздействиям; по-видимому, ее разрушение возможно только при участии действующих изнутри ферментов самой бактерии к клетке. Некоторые бактерии имеют фимбрины и жгутики, компоненты которых могут служить мишенями для антител. Часть бактерий обладает наружной капсулой, повышающей устойчивость к фагоцитозу или комплементзависимому лизису. Компоненты клеточных стенок, обозначенные на рисунке звездочкой, обладают иммуноаллергическими свойствами, т. е. способствуют усилению иммунного ответа

структуры могут препятствовать фагоцитозу или действию комплемента, но они же являются мишенью для антител, роль которых будет рассмотрена ниже.

Механизмы иммунитета соответствуют также факторам патогенности бактерий. Двумя крайними формами патогенности бактерий можно считать: токсигенность без инвазивности и инвазивность без токсигенности (рис. 60).

Однако в реальности большинство бактерий занимает по характеру патогенности промежуточное положение между этими полюсами, например проявляя в некоторой степени инвазивность, обусловленную, как правило, локальным действием своих токсинов и разрушением тканей ферментами (факторы распространения).

Примером бактерий, которые считаются токсигенными, но не инвазивными, могут служить *Corynebacterium diphtheriae* и *Vibrio cholerae*. Поскольку патогенность этих возбудителей почти полностью обусловлена образованием токсина, для защиты от них, ве-

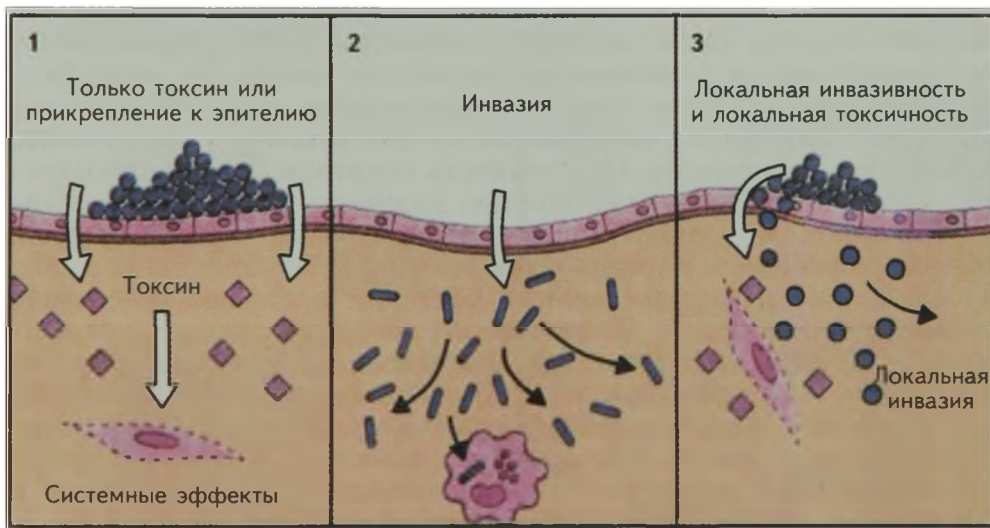


Рис. 60. Механизмы патогенности бактерий.

1. Некоторые бактерии способны вызывать болезнь, не проникая из очага инфекции в ткани организма. Патогенность их обусловлена выделением одного токсина, как, например, у *Corynebacterium diphtheriae* и *Clostridium tetani*, либо способностью прикрепляться к клеткам эпителия и выделять целый ряд токсинов и ферментов, как у стрептококков группы А, вызывающих, в частности, ангину. Для иммунитета в этих случаях может быть достаточно антител, нейтрализующих основной фактор патогенности. 2. Другие бактерии, напротив, не обладают токсигенностью, но вызывают заболевание в результате проникновения в ткани, а иногда и в клетки организма, повреждая их главным образом в результате интенсивного размножения или вследствие иммунопатологических реакций (например, при лепроматозной лепре). Для уничтожения бактерий, проникших в клетки, действуют механизмы клеточного иммунитета. 3. Большинство бактерий занимает промежуточное положение между этими крайними типами патогенности, обладая одновременно локальной инвазивностью, локальной токсигенностью и ферментами, разрушающими внеклеточный матрикс (*Staphylococcus aureus* и *Clostridium perfringens*). В защите против них принимают участие как антитела, так и механизмы клеточного иммунитета

роятно, вполне достаточно действия антител, нейтрализующих токсин, хотя при этом могут быть важны и антитела, которые связываются с бактериями и предотвращают таким образом их прикрепление к эпителию. Патогенность высокоинвазивных бактерий, напротив, не обусловлена, как правило, каким-либо одним токсином, поэтому механизмы иммунитета против них направлены на уничтожение самих клеток возбудителя.

Известны нетоксигенные, но инвазивные штаммы *S. diphtheriae*, вызывающие тяжелую патологию. В некоторых случаях *S. diphtheriae* и *V. cholerae* проникают из очага первичной колонизации через кровоток в другие внутренние органы; обнаружены присущие этим бактериям факторы инвазивности. Все это едва ли позволяет называть возбудителей дифтерии и холеры неинвазивными в строгом смысле слова.

Установлено, что первая линия обороны от бактерий не связана с распознаванием антигенов. Самую первую линию защиты от патогенных бактерий создает барьер, образуемый наружными покровами тела; он препятствует проникновению микроорганизмов или развитию инфекции. Так, кожа и находящиеся в контакте с внешней средой слои эпителия снабжены неспецифическими, или врожденными, механизмами защиты от внедрения микробов. Неповрежденная кожа просто непроницаема для большинства бактерий. Кроме того, для многих из них токсичны выделяемые кожей жирные кислоты. Патогенность некоторых штаммов бактерий коррелирует с их способностью выживать на коже. Эпителиальные покровы очищаются от бактерий благодаря, например, движению ресничек в трахее и току мочи в мочевыводящих путях. Во влагалище и желудке многие бактерии погибают вследствие кислой реакции среды. Влагалищный эпителий секретирует гликоген, который ряд бактерий-комменсалов метаболизирует с образованием молочной кислоты. Вообще комменсалы способны препятствовать инвазии патогенных бактерий, продуцируя антибактериальные белки, названные *колицинами*. Поэтому нарушение нормальной микрофлоры антибиотиками может привести к инфекциям, вызываемым *Candida* или *Clostridium difficile*.

В действительности лишь ничтожной части окружающих нас потенциально патогенных микробов в редких случаях удается проникать в ткани организма.

Действие второй линии обороны связано с распознаванием общих для разных бактерий клеточных компонентов. Проникшие в ткань бактерии вначале могут быть атакованы действующими во внутренней среде организма механизмами врожденного иммунитета. Множество компонентов бактериальных клеток иммунная система распознает без участия антигенспецифических рецепторов В- или Т-лимфоцитов — благодаря действию филогенетически древних механизмов грубого распознавания, появившихся в эволюции раньше антигенспецифических Т-клеток и иммуногло-



булинов. В результате такого распознавания иммунный ответ вызывают общие для разных бактерий клеточные компоненты. Многие бактерии, например непатогенные кокки, по-видимому, устраняются из тканей организма в результате действия именно таких механизмов, без формирования специфического (адаптивного) иммунного ответа. Пути грубого распознавания и его мишени — общие микробные компоненты — перечислены на рис. 61. Примечательно, что используемый для определения примеси бактериального липополисахарида (ЛПС) в лекарственных препаратах «лимулюс-тест» основан на одном из таких механизмов распознавания, обнаруженном у беспозвоночных: в гемолимфе мекхехоста *Limulus polyphemus* следовые количества ЛПС вызывают образование фибрина, волокна которого обездвигивают ЛПС-содержащий инфекционный агент.

Липополисахарид (ЛПС) — компонент наружной мембраны грамотрицательных бактерий — связывается в плазме крови с растворимым маркером CD14 (sCD14) и липопротеидными частицами. Катализатором этого взаимодействия служит липидпереносящий белок, названный ЛПС-связывающим (ЛСБ). Связывание

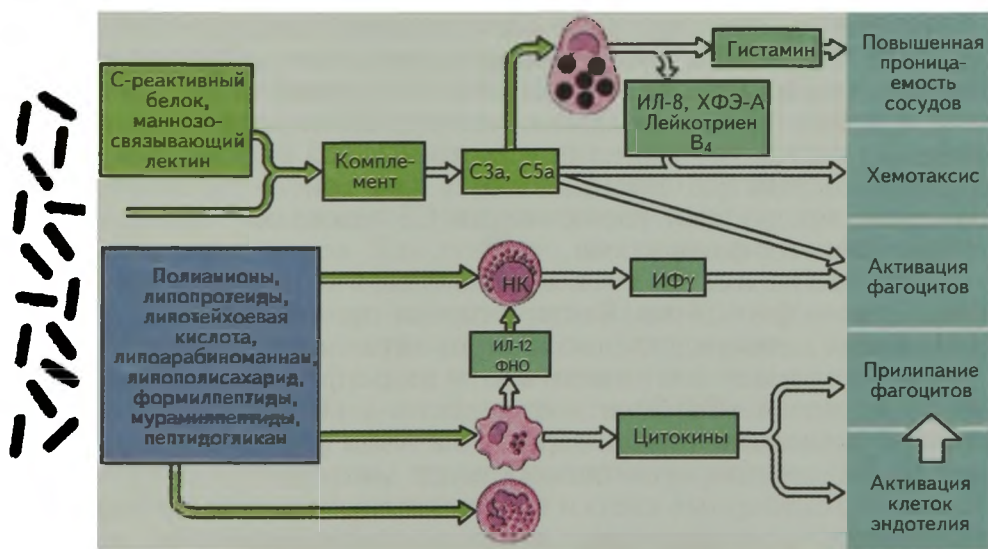


Рис. 61. Независимые от антигенспецифических В- и Т-клеток механизмы антимикробной защиты.

Некоторые общие для разных бактерий структурные компоненты распознаются определенными молекулами плазмы крови и клеточными рецепторами. Это распознавание вызывает следующие эффекты: 1) альтернативную активацию комплемента (при участии C3, B, D, P) с высвобождением C3a и C5a, 2) активацию нейтрофилов, макрофагов и НК-клеток с выделением цитокинов, 3) дегрануляцию тучных клеток, обеспечивающую усиление местного капиллярного кровотока, и 4) стимуляцию адгезии циркулирующих клеток крови и фибрина к эндотелию. Действие этих механизмов и повреждение тканей бактериями вызывают локальное свертывание крови, и образовавшийся фибрин создает преграду для распространения бактерий. (ХФЭ-А — хемотаксический фактор А-эозинофилов)

липопротеидной частицей приводит к нейтрализации ЛПС, связывание же sCD14 вызывает клеточную активацию, поскольку CD14 присутствует в организме также и в форме GPI-связанного мембранного белка (mCD14) нейтрофилов и макрофагов, и ЛПС из комплекса с растворимым CD14 переходит в комплекс с его мембраносвязанной формой. Комплекс mCD14—ЛПС, ассоциируя с другими мембраносвязанными факторами, передает внутрь клетки сигналы, повышающие экспрессию интегринов (молекул межклеточной адгезии) и выделение ФНО $\alpha$  и ИЛ-1. В свою очередь, эти цитокины активируют эндотелиальные клетки и вызывают острофазный ответ в печени. Один из продуктов острофазного ответа — это ЛСБ.

Механизм реакции на ЛПС включает нейтрализацию ЛПС (путем связывания липопротеидными частицами) и, кроме того, перенос этого бактериального продукта на клеточную мембрану лейкоцитов, а также, вероятно, эндотелиальных клеток. Взаимодействуя с молекулами их поверхности, ЛПС может активировать соответствующие эффекторные функции этих клеток (см. рис. 41). Подобным образом могут распознаваться и вызывать ответ и другие филогенетически древние (консервативные) компоненты бактериальных клеток.

Активация приводит также к образованию фрагментов компонента С3а и С5а, вызывающих сокращение гладкомышечных волокон и дегрануляцию тучных клеток (кроме того, С5а связывается с нейтрофилами и активирует их). Последующее высвобождение из клеток гистамина и лейкотриена (LTB $_4$ ) еще сильнее повышает сосудистую проницаемость (см. рис. 61). Опсонизация бактерий продуктами расщепления С3 важна для последующего поглощения их фагоцитами.

Хемотаксис. За счет хемотаксиса в очаг инфекции поступает больше фагоцитов. Бактериальные продукты могут вызывать хемотаксис непосредственно и через активацию компонента.

Выделение цитокинов макрофагами. Фактор некроза опухолей (ФНО) и интерлейкин-1 (ИЛ-1) вызывают системную активацию фагоцитарных клеток и усиление их прилипания к эндотелию, что способствует миграции в воспаленную ткань. Фагоцитарные клетки выделяют также низкомолекулярные хемотаксические пептиды, называемые «хемокинами», которые усиливают ненаправленную подвижность клеток.

Выделение цитокинов нормальными киллерами (НК-клетками). НК-клетки мыши, стимулированные ИЛ-12 или ФНО, могут выделять  $\gamma$ -интерферон (ИФ $\gamma$ ), который, в свою очередь, способен активировать макрофаги. Благодаря действию этого Т-независимого механизма мыши с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (нарушение созревания лимфоцитов) неожиданно проявляют устойчивость, например к *Listeria monocytogenes*.

**Адъювантные эффекты.** Термин «адъювант» происходит от латинского *adiuvare* — помогать. В эксперименте иммунизация растворимыми антигенами вызывает более сильный Т- и В-клеточный ответ в случае их введения вместе с бактериальными продуктами, действующими как адъюванты. Наиболее известен полный адъювант Фрейнда, применяемый только для иммунизации лабораторных животных; он представляет собой масляную суспензию убитых клеток *Mycobacterium tuberculosis*; перед введением животному этот препарат эмульгируют в водном растворе антигена. Адъювантный эффект, по-видимому, обусловлен именно тем, что антигенспецифический иммунный ответ развивается в лимфоидной ткани, уже содержащей упомянутые фармакологически активные бактериальные продукты. Ответ на введенный без них, чистый бактериальный антиген можно рассматривать как искусственную ситуацию, которая не встречается в природе.

«Выбор» необходимого лимфоцитарного ответа. Решающая роль в этом «выборе» принадлежит «адъювантным» компонентам бактерий и механизму раннего выделения цитокинов. Разные виды бактерий оказывают оптимальный адъювантный эффект в отношении различных компонентов иммунной системы. Это может отражать необходимость примерного «таксономического определения» микроба для активации соответствующих эффекторных механизмов иммунного ответа. Вызываемое бактериями выделение цитокинов также вносит свой вклад в выбор адекватной формы иммунного ответа на этом этапе.

**Выбор неадекватных форм иммунного ответа.** Некоторые микробы за счет своих адъювантных свойств способны направлять иммунный ответ по пути не эффективных в данном случае механизмов. Как правило, адъювантные свойства возбудителей полезны для организма-хозяина, но в отдельных случаях они вызывают нарушения иммунорегуляции, в частности активируя неподходящую субпопуляцию Т-хелперов (Тх-клеток). Наиболее наглядный пример этого можно наблюдать при экспериментальном заражении мышей патогенным простейшим *Leishmania major*. При активации Тх2-клеток развивается болезнь со смертельным исходом, тогда как активированные Тх1-клетки обеспечивают полную защиту.

**Шоковые синдромы.** Если происходит слишком быстрое и обильное высвобождение цитокинов, возможно развитие различных, потенциально смертельных синдромов острого повреждения тканей.

**Обеспечение антителами антигенспецифической защиты.** Защитный эффект взаимодействия антител с бактериями зависит от механизма патогенности данного возбудителя. Когда она обусловлена действием бактериального токсина, антителам принадлежит решающая роль в иммунном ответе. Они, например, нейтрализуют дифтерийный токсин, блокируя прикрепление к клеткам-ми-

шениям связывающего участка его молекул. Подобным же образом антитела могут инактивировать локально действующие токсины и ферменты (бактериальные факторы распространения), которые разрушают межклеточное вещество соединительной ткани, а также обездвиживать бактерии, связываясь с их жгутиками.

В защите слизистых оболочек от многих инфекций существенная роль принадлежит секреторному IgA (sIgA). Этот иммуноглобулин блокирует прикрепление бактерий к эпителиальным клеткам. Например, эффекторным механизмом иммунитета при стрептококковой ангине является образование антител к М-белкам стрептококков группы А. Возможно также, что антитела к определенным антигенам бактериальной поверхности способны ингибировать, например, такие важные для роста микробов процессы, как связывание хелатов железа или поглощение других питательных веществ (рис. 62).

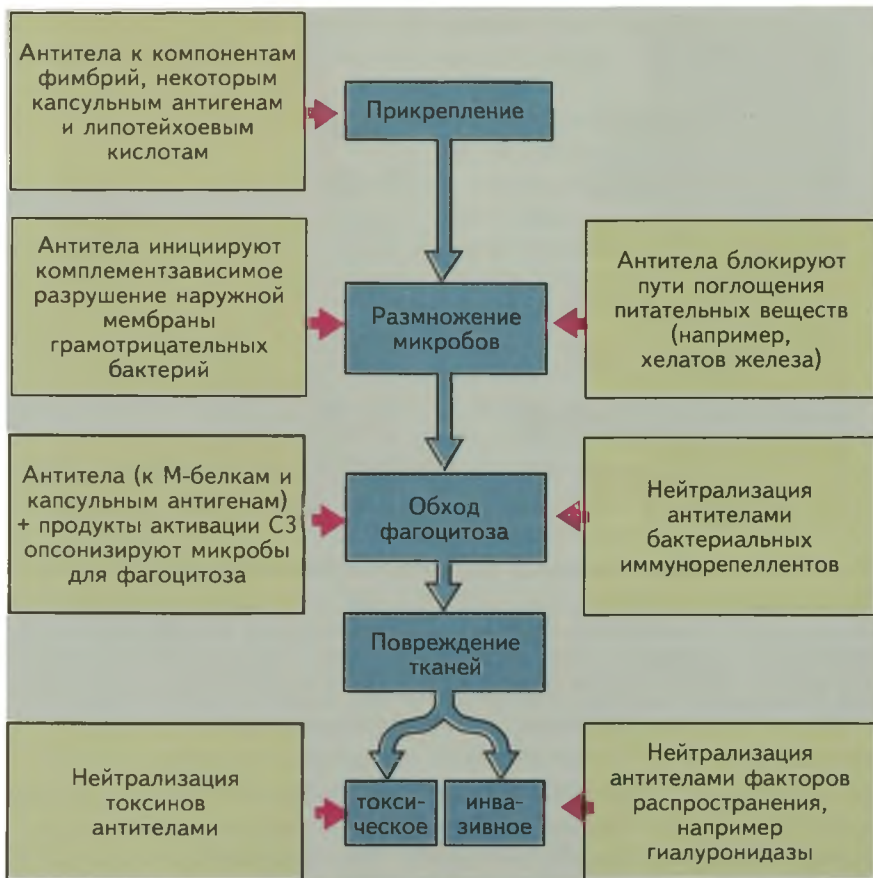
В то же время в случае инфекции, вызванной нетоксигенными микробами, основная функция антител состоит в том, чтобы наиболее эффективно превращать возбудитель инфекции в мишень для комплемента. При участии антител комплемент повреждает бактерии, даже устойчивые к альтернативному (т. е. врожденному) механизму его бактериолитического действия (см. ниже). Кроме того, антитела усиливают связывание и поглощение нагруженных C3b и iC3b бактерий фагоцитами (рис. 63). Самой высокой комплементсвязывающей активностью у человека обладают антитела изотипов IgG1, IgG3 и IgM. Помимо этого, IgG1 и IgG3 имеют наибольшую аффинность к клеточным Fc-рецепторам.

**Способность патогенных бактерий избегать разрушающего действия комплемента.** Капсулы некоторых видов бактерий почти не вызывают альтернативной активации комплемента.

В то же время длинные боковые полисахаридные цепи (О-антиген) бактериального липополисахарида могут связывать C3b, но на некотором удалении от чувствительного к действию комплемента липидного бислоя мембраны, так что лизиса не происходит. Подобным этому механизмом обладают клетки гладких вариантов грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Salmonella* и *Pseudomonas*) — они способны связывать, но затем быстро отщеплять лизирующий мембрану комплекс C5b—C9.

Другие бактерии используют физиологические механизмы организма-хозяина, защищающие собственные клетки от комплемента. Как известно, связывание C3b с клеточной поверхностью может приводить либо к дальнейшему образованию этого фрагмента в результате взаимодействия с фактором В, либо к его инактивации факторами Н и I. Бактериальные капсулы с высоким содержанием сиаловой кислоты (сходные этим с клеточными мембранами хозяина), по-видимому, стимулируют взаимодействие C3b с факторами Н и I. Именно благодаря этому механизму *Neisseria meningitidis*, *E. coli* K1 и стрептококки группы А совер-





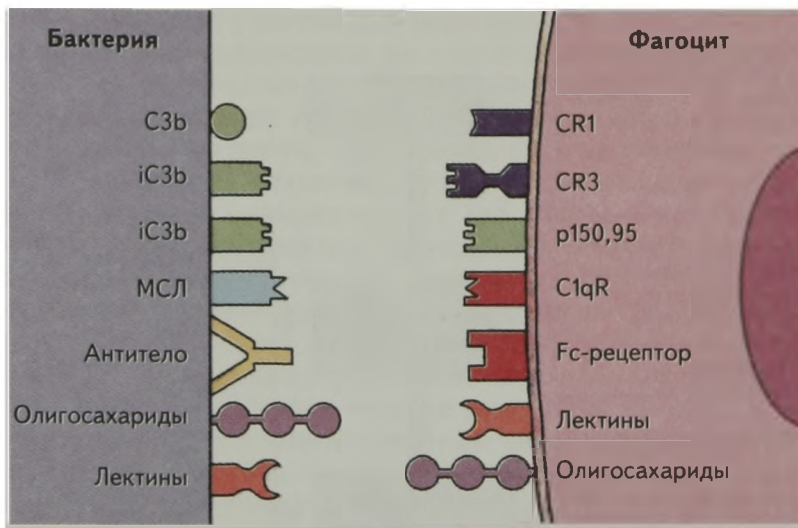
**Рис. 62. Функции антител в противомикробной защите.**

Стадии бактериальной инвазии (синий цвет) и защитные эффекты антител (желтый цвет). Антитела к антигенам фимбрий, некоторым капсульным антигенам и липотейхоевым кислотам блокируют прикрепление бактерий к плазматической мембране клеток хозяина. Активированный антителами комплемент разрушает наружную мембрану грамотрицательных бактерий. Антитела непосредственно блокируют белки бактериальной поверхности, ответственные за поглощение питательных веществ из внешней среды. Антитела к М-белкам и капсульным антигенам бактерий опсонизируют бактериальные клетки для фагоцитоза, осуществляемого при участии Fc- и C3-рецепторов фагоцитов. Кроме того, антитела нейтрализуют иммунорепелленты (бактериальные факторы, нарушающие нормальный хемотаксис или фагоцитоз), токсины бактерий, а также выделяемые ими факторы распространения, которые способствуют инвазии, например, путем разрушения межклеточного вещества соединительной ткани или фибрина

шенно неуязвимы для комплемента. Более того, М-белок стрептококков группы А действует как акцептор фактора Н, усиливая тем самым диссоциацию комплекса C3bB. Эти бактерии обладают также геном C5a-протеазы.

Как описано выше, некоторые бактерии, главным образом грамотрицательные, непосредственно лизируются комплементом. Опубликованы также данные о способности НК-клеток и даже





**Рис. 63. Взаимодействие между бактериями и фагоцитарными клетками.**

Связыванию бактерий с мембраной фагоцита способствует ряд молекул. Произойдет ли поглощение микробной клетки фагоцитом и ее последующий лизис, зависит от характера этого взаимодействия. За исключением компонентов комплемента, антител и маннозсвязывающего лектина (МСЛ), которые присоединяются к бактериальной поверхности, все остальные молекулы на поверхности бактерий, участвующие в связывании, относятся к конститутивно экспрессируемым бактериальным компонентам

цитотоксических Т-клеток (Тц) при простом контакте лизировать бактерии некоторых видов, как правило, грамотрицательные.

Однако большую часть бактерий уничтожают фагоциты. Процесс фагоцитоза состоит из нескольких стадий (см. рис. 47).

**Связывание фагоцитов с микробными клетками.** От этой важной стадии фагоцитоза зависит последующее поглощение микробов фагоцитами и сопряженная с поглощением активация механизмов лизиса. В связывании может участвовать ряд молекул. *Лектины микробных клеток*, например специфичный к маннозе лектин, присутствующий на поверхности фимбрий у *E. coli*. *Лектины фагоцитарных клеток* также имеют определенное значение. Особенно важны в качестве лектинов при фагоцитозе рецепторы комплемента CR3 и CR4 (p150,95) и структурно близкий к ним лейкоцитарный функциональный антиген-1 (LFA-1), относящийся к интегринам. Все эти молекулы поверхности обладают большим числом активных центров, специфичных к различным углеводным компонентам клеточных полимеров, и могут, в частности, связываться с  $\beta$ -глюканами и ЛПС грамотрицательных бактерий. *Компоненты комплемента*, связавшиеся с микробной поверхностью благодаря классической или альтернативной активации. Недавно было установлено, что комплемент может связываться со специфичным к маннозе сывороточным лектином, фиксированным на бактериальной клетке и аффинным, кроме того, к рецеп-

торам для  $Clq$  фагоцитов. *Fc-рецепторы* фагоцитарных клеток способны взаимодействовать с антителами, связавшимися с бактериальными клетками (см. рис. 63).

**Запуск поглощения.** Связывание микробной клетки с рецептором на плазматической мембране макрофага не обязательно приводит к поглощению. Например, частицы, образованные зимозаном (дрожжевой полисахарид), при связывании с глюканспецифичным центром рецептора CR3 поглощаются макрофагом, тогда как эритроциты, нагруженные  $iC3b$ , не поглощаются, хотя эти компоненты комплемента также взаимодействуют с CR3.

**Запуск бактерицидных механизмов.** Подобно тому, как связывание мембранных рецепторов фагоцита с бактерией не гарантирует ее поглощения, само поглощение также не обязательно ведет к запуску бактерицидных механизмов. В частности, клетки *Yersinia pseudotuberculosis* сами индуцируют свое поглощение фагоцитами, но при этом дерепрессируют синтез фактора, модулирующего сигнал эндцитоза, так чтобы внутриклеточного разрушения микробных клеток не происходило.

Поглощенная фагоцитом микробная клетка подвергается действию нескольких бактерицидных механизмов.

**Кислородзависимые бактерицидные механизмы.** Реакционно-способные метаболиты кислорода (РМК). Их образование связано с активностью фермента, локализованного в клеточной мембране фагоцита. Этот фермент восстанавливает  $O_2$  с образованием супероксидного анион-радикала ( $\cdot O_2^-$ ) — токсичного РМК. В свою очередь, супероксидные радикалы превращаются в другие РМК. У больных хроническим гранулематозом фагоцитарные клетки не образуют РМК и не способны поэтому уничтожать некоторые виды микроорганизмов. Это заболевание характеризуется очагами хронического воспаления, которое вызывают возбудители гнойных инфекций, например стафилококки. В фагоцитарных клетках, содержащих пероксидазу, образуются гипохлорит и подобные ему токсичные оксиданты. При наследственном дефиците миелопероксидазы возможно нарушение бактерицидной активности фагоцитов. Тканевые макрофаги не содержат пероксидазу и поэтому дают отрицательный результат в цитохимических тестах, основанных на пероксидазной активности.

Реакционно-способные метаболиты азота (РМА). Другой бактерицидный механизм основан на образовании токсичного для бактерий и опухолевых клеток оксида азота (NO). Для оптимального действия этого механизма в макрофагах мыши требуются активация их ИФ $\gamma$  и запуск механизма фактором некроза опухолей. Предположительно под действием NO в этих клетках погибают микобактерии. Гораздо труднее получить образование значительного количества NO в макрофагах. Как правило, для этого необходима целая серия стимулов, например воздействие нескольких цитокинов с одновременной перекрестной

сшивкой молекул CD23 (рецептор IgE). По данным иммуногистохимического анализа, у человека макрофаги воспалительного очага иногда экспрессируют в значительном количестве индуцибельную синтазу оксида азота (иСОА), но не содержат достаточного количества тетрагидробиоптерина — обязательного кофактора для образования NO.

**Кислороднезависимые бактерицидные механизмы.** Роль этих механизмов, возможно, более существенна, чем предполагалось ранее. Так, фагоциты больных хроническим гранулематозом неспособны продуцировать РМК, а в случае наследственного дефицита миелопероксидазы — иодноватистую и хлорноватистую кислоты, но тем не менее они могут уничтожать разнообразные микроорганизмы. Частично это может быть обусловлено действием NO, но многие бактерии уничтожаются в анаэробных условиях, что указывает на существование других, не зависящих от кислорода бактерицидных механизмов, и некоторые из них идентифицированы.

**Катионные антибиотикоподобные белки фагоцитарных клеток.** В макрофагах кролика и полиморфно-ядерных гранулоцитах человека обнаружены дефензины — богатые остатками цистеина и аргинина катионные пептиды из 30...33 аминокислотных остатков. Они составляют в этих клетках от 30 до 50 % всех белков гранул. Дефензины вызывают образование ионных каналов в мембране микробной клетки. Вероятно, они начинают действовать сразу после образования фаголизосомы, еще до подкисления ее содержимого. Дефензины могут уничтожать самые разнообразные микробы, например *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Cryptococcus neoformans* и обладающий оболочкой вирус простого герпеса. Кроме того, в фагоцитарных клетках обнаружены катионные белки с различными рН-оптимумами, в частности катепсин G и азуроцидин, родственные эластазе, но обладающие неферментативной антибиотической активностью в отношении грамотрицательных бактерий.

**Другие антимикробные механизмы.** После слияния лизосом содержимое фаголизосомы временно — на 10...15 мин — подщелачивается, после чего рН понижается, т. е. происходит подкисление. Возможно, низкий рН сам по себе обеспечивает уничтожение некоторых микробов, но более вероятно, что он необходим для действия лизосомных ферментов, имеющих оптимум рН в кислой области. Некоторые грамположительные бактерии могут погибать под действием лизоцима — он разрушает легкодоступный пептидогликановый слой их клеточной стенки. В уничтожении бактерий участвует и ряд других молекул, например лактоферрин, продуцируемый полиморфно-ядерными гранулоцитами. Он связывает железо, недоступное в такой форме для поглощения бактериями даже в кислой среде (при избытке железа полиморфно-ядерные гранулоциты теряют обусловленную лактоферрином способность уничтожать бактерии некоторых видов).

Возможно, все эти антимикробные механизмы функционируют только после слияния фагосом с лизосомами.

Дополнительная активация макрофагов лимфокинами. Для полной активации макрофагов *in vivo* необходимо воздействие на них лимфокинов, выделяемых Т-клетками в ходе иммунного ответа. Чаще всего на макрофаги воздействует ИФ $\gamma$ , стимулирующий кислородзависимые и другие бактерицидные механизмы. Имеются также сообщения об активации фагоцитов под действием ИЛ-2, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и других цитокинов. Для активации определенных функций фагоцитарных клеток требуется воздействие различных комбинаций цитокинов.

Лимфокины оказывают на фагоциты *in vivo* два основных эффекта — привлечения и активации, причем относительное значение каждого из них варьируется в зависимости от микроорганизма. Например, для иммунитета к *L. monocytogenes* наиболее важен эффект привлечения фагоцитов в очаг инфекции, поскольку клетки этой бактерии погибают под действием РМК внутри неактивированных моноцитов и нейтрофилов. Для устранения *M. tuberculosis*, напротив, требуется прежде всего активация нейтрофилов и моноцитов, так как эти микобактерии способны выживать внутри них.

**Внутриклеточные возбудители инфекций могут «скрываться» в клетках иммунной системы.** Способность Тц-клеток уничтожать инфицированные клетки. Некоторые бактерии способны выживать и активно размножаться внутри поврежденных или метаболически неадекватных фагоцитов хозяина. Кроме того, они могут избегать уничтожения, перемещаясь внутри макрофагов из фагосом в цитоплазму. Так, клетки *Listeria monocytogenes* выходят из фагосом, так как выделяют ферменты, разрушающие мембрану этих органелл. Другие возбудители, например *Mycobacterium leprae*, способны вызывать свое поглощение клетками, которые обычно не относятся к фагоцитарным и не обладают достаточной антибактериальной активностью. В этом случае микробные клетки не могут быть уничтожены активированными фагоцитами или другими бактерицидными механизмами, прежде чем будут освобождены из клеток, где они «спасаются». Их высвобождение осуществляют Тц-клетки, разрушающие инфицированные клетки. Если исключить Т-клеточное распознавание молекул МНС класса I, устранив методом генного нокаута из мышиноного генома ген  $\beta_2$ -микроглобулина, мыши становятся чрезвычайно чувствительны к *M. tuberculosis*. Это свидетельствует о существенной роли цитотоксических Т-клеток в иммунитете к микобактериям.

**Цитотоксичность  $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов.**  $\gamma\delta$ -Т-лимфоциты, как правило, обладают цитотоксичностью и способны разрушать инфицированные клетки. Значительная часть Т-клеток, несущих  $\gamma\delta$ -рецептор, по-видимому, пролиферирует в ответ на бактериальные



антигены. Некоторые субпопуляции этих лимфоцитов избирательно заселяют («хоминг») эпителиальные покровы. Поэтому можно предполагать, что им принадлежит существенная, пока не выясненная роль в антимикробном иммунитете. Обычно они обладают цитотоксичностью и, возможно, разрушают инфицированные клетки.

Убежищем для некоторых бактерий, таких, как *M. leprae*, инвазивные виды *Shigella*, *Salmonella*, а также *Rickettsia* и *Chlamydia*, могут становиться клетки тканей, не относящихся к иммунной системе. Как указано выше, такие инфицированные клетки, возможно, уничтожаются цитотоксическими Т-клетками. Наряду с этим рост внутриклеточно локализованных возбудителей может подавляться в результате активации фибробластов ИФγ; вероятно при этом действует NO-механизм, которым обладают не только фагоцитарные клетки.

Чрезмерный выброс цитокинов. Это может привести к эндотоксическому шоку. Эндотоксический (септицемический) шок возникает при септицемии как следствие вызванного бактериальными продуктами обильного поступления в циркуляцию цитокинов. Как правило, шок вызывает эндотоксин — ЛПС грамотрицательных бактерий, хотя аналогичный синдром возможен и при грамположительной септицемии. Шоковый синдром представляет угрозу для жизни и проявляется как лихорадка, циркуляторный коллапс, диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови и геморрагический некроз; эти процессы приводят к недостаточности многих органов и систем.

Если ввести кролику суспензию клеток грамотрицательных бактерий, сначала внутрикожно и через 24 ч внутривенно, в месте первой инъекции появится геморрагический некроз. Этот эффект назван по имени исследователя, наблюдавшего его впервые, реакцией Швартцмана. Кроме того, Г. Швартцманом было установлено, что две внутривенные инъекции с интервалом 24 ч вызывают системную реакцию, которая обычно приводит к циркуляторному коллапсу и двустороннему некрозу корковой части почек. Этот феномен, описанный также Г. Санарелли, называют системной реакцией Швартцмана или реакцией Санарелли—Швартцмана. Иногда она сопровождается некрозами в поджелудочной железе, гипофизе, надпочечниках и слизистой оболочке пищеварительного тракта. Для нее характерно острое диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови и тромбоз.

Как теперь известно, и многие другие инфекционные агенты, в том числе стрептококки, микобактерии, представители рода *Naemophilus*, коринебактерии и вирус коровьей оспы, способны «подготавливать» кожу таким же образом. «Разрешающий» эффект внутривенной инъекции обусловлен действием эндотоксина (ЛПС). Повреждение тканей при реакции Швартцмана в ранних публикациях связывали с альтерацией эндотелия, отложением



фибрина, скоплениями и дегрануляцией нейтрофилов и тромбоцитов. Эти процессы действительно имеют место, но позднее выяснилось, что ключевыми медиаторами описанных реакций служат ФНО $\alpha$ , ИФ $\gamma$ , ИЛ-12 и ИЛ-1. Введение ФНО $\alpha$  в очаг воспаления (вызванного предварительной инъекцией бактерий) дает некроз аналогичного типа; по всей вероятности, введенный ФНО $\alpha$  действует так же, как в том случае, когда он доставляется кровотоком после внутривенного введения ЛПС.

**Феномен Коха.** Это вызванная Т-клетками некротическая реакция в очагах микобактериального поражения и при внутрикожной туберкулиновой пробе. Некротическую реакцию на антигены *M. tuberculosis* впервые наблюдал Роберт Кох у морских свинок, зараженных туберкулезом. Этот феномен, по меньшей мере отчасти, обусловлен высвобождением цитокинов в очагах вызванного Т-клетками воспаления (проявление гиперчувствительности туберкулинового типа) и, по-видимому, имеет отношение к патогенезу туберкулеза у человека и животных. Как и при реакции Шварцмана, эти очаги могут быть чрезвычайно чувствительны к тканеповреждающим эффектам цитокинов, особенно когда активность Тх1- и Тх2-клеток проявляется одновременно.

**Суперантигены.** Суперантигены распознаются без процессинга и презентации. Суперантигенами названы недавно идентифицированные компоненты бактерий, связывающиеся непосредственно (т. е. без процессинга) с переменными областями  $\beta$ -цепей ( $V\beta$ ) антигенспецифических рецепторов некоторых субпопуляций Т-клеток и одновременно с молекулами МНС антигенпрезентирующих клеток (АПК). В результате такого связывания все Т-клетки, экспрессирующие соответствующий продукт  $V\beta$ -гена, становятся активированными в отсутствие процессинга антигена и его презентации в виде пептидов в пептидсвязывающей полости молекул МНС, т. е. в отсутствие того, что требуется для нормальной Т-клеточной активации. Суперантигены обнаружены у стафилококков, стрептококков, микоплазм и других инфекционных агентов. Биологическая роль суперантигенов в качестве инструментов бактериальной адаптации остается неясной, но одним из основных их эффектов может быть интоксикация, вызванная массивным выбросом цитокинов (лимфокинов) многочисленными, одновременно стимулированными Т-клетками. По-видимому, именно таков патогенез синдрома токсического шока, вызываемого стафилококковыми токсинами, в частности TSST-1 (от англ. toxic shock syndrome toxin).

**Белки теплового шока** — высококонсервативные иммунодоминантные антигены. Найденные у всех эукариотических и прокариотических клеток белки теплового шока выполняют важные функции в сборке, укладке и транспорте других молекул. Эти белки образуются в значительном количестве в клетках при аномально высокой температуре или при стрессе

иной природы, что, в частности, отражает их роль в стабилизации белковых структур. Аминокислотные последовательности белков теплового шока высококонсервативны (однотипны) у различных организмов; в связи с этим высказано предположение, что, поскольку бактериальные белки теплового шока настолько сходны с аналогичными белками человека, они могут вызывать аутоиммунный ответ. Парадоксальным образом при протективном иммунном ответе белки теплового шока многих патогенных микроорганизмов воспринимаются иммунной системой вопреки такому сходству как иммунодоминантные (целевые) антигены. Это, однако, можно рассматривать как эволюционное преимущество, поскольку при помощи Т-клеток, распознающих набор консервативных эпитопов белков теплового шока, организм-хозяин способен, по-видимому, распознавать любой патогенный организм.

### 3.7.2. ИММУНИТЕТ К ГРИБАМ

О тонких механизмах иммунитета к микозам известно очень немного, но предполагается, что они в основном подобны механизмам устойчивости к бактериальным инфекциям. Микозы можно разделить на четыре основных типа.

Поверхностные микозы вызывают дерматофиты, как правило, поражающие только отмершие кератинизированные компоненты эпидермиса кожи, волосы.

Подкожные микозы, например хромомикоз, споротрихоз и мицетомы, при которых в подкожной клетчатке образуются хронически воспаленные изъязвляющиеся узелки. Эти заболевания вызывают грибы-сапрофиты, проникающие в организм через травмированную кожу.

Респираторные микозы (мукомикоз, кокцидиомикоз), скрытно или остро протекающие очаговые (изредка диссеминированные) поражения легких, часто с образованием специфических гранулем.

Кандидоз — поверхностное (редко системное) поражение кожи и слизистых оболочек, вызываемое обычным компонентом микрофлоры человека, грибом-комменсалом *Candida albicans*.

Основу устойчивости к микотической инфекции составляет, по-видимому, клеточный иммунитет. Кожные инфекции, вызываемые грибами, обычно протекают как самоограничивающиеся, оставляя некоторую, весьма ограниченную устойчивость к повторному заражению. Основой этой устойчивости скорее всего служит клеточный иммунитет, судя по тому, что у выздоровевших пробы на гиперчувствительность замедленного (IV) типа с грибными антигенами дают положительный результат, тогда как у больных с хроническими поражениями, как правило, отрицатель-

ный. Т-клеточный иммунитет важен как защитный механизм и при глубоких микозах — иногда устойчивость к ним удается перенести иммунными Т-клетками. Предположительно Тх-клетки выделяют цитокины, мобилизующие макрофаги на уничтожение грибов. При респираторных микозах клинические проявления до некоторой степени напоминают наблюдаемые при лепре. Нарушение иммунофизиологии под действием иммунодепрессивных лекарственных средств или подавление антибиотиками нормальной микрофлоры могут стать причиной поражения организма грибами рода *Candida*. Кандидоз часто развивается также при синдромах иммунологической недостаточности (тяжелый комбинированный иммунодефицит, аплазия тимуса, СПИД и т. п.), что свидетельствует о важном значении иммунной системы для удержания грибов в нормальном статусе комменсалов.

Кроме того, имеются доказательства участия полиморфно-ядерных нейтрофилов в иммунном ответе при респираторных микозах, например вызванных муковыми грибами. Важная роль в устойчивости к грибам принадлежит, возможно, катионным белкам дефензинам: фагоциты больных с нарушенными механизмами восстановления  $O_2$  способны тем не менее уничтожить дрожжевые клетки и мицелий грибов почти так же эффективно, как в норме. Против *Cryptococcus* активно действует NO-механизм, и не исключено, что он важен для устойчивости ко многим грибам.

**Контрольные вопросы и задания.** 1. Поясните сущность теорий иммуногенеза Гауровица—Полинга, Бернета—Феннера и Эрне. 2. Изложите современные представления об иммунопозе. 3. В чем сущность теории боковых цепей П. Эрлиха? 4. Назовите источники и механизмы разнообразия антител. 5. Чем определяется функциональная аффинность, или авидность, взаимодействия антител с антигеном? 6. Изложите механизм связывания антител с антигеном. 7. В чем сущность распознавания антигена Т-клетками? 8. Что такое прессинг и презентация антигена? 9. Назовите основные функции цитокинов и хелперных Т-клеток. 10. Дайте определение цитокинам и назовите их основные функции. 11. В чем роль цитокинов в иммунном ответе? 12. Назовите механизмы эффекторных и репарирующих функций макрофагов? 13. Опишите механизмы взаимодействия клеток при гуморальном иммунном ответе. 14. В чем отличительные особенности гиперчувствительности I, II, III и IV типов? 15. Назовите принципиальные отличия иммунного ответа на внедрение бактерий и грибной флоры.

---

## Глава 4

# РЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА



- Иммуный ответ регулируется разнообразными механизмами, которые обеспечивают восстановление исходного состояния иммунной системы, после того как реакция на данный антиген перестает быть необходимой.

- Конечный результат любого иммунного ответа зависит от многих факторов, в том числе от свойств антигена, его дозы и пути поступления, а также от генетических особенностей организма.

- Иммуноглобулины могут играть в иммунном ответе положительную роль, действуя как антиидиотипические антитела или образуя иммунные комплексы. Возможна и отрицательная роль иммуноглобулинов в иммунном ответе, когда они ослабляют антигенный стимул, маскируя детерминанты антигена в результате связывания или способствуя выведению антигена из организма.

- Иммуный ответ может зависеть от способности антигенпрезентирующих клеток обеспечивать костимуляцию Т-лимфоцитов.

- Регуляцию иммунного ответа способны осуществлять Т-клетки. Т-лимфоциты CD4<sup>+</sup> могут подавлять последующие иммунные ответы. Регуляторный эффект оказывают и Т-клетки CD8<sup>+</sup>. Продукция цитокинов Т-лимфоцитами влияет на тип иммунного ответа, вызываемого антигеном.

- Генетически иммунный ответ зависит как от генов МНС, так и от не относящихся к МНС генов. Кроме того, поскольку на него влияет нейроэндокринная система, он зависит и от генетических факторов, определяющих функции этой системы.

Иммуный ответ, как и все биологические функции, находится под контролем разнообразных регуляторных механизмов. Эти механизмы обеспечивают восстановление исходного, «неактивного» состояния иммунной системы, когда иммунный ответ на данный антиген более не требуется. Эффективный иммунный ответ — результат взаимодействия между антигеном и целой сетью иммунокомпетентных клеток. Характер иммунного ответа, как в количественном, так и в качественном отношении, зависит от многих факторов, в том числе от типа антигена, его дозы и пути поступления, от свойств антигенпрезентирующих клеток (АПК) и генетических особенностей организма, а также от предшествующей



шего контакта иммунной системы с данным или перекрестно реагирующим антигеном. На иммунный ответ способны влиять специфические антитела.

#### **4.1. АНТИГЕН КАК ФАКТОР ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ. АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ**

Активация Т- и В-лимфоцитов происходит в результате эффективного связывания антигенного материала их антигенспецифическими рецепторами. Рецепторы Т-клеток взаимодействуют не с нативным антигеном, а с образовавшимися в результате его процессинга пептидными фрагментами, ассоциированными с молекулами МНС класса I или II. На результат иммунного ответа существенно влияет природа антигена, его доза и способ введения.

Тип иммунного ответа зависит от природы антигена. Различные антигены индуцируют иммунные ответы разных типов. Полисахаридные капсульные антигены бактерий обычно вызывают только гуморальный ответ (образование IgM), тогда как их белковые антигены — и клеточный, и гуморальный ответы. Микроорганизмы, локализующиеся внутри клеток организма-хозяина, в частности некоторые бактерии, паразиты и вирусы, индуцируют клеточный иммунный ответ, а растворимые белковые антигены — гуморальный. Клеточный иммунный ответ вызывают и такие антигены, как кремнийсодержащие соединения.

Эффективный иммунный ответ обеспечивает элиминацию антигена из организма. После этого лимфоциты возвращаются в состояние покоя (для поддержания пролиферации Т- и В-клеток необходим постоянный контакт с антигеном). Однако некоторые антигены (например, компоненты внутриклеточно локализующихся микроорганизмов) могут не столь эффективно удаляться из организма, что приводит к продолжению иммунного ответа в течение длительного времени с патологическими последствиями для организма.

В больших дозах антиген может индуцировать толерантность. Введение очень высокой дозы антигена нередко вызывает развитие специфической Т-клеточной, а иногда и В-клеточной толерантности. Подобный феномен часто наблюдается в случае инъекции антигена новорожденным мышам. Долгое время причиной этого считали незрелость иммунной системы. Однако теперь установлено, что у новорожденных мышей могут развиваться и полноценные иммунные реакции; отсутствие же иммунного ответа в ряде случаев связано не с незрелостью Т-клеток, а с так называемым иммунным отклонением, при котором доминирует образование непротективных цитокинов II типа вместо протективных цитокинов I типа. Как установлено, Т-независимые полисахаридные

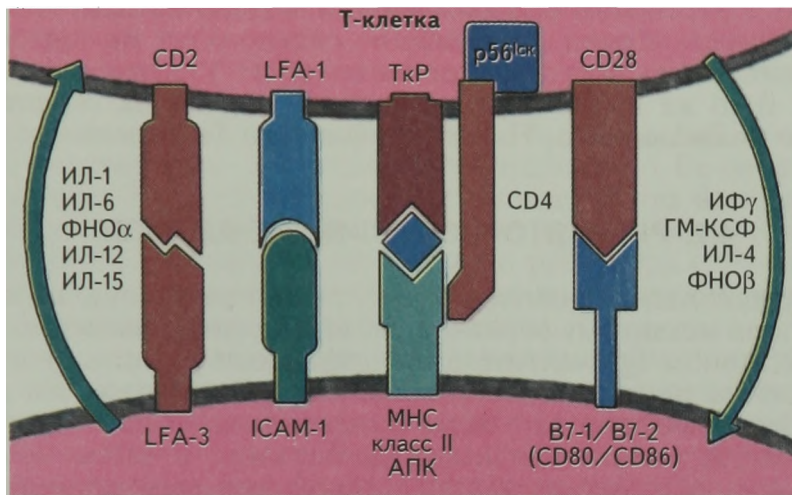
антигены при введении в больших дозах индуцируют толерантность В-клеток.

В зависимости от пути поступления антигена иммунный ответ может возникнуть или отсутствовать. Как установлено, немаловажное значение для возникновения иммунного ответа имеет способ введения антигена. Антигены, введенные подкожно или внутривенно, вызывают иммунный ответ, тогда как при внутривенной инъекции, приеме внутрь или применении в виде аэрозоля они могут индуцировать толерантность либо иммунное отклонение. (В последнем случае вместо ответа, опосредуемого Т-лимфоцитами  $CD4^+$  одного типа, возникает реакция, опосредуемая Т-лимфоцитами  $CD4^+$  другого типа.) Например, грызуны в случае приема овальбумина (ОА) или основного белка миелина (ОБМ) с кормом не реагируют на последующую стимуляцию соответствующим антигеном. Более того, применение ОБМ защищает животных от развития аутоиммунного заболевания — экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ). Этот феномен может быть использован с терапевтической целью при аллергических расстройствах; недавно проведенные исследования показали, что пероральное введение Т-клеточного эпитопа аллергена Der p1 клеща домашней пыли может обеспечить толерантность к нативному антигену. Механизм(ами) толерантности при этом может быть как анергия, так и иммунное отклонение.

Подобные наблюдения были сделаны и при использовании антигенов в форме аэрозолей. Эксперименты, проведенные на мышах, показали, что введение энцефалитогенного пептида интраназально в виде аэрозоля снижает интенсивность развития ЭАЭ, который возникает при последующем обычном (подкожном) способе введения пептида. Этот факт также может иметь значение для разработки методов лечебного воздействия, поскольку ингибировать ответ способен не только данный антиген, применяемый в виде аэрозоля, но и другие антигены, вызывающие ЭАЭ.

Наглядный пример того, как может влиять на иммунный ответ способ введения антигена, дало изучение инфекции, вызываемой у мыши вирусом лимфоцитарного хориоменингита (ВЛХМ). У мышей, примированных пептидом в неполном адьюванте Фрейнда путем его подкожного введения, развивается иммунитет к ВЛХМ. Однако если тот же пептид введен внутрибрюшинно, животные становятся толерантными и теряют способность элиминировать вирус.

Природа АПК, осуществляющих первоначальное представление антигена, может определять тип вызываемой им реакции — полноценный иммунный ответ или толерантность. Для эффективной активации Т-клеток необходимо присутствие на поверхности АПК костимулирующих молекул. Поэтому презентация антигена дендритными клетками или активированными макрофага-



**Рис. 64. Молекулы, наиболее важные для презентации антигена.**

Молекулы, принимающие участие во взаимодействии между Т-клетками и АПК. Показаны также различные цитокины и направленность их действия

ми, которые экспрессируют в большом количестве антигены МНС класса II и наряду с ними костимулирующие молекулы, ведет к высокоэффективной активации Т-клеток (рис. 64). Кроме того, взаимодействие молекул CD40L, экспрессируемых на поверхности активированных Т-лимфоцитов, и CD40 на поверхности дендритных клеток обеспечивает интенсивную продукцию этими последними ИЛ-12, необходимого для эффективного Тх1-ответа. Если же антиген презентируют Т-клеткам «непрофессиональные» АПК, которые неспособны обеспечить костимуляцию, возникает ареактивность или иммунное отклонение. Так, представление антигена нестимулированным Т-клеткам покоящимися В-лимфоцитами вызывает не активацию, а толерантность Т-клеток. Адьюванты могут способствовать развитию иммунного ответа тем, что они индуцируют экспрессию антигенов МНС и костимулирующих молекул с большой плотностью на поверхности АПК. Иллюстрацией этого служат результаты недавно проведенных экспериментов по изучению механизмов толерантности у новорожденных животных как более чувствительных к индукции толерантности, чем взрослые. Эти исследования показали, что резистентность к ЭАЭ, вызываемая введением ОБМ в неполном адьюванте Фрейнда, связана с развитием доминантного Тх2-ответа. В возникновении ЭАЭ участвуют Тх1-клетки, а предшествующий Тх2-ответ на ОБМ предотвращает патологический Тх1-ответ.

Значение дендритных клеток в индукции ответа, опосредуемого цитотоксическими Т-лимфоцитами (Тц), установлено в экспе-

риментах с переносом новорожденным мышам-самкам клеток от мышей-самцов. Самки, получившие спленоциты, не продуцировали Тц-ответ на последующее введение Н-У-антигена мышей-самцов. В то же время перенос дендритных клеток обеспечивал развитие полноценного, Н-У-специфичного Тц-ответа.

## 4.2. РЕГУЛЯТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ АНТИТЕЛ

Как установлено, антитела осуществляют регуляцию иммунного ответа по механизму обратной связи. Пассивно введенные вместе с антигеном IgM-антитела специфически усиливают иммунный ответ на данный антиген, тогда как IgG-антитела его подавляют. Первоначально это было выявлено на модели пассивной иммунизации поликлональными антителами, а затем получило подтверждение в экспериментах с использованием моноклональных антител.

Способность пассивно введенных антител усиливать или подавлять иммунный ответ учитывают при вакцинации и используют в клинической практике.

Иммунизацию некоторыми вакцинами (например, против рожи свиней, эмкара) проводят обычно животным старше 3-месячного возраста, поскольку в течение по крайней мере 3 мес после рождения в крови молодняка имеется большое количество IgG-антител, полученных от матери, а присутствие таких пассивно приобретенных антител во время вакцинации может существенно снизить ее эффективность.

В случаях резус (Rh)-несовместимости введение резус-отрицательной матери антител анти-RhD предотвращает первичную сенсибилизацию Rh<sup>+</sup>-эритроцитами плода, возможно, в результате элиминации чужеродного антигена (эритроциты плода) из крови матери. Механизмы модуляции иммунного ответа под влиянием антител еще недостаточно полно выяснены. Предполагается, что повышение продукции бляшкообразующих клеток при действии IgM-антител может быть обусловлено двумя факторами.

Содержащие IgM иммунные комплексы поглощаются с участием Fc-рецепторов или C3-рецепторов на поверхности АПК и процессируются более эффективно, чем свободный антиген.

Содержащие IgM иммунные комплексы стимулируют образование антиидиотипических антител против IgM, которые усиливают иммунный ответ.

Опосредованная IgG супрессия может осуществляться разными путями.

**Блокирующее действие антител.** Пассивно введенные антитела связывают антиген, конкурируя с В-клетками. В этом случае эффект IgG-антител существенно зависит от их концентрации, а также от соотношения их аффинности к антигену с аффинностью



В-клеточных рецепторов. Успешно конкурируют с антителами за антиген только те В-клетки, которые обладают высокоаффинными рецепторами, причем механизм конкуренции не зависит от Fc-фрагмента антител.

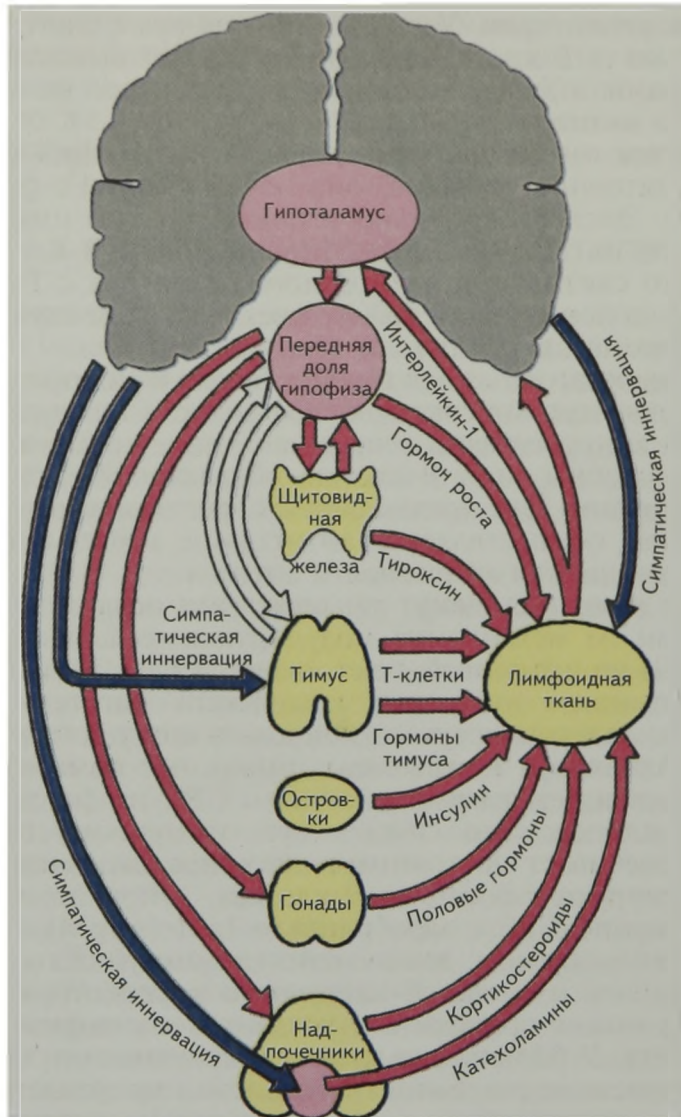
**Перекрестное связывание рецепторов.** Антитела IgG также оказывают регуляторное действие; оно обусловлено Fc-фрагментом их молекулы. Экспериментально установлено, что иммуноглобулин способен ингибировать дифференцировку В-клеток путем перекрестного связывания антигенного рецептора с Fc-рецептором (FcγRII) на поверхности той же клетки. В этом случае антитела могут распознавать различные эпитопы.

В дозах, недостаточных для полного подавления продукции антител, IgG повышает их среднюю аффинность в результате того, что успешно конкурировать с пассивно введенными антителами за антиген способны лишь В-клетки, обладающие высокоаффинными рецепторами. Как предполагается, регуляция по механизму обратной связи, осуществляемая антителами, играет важную роль в процессе повышения аффинности антител.

**Иммунные комплексы могут усиливать или подавлять иммунные реакции.** Один из механизмов модулирующего влияния антител (IgM или IgG) на иммунный ответ является Fc-зависимым и связан с образованием иммунных комплексов антиген—антитело. Иммунные комплексы могут ингибировать или усиливать иммунный ответ. Активируя комплемент, иммунные комплексы могут локализоваться путем взаимодействия с CR2 на фолликулярных дендритных клетках. Это способствует иммунному ответу, поскольку обеспечивает постоянный источник антигена. Рецептор CR2 экспрессируется также на В-клетках, и при этом известно, что косвязывание CR2 с мембранным IgM (mIgM) активирует В-клетки; таким образом, взаимодействие иммунных комплексов с CR2, входящим в состав В-клеточного корецепторного комплекса, и mIg может приводить к усилению специфического иммунного ответа. У больных со злокачественными опухолями иммунореактивность часто бывает подавлена; предполагается, что это связано с присутствием в крови иммунных комплексов, состоящих из антител и антигенов опухолевых клеток.

### 4.3. НЕЙРОЭНДОКРИННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА

Уже давно известно, что стрессовые ситуации могут служить причиной подавления иммунных функций организма, например снижения его способности преодолевать инфекции. Имеются многочисленные данные, указывающие на взаимодействие между нервной, эндокринной и иммунной системами. В общем виде два основных пути, посредством которых процессы, происходящие в



**Рис. 65. Взаимодействие между нейроэндокринной и иммунной системами.**

Некоторые из возможных связей между эндокринной, нервной и иммунной системами. Синими стрелками показана симпатическая иннервация, красными — воздействие гормонов, белыми — предполагаемые связи, эффекторные молекулы для которых не установлены

центральной нервной системе, могут отражаться на иммунной функции, состоят в следующем (рис. 65).

- Большая часть лимфоидных тканей имеет прямую симпатическую иннервацию — как кровеносных сосудов, проходящих через лимфоидную ткань, так и непосредственно самих лимфоцитов.

- Нервная система прямо или опосредованно контролирует секрецию различных гормонов, в частности кортикостероидов, гормона роста, тироксина и адреналина.

Лимфоциты экспрессируют рецепторы для многих гормонов, медиаторов и нейропептидов, включая рецепторы для стероидов, катехоламинов (адреналина и норадреналина), энкефалинов, эндорфинов, вещества Р и вазоактивного интестинального пептида (ВИП). Степень экспрессии рецепторов и клеточная реактивность различны у разных популяций лимфоцитов и моноцитов, в связи с чем эффект разных медиаторов также варьируется в зависимости от условий. Однако применительно к иммунной системе особое значение имеет регуляция, опосредованная кортикостероидами, эндорфинами и энкефалинами — агентами, которые высвобождаются при стрессе и обладают иммуносупрессивным действием *in vivo*. Эффекты эндорфинов *in vitro* существенно различаются в зависимости от экспериментальной системы и дозы; в одних дозах они оказывают супрессивное влияние, в других — усиливают иммунный ответ. Однако одним из важных факторов, регулирующих иммунный ответ по механизму обратной связи, служат, несомненно, кортикостероиды. Установлено, что сами лимфоциты способны реагировать на кортикотропин-рилизинг-гормон, синтезируя собственный АКТГ, который, в свою очередь, индуцирует секрецию кортикостероидов.

По имеющимся данным, кортикостероиды ингибируют продукцию цитокинов Тх1-клетками, не влияя на Тх2-ответ. Кроме того, они индуцируют образование ТФРβ, который может подавлять иммунный ответ. Предполагается, что низким уровнем кортикостероидов в плазме у крыс линии Lewis обусловлена повышенная предрасположенность этих животных к возникновению различных аутоиммунных процессов: после индукции ЭАЭ спонтанное выздоровление крыс связано с повышением содержания в крови кортикостероидов; адреналэктомированные животные не выздоравливают. Значение стероидов в предрасположенности к заболеванию продемонстрировано также на крысах линии PVG: в норме животные этой линии резистентны к ЭАЭ, однако становятся чувствительными к нему после адреналэктомии.

Взаимодействие между нейроэндокринной и иммунной системами не является однонаправленным. Установлено, что цитокины, в частности ИЛ-1 и ИЛ-6, действуют в обоих направлениях, играя роль модуляторов взаимодействия этих двух систем. Данные цитокины служат мощными стимуляторами продукции кортикостероидов надпочечниками благодаря своему влиянию на кортикотропин-рилизинг-гормон. Помимо того, что ИЛ-1 продуцируют макрофаги, а ИЛ-6 — Т-лимфоциты, способностью к синтезу обоих этих цитокинов обладают нейроны и клетки глии, а также клетки, локализованные в гипофизе и надпочечниках. Это еще раз подчеркивает важную роль данных цитокинов как медиаторов двунаправленного действия при реакции организма на стресс.

#### 4.4. ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ

- Механизмы толерантности необходимы, поскольку иммунная система продуцирует огромное число разнообразных антиген-специфических рецепторов и некоторые из них оказываются специфичными к собственным антигенам организма; толерантность предотвращает нежелательные реакции против собственных органов и тканей.

- Центральная (тимическая) толерантность к «своим» антигенам (аутоантигенам) обеспечивается делецией тех дифференцирующихся Т-клеток, антигенспецифические рецепторы которых обладают высоким сродством к собственным антигенам, локализованным в тимусе. Низкоаффинные аутореактивные Т-клетки, а также Т-клетки с рецепторами к тем антигенам, которые не представлены в тимусе, созревают и пополняют пул периферических Т-лимфоцитов.

- Посттимическую толерантность к собственным антигенам обеспечивают три механизма: циркулирующие в крови аутореактивные Т-клетки могут просто «не замечать» собственные антигены, например, если антигены локализованы в не связанных с циркуляцией тканях; при определенных условиях аутореактивные клетки делетируются или становятся анергичными, неспособными взаимодействовать с антигеном. Очевидное состояние толерантности к собственным антигенам может также поддерживаться механизмом иммунного отклонения.

- Делеция В-клеток происходит в костном мозге; делетируются на ранней стадии дифференцировки те В-клетки, которые экспрессируют на своей поверхности иммуноглобулиновые рецепторы с высокой аффинностью к собственным мембраносвязанным антигенам.

- Аутореактивные В- и Т-клетки могут избежать делеции на периферии за счет снижения экспрессии антигенных рецепторов.

- Толерантность можно индуцировать искусственно различными способами, и некоторые из них применимы в медицине для предотвращения отторжения чужеродных трансплантатов и лечения аутоиммунных и аллергических заболеваний.

Иммунологическая толерантность — это состояние ареактивности в отношении того или иного антигена; ее индуцирует предшествующий контакт с этим антигеном. Активно функционирующие механизмы толерантности необходимы для предупреждения воспалительных реакций в ответ на многие безвредные антигены, попадающие в организм с воздухом и пищей и действующие на слизистую оболочку дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта. Однако наиболее важна толерантность к собственным антигенам организма; она предотвращает иммунный ответ против собственных тканей. Между тем возможность такого ответа суще-



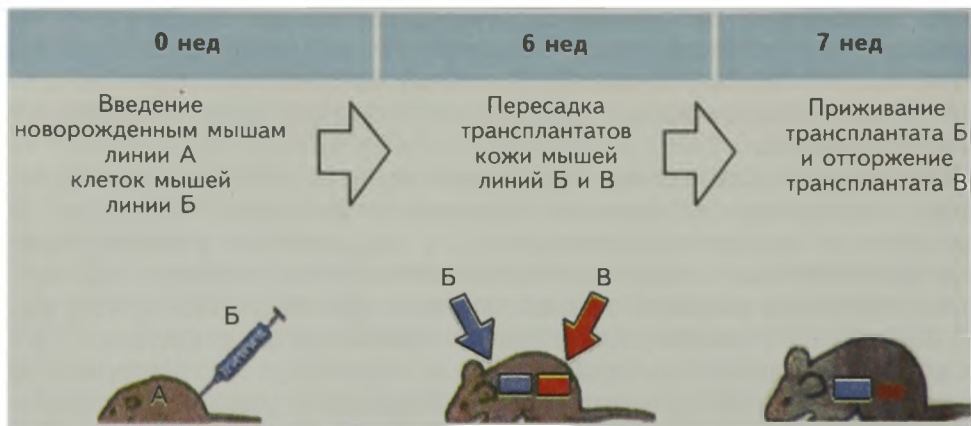
ствуется, поскольку иммунная система продуцирует самые разнообразные антигенспецифические рецепторы, в том числе способные реагировать с аутоантигенами. Поэтому клетки, имеющие подобные рецепторы, должны быть функционально или физически элиминированы.

Способность организма предотвращать развитие иммунных реакций, направленных против собственных антигенов, не является генетически запрограммированной, а развивается в онтогенезе. Так, гомозиготные животные гистосовместимых линий А и В взаимно отторгают кожные трансплантаты другой линии, тогда как их гибриды F1 (экспрессирующие антигены обоих родителей, А и В) воспринимают трансплантаты как А, так и В. Отторжение трансплантатов обоих типов вновь проявляется у гомозигот поколения F2. Таким образом, свойство различать «свое/не-свое» приобретает в онтогенезе: все эпитопы (антигенные детерминанты), закодированные в ДНК организма, должны быть иммунологически определены как «свои», а все другие — как «не-свои».

Однако способность отличать собственные антигены от чужеродных определяется не только структурой их молекул как таковых. Наряду со структурными особенностями эпитопов важное значение имеют и другие факторы: стадия дифференцировки лимфоцита при его первом контакте со специфическим эпитопом; участок организма, где происходит этот контакт; природа клеток, презентующих эпитопы, и число лимфоцитов, реагирующих на данные эпитопы.

Интересна история этого открытия. Вскоре после того как была обнаружена специфичность антител, стало ясно, что должны существовать какие-то механизмы, предотвращающие образование аутоантител. Еще в начале XX столетия П. Эрлих предложил термин «страх самоотравления», предполагая необходимость существования регулирующего механизма, препятствующего продукции аутоантител. В 1938 г. Трауб индуцировал специфическую толерантность, введя эмбрионам мышей вирус лимфоцитарного хориоменингита, вызывающий пожизненную инфекцию. В отличие от нормальных мышей взрослые особи, зараженные *in utero*, не продуцировали нейтрализующих антител при повторном введении вируса. В 1945 г. стало известно об эксперименте, поставленном самой природой, — неидентичных телятах-близнецах, в крови каждого из которых были обнаружены клетки, несущие и «свои», и «не-свои» антигены. Эти телята в эмбриональный период имели общий плацентарный кровоток, в результате чего был возможен обмен гемопоэтическими (стволовыми) клетками. У животных возникла пожизненная толерантность (эритроцитарный мозаицизм): во взрослом состоянии они не давали гуморального ответа на введение эритроцитов партнера по эмбриональному парабиозу. (При отсутствии общего плацентарного кровообращения у дизиготных телят-двоен перекрестное введение эритро-





**Рис. 66. Индукция специфической толерантности у мышей.**

Индукция специфической толерантности к трансплантату кожи у новорожденных мышей, которым вводили клетки селезенки от мышей-доноров разных линий. Мыши линии А в обычных условиях отторгают трансплантат кожи Б. Однако, если они при рождении получили инъекцию клеток мышей линии Б, то в возрасте 6 нед у них обнаруживается толерантность к коже мышей линии Б, а трансплантированная кожа мышей линии В отторгается. Этот феномен обусловлен иммунным отклонением (см. текст)

цитов взрослым животным вызывает антителообразование.) Основываясь на этом наблюдении, Ф. Бернет и Г. Феннер постулировали, что решающим фактором в формировании иммунореактивности и приобретении способности распознавать чужеродные антигены служит возраст животных в момент первого контакта с антигеном. Такая гипотеза казалась логичной, поскольку с большинством собственных антигенов иммунная система сталкивается обычно до рождения и только позднее начинает взаимодействовать с чужеродными антигенами.

Экспериментальное подтверждение этой гипотезы получила в 1953 г., когда П. Медавар и сотрудники индуцировали у мышей толерантность к аллогенному (т. е. не идентичному, но от животного того же вида) кожному трансплантату путем введения аллогенных клеток новорожденным особям (рис. 66). Подобная толерантность легко объяснима с позиций клонально-селекционной теории Ф. Бернета (1957), согласно которой данный иммуноцит (в частности, В- или Т-клетка) при участии антигена проходит отбор, после чего делится, давая клон дочерних клеток той же специфичности. Один из постулатов этой теории гласит, что при контакте с теми или иными антигенами после рождения специфичные к ним клоны лимфоцитов активируются, тогда как при контакте до рождения происходит делеция специфичных к данным антигенам клонов (они были названы Ф. Бернетом «запрещенными клонами»). Из теории следует, что весь репертуар специфичностей должен быть создан в эмбриональном периоде, однако в действительности дифференцировка лимфоцитов продол-

жается еще долгое время после рождения. Таким образом, ключевым фактором, определяющим иммунореактивность, является не стадия развития организма, а степень зрелости лимфоцита в тот момент, когда он встречается с антигеном. Такое предположение было высказано в 1959 г. Дж. Ледербергом в его модифицированной трактовке клонально-селекционной теории: незрелые лимфоциты, контактирующие с антигеном, подвергаются клональной делеции, а зрелые активируются.

В настоящее время иммунокомпетентность новорожденного организма — твердо установленный факт. Индуцировать толерантность к определенным антигенам до рождения удается просто по той причине, что иммунные реакции у новорожденных и взрослых могут быть функционально различными. В связи с этим индукцию толерантности у новорожденных можно рассматривать как один из первых примеров «иммунного отклонения» такого типа. Основопологающими открытиями 1960-х гг. стали иммунологическая компетентность лимфоцитов, ведущая роль тимуса в развитии иммунной системы и существование двух взаимодействующих субпопуляций лимфоцитов — Т- и В-клеток. Именно эти открытия послужили основой для обширных исследований по выяснению клеточных механизмов «толерогенеза».

**Контрольные вопросы и задания.** 1. Перечислите механизмы регуляции иммунного ответа. 2. Какие молекулы и клетки участвуют в регуляции иммунного ответа? 3. От чего зависит тип иммунного ответа? 4. В чем выражается регуляторное влияние антител при иммунном ответе? 5. Назовите компоненты системы нейроэндокринной регуляции иммунного ответа. 6. Назовите виды иммунологической толерантности и ее типы.

---

## Глава 5

# ИММУНОПАТОЛОГИЯ

●

Повреждения тканей, наблюдаемые при инфекционных заболеваниях, иногда частично или полностью обусловлены действием самих механизмов клеточного иммунитета. К повреждению тканей может привести также иммунный ответ на аутоантигены (аутоиммунитет) (рис. 67). Ниже перечислены известные механизмы иммунопатологии.

Цитотоксические клетки могут поражать инфицированные вирусами клетки-мишени собственного организма, весьма важные для его жизнедеятельности, например клетки центральной нервной системы. Если это происходит при иммунном ответе на вирусную инфекцию, которая сама по себе не вызывает гибели или функциональных нарушений зараженных клеток, повреждение тканей относят к иммунопатологии.

**Хроническое воспаление.** Реакции клеточного иммунитета могут быть направлены против аутоантигенов (либо скрытых инфекций, либо микробов-комменсалов) и в этом случае вызывают хроническое воспаление, разрушающее ткани (как при ревматоидном артрите, болезни Крона, саркоидозе, псориазе и рассеянном склерозе). Часто роль в этом предполагаемых инфекционных агентов и постинфекционных аутоиммунных реакций остается неясной, как, например, в случае разрушения островков Лангерганса поджелудочной железы и возникновения в результате инсулинзависимого диабета.

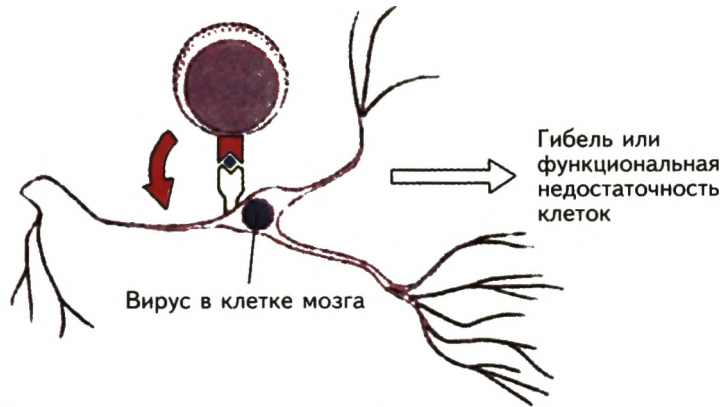
**Вытеснение гранулемами функциональной ткани.** Занимая в пространстве определенный объем, гранулема может нарушать функцию той или иной ткани организма. Например, образование гра-

---

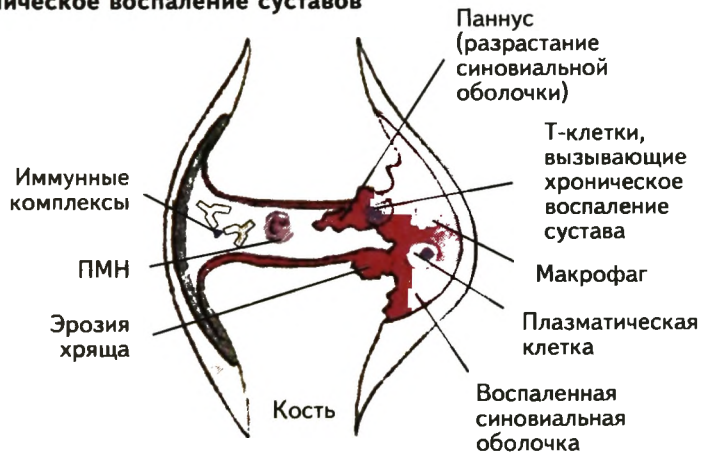
**Рис. 67. Механизмы опосредованной клетками иммунопатологии.**

1. Цитотоксические клетки могут повреждать жизненно важные клетки собственного организма, инфицированные вирусами (например, нервные клетки в мозге). 2. Иммунный ответ может быть направлен на собственные антигены организма (или, вероятно, на антигены неидентифицированных возбудителей скрытых инфекций либо микробов-комменсалов) и вызывать хроническое воспаление, как это бывает при ревматоидном артрите. 3. Занимая значительный объем в пространстве, гранулема может заметно нарушать функцию чувствительной ткани или нервного ствола. 4. Избыточное выделение цитокинов способно привести к тяжелым синдромам тканевого повреждения, в частности к синдрому токсического шока, вызванного избытком ФНО $\alpha$

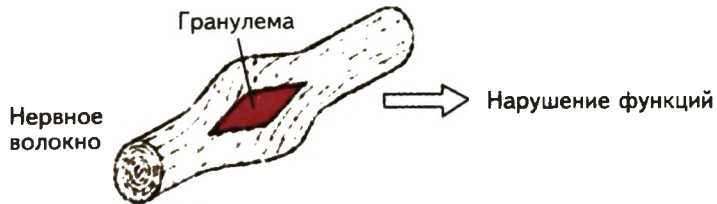
### 1. Цитотоксичность



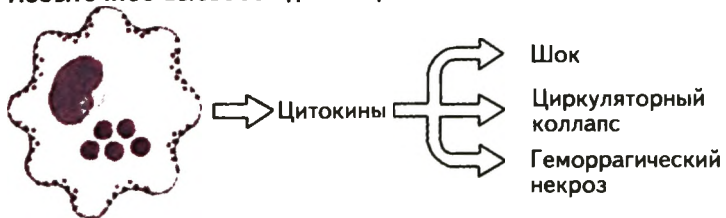
### 2. Хроническое воспаление суставов



### 3. Механическое вытеснение



### 4. Избыточное высвобождение цитокинов





нулемы, вызванное присутствием микобактерий — возбудителей лепры, может приводить к повреждению нервов, по ходу которых эти гранулемы возникают. Аналогичным образом функциональные нарушения могут вызывать гранулемы, образовавшиеся в сетчатке глаза или в тканях мозга.

**Избыточное выделение цитокинов.** Ряд патологических синдромов, таких, как токсический шок, геморрагический некроз и реакция Швартцмана, а также локальный некроз при реакциях гиперчувствительности замедленного типа (феномен Коха), обусловлен, по-видимому, избыточным выделением цитокинов (особенности ФНО $\alpha$ ).

## 5.1. ПЕРВИЧНАЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ

- При нарушениях иммунного ответа повышается чувствительность организма к пиогенным гноеродным бактериям. Подобные нарушения могут возникнуть вследствие недостаточности функции В-клеток, как это отмечается при сцепленной с X-хромосомой агаммаглобулинемии. В других случаях причина состоит в том, что В-лимфоциты не получают соответствующих сигналов от Т-лимфоцитов. С этим связано возникновение таких расстройств, как синдром IgM-гипергаммаглобулинемии, общий вариабельный иммунодефицит и транзиторная гипогаммаглобулинемия.

- При недостаточности клеточного иммунитета организм подвержен оппортунистическим инфекциям. Такой тип иммунодефицита обусловлен нарушением функций Т-клеток, как это наблюдается при тяжелом комбинированном иммунодефиците (ТКИД), недостаточности молекул МНС класса II.

- Наследственная патология системы комплемента обнаруживается при ряде клинических синдромов. Наиболее часто ее дефект состоит в недостаточности ингибитора C1, клинически проявляющейся как ангионевротический отек.

- При наследственной недостаточности терминальных компонентов комплемента (C5, C6, C7 и C8) и белков альтернативного пути активации комплемента (фактора H, фактора I и пропердина) чрезвычайно повышена чувствительность к инфекциям, вызываемым двумя видами *Neisseria* — *N. gonorrhoeae* и *N. meningitidis*.

- Нарушения механизма восстановления молекулярного кислорода в фагоцитах, а именно сборки молекулы NADP · H-оксидазы и образования активных метаболитов кислорода, обладающих бактерицидными свойствами, служат причиной развития хронического гранулематоза. Длительное присутствие бактериальных продуктов в фагоцитах ведет к образованию либо абсцессов, либо гранулем, в зависимости от вида возбудителя.

- Недостаточность адгезии лейкоцитов ассоциирована с персистирующим лейкоцитозом, поскольку лейкоциты крови, несущие

шие дефектные молекулы интегринов, не способны проникать через сосудистый эндотелий в ткани.

Иммунодефицитные состояния возникают в результате выпадения или недостаточности функции одного или нескольких элементов иммунной системы. Причинами заболеваний, обусловленных специфической иммунной недостаточностью, служат нарушения функций Т- или В-лимфоцитов — основы приобретенного иммунитета. Неспецифические иммунодефициты связаны с нарушениями в таких элементах иммунной системы, как комплемент и фагоциты, действующих при иммунном ответе неспецифично. Первичные иммунодефицитные состояния обусловлены внутренними дефектами клеток иммунной системы и большей частью генетически детерминированы.

При иммунодефицитном состоянии наблюдается повышенная чувствительность к инфекциям. Наиболее часто возникающие у таких больных инфекции можно разделить на две категории. При нарушениях, связанных с иммуноглобулинами, компонентами комплемента и фагоцитарной активностью, резко возрастает восприимчивость к повторным инфекциям, вызываемым бактериями, которые обладают капсулой, — *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*. Эти бактерии называют пиогенными, или гноеродными, поскольку они вызывают гнойное воспаление. В случаях нарушений системы клеточного иммунитета, т. е. функций Т-клеток, повышается чувствительность к микроорганизмам, широко распространенным во внешней среде и в норме безвредным. У здоровых людей к ним быстро развивается резистентность, но у больных с недостаточностью Т-клеточной функции они способны вызывать генерализованные и даже летальные инфекции. Это так называемые оппортунистические инфекции; их возбудителями могут быть различные микроорганизмы, от дрожжей до обычных вирусов, таких как вирус ветряной оспы.

Больные с общими дефектами В-клеточной функции подвержены рецидивирующим пиогенным инфекциям, таким как пневмония, воспаление среднего уха и синусит. При отсутствии лечения повторные пневмонии могут вызвать тяжелое обструктивное заболевание органов дыхания (бронхоэктаз) вследствие разрушения эластических тканей бронхиальной стенки.

## 5.2. ВТОРИЧНАЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ

- Иммуномодулирующие лекарственные препараты могут сильно подавлять иммунные функции.
- Стероиды влияют на миграцию клеток, индуцируют лейкоцитопению и ингибируют синтез цитокинов.

- Циклофосфан, азатиоприн и микофенолат-мофетил действуют непосредственно на ДНК или ее синтез.
  - Белково-энергетическая недостаточность оказывает выраженное негативное влияние на лимфоидную ткань и клеточный иммунитет.
  - Недостаток в пище отдельных микроэлементов, таких, как цинк, селен, медь или железо, а также витаминов А, В<sub>6</sub> и фолатов приводит к ослаблению функции иммунной системы.
  - Правильные диета и питание — факторы, позволяющие снизить заболеваемость и смертность от инфекций.
- Значительное снижение числа Т-клеток CD4<sup>+</sup> обусловленное разными причинами, ведет к резкому нарушению клеточного иммунитета и к гибели от оппортунистических инфекций.

**Иммунодефициты, вызываемые лекарственными препаратами.** В последнее десятилетие достигнуты существенные успехи в изучении регуляторных основ иммунитета, а также избирательного влияния на него лекарственных веществ, подавляющих или в некоторых условиях усиливающих иммунный ответ. В настоящем разделе рассматривается действие наиболее важных лекарственных препаратов, обычно используемых для системной иммунотерапии, в частности стероидов.

Функцию иммунной системы регулируют по меньшей мере четыре основных механизма: гормональный (т. е. опосредованный глюкокортикоидами), цитокиновый (с участием интерлейкинов и интерферонов), опосредованный сетевыми взаимодействиями (идиотипические — антиидиотипические реакции) и антигенный.

Глюкокортикоиды являются наиболее сильными естественными модуляторами иммунного ответа, оказывая выраженное влияние на большинство его стадий и компонентов. Помимо прямого гормонального действия на миграцию и функции иммунных клеток стероиды оказывают сильный опосредованный эффект, существенно влияя на синтез цитокинов.

Стероидные препараты вызывают резкие изменения в популяционном составе циркулирующих лейкоцитов. Этот эффект отмечается даже при использовании стероидов в низких дозах, например таких, какие применяют для создания их физиологических концентраций у адреналэктомированных больных. Характер эффекта зависит от типа клеток (табл. 4).

Применение стероидов приводит к снижению числа циркулирующих лимфоцитов — лимфоцитопении, максимальной через 4...6 ч после введения препарата; через 24 ч содержание этих клеток восстанавливается до нормального. При этом число В-клеток понижается меньше, чем Т-клеток, а среди последних субпопуляция CD4<sup>+</sup> уменьшается в большей степени, чем CD8<sup>+</sup>. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что происходит пере-

#### 4. Изменение числа циркулирующих лейкоцитов в крови (в $1 \text{ мм}^3$ ) после введения глюкокортикоида

Тип клеток	Время после инъекции, ч		
	0	6	24
Нейтрофилы	4000	10000	4000
Лимфоциты	2000	500	2000
Эозинофилы	400	100	400
Моноциты	300	50	300
Базофилы	100	0	100

Примечание. Препарат вводили однократно в дозе 40 мг/кг.

распределение этих клеток с их миграцией в костный мозг и селезенку.

Кроме того, применение стероидов вызывает моноцитопению, наиболее выраженную через 2 ч после введения препарата; через 24 ч число моноцитов в крови восстанавливается до нормального уровня. Однако в отличие от эффекта, оказываемого на лимфоциты, в данном случае при повторном ежедневном введении стероида содержание моноцитов существенно не меняется.

Лечение стероидами приводит также к возникновению нейтрофилии, частично обусловленной поступлением в кровь зрелых клеток из костного мозга и частично — их задержкой в циркуляции. После введения стероидов одновременно с нейтрофилией наблюдается быстрое и продолжительное понижение числа циркулирующих в крови эозинофилов и базофилов.

### 5.3. КОРМЛЕНИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

На существование связи между кормлением и устойчивостью к инфекциям указывают исторические сведения о распространении инфекционных заболеваний среди животных, обеспеченных скудным рационом, а также клинические наблюдения и эпизоотологические данные. Как правило, иммунные реакции при недостаточном кормлении нарушаются. Наиболее всего этот фактор влияет на пять форм иммунологической реактивности: клеточный иммунитет, фагоцитарную функцию, активность системы комплемента, секрецию антител и синтез цитокинов. По данным мировой статистики, истощение — это самая частая причина иммунодефицитных состояний.

Недостаточность кормления наиболее широко распространена в экономически неблагополучных странах. Кроме того, во многих случаях дефицит кормления возникает как следствие разнообраз-

ных системных нарушений: опухолевых заболеваний, хронических почечных расстройств, ожогов, множественных травм, хронических инфекций.

**Недостаточность кормления и инфекция.** Недостаточность кормления обычно утяжеляет течение инфекций, и наоборот, инфекционное заболевание усиливает расстройства, вызванные недостатком питания. Однако такая зависимость наблюдается не при всех инфекциях; на клиническое течение и конечный исход пневмонии, диареи и туберкулеза дефицит питания действует благоприятно; при некоторых инфекционных заболеваниях (например, столбняке и вирусном энцефалите) эффект недостаточности кормления минимален, а при таких, как грипп, характер питания оказывает лишь умеренное влияние.

Существует множество факторов, предрасполагающих к развитию инфекций при недостаточном кормлении. К ним относятся плохие санитарные условия, употребление загрязненных корма и воды, отсутствие гигиенических условий.

**Лимфоидные ткани.** Лимфоидные ткани чрезвычайно чувствительны к отрицательным эффектам недостаточности кормления. Масштаб и степень нарушения иммунных функций, возникающего при дефиците питательных веществ, зависят от ряда факторов, в том числе от скорости клеточной пролиферации, интенсивности синтеза белка и значения отдельных элементов корма в основных метаболических процессах. Для функционирования многих ферментов, играющих ключевую роль в иммунных реакциях, необходимо поступление в организм цинка, железа, витамина В<sub>6</sub> и других микроэлементов и витаминов.

Выраженный признак недостаточности кормления — это атрофия лимфоидной ткани. У новорожденных чувствительным «барометром», отражающим характер кормления, является тимус, и явное снижение массы и объема этого органа у истощенных в результате плохого кормления больных получило название «кормовой тимэктомии». При гистологическом исследовании такого тимуса обнаруживается нарушение дольчатого строения, исчезновение границы между корковой и мозговой зонами, уменьшение содержания лимфоидных клеток. Тельца Гассала при этом увеличены и находятся в состоянии дегенерации, некоторые из них кальцифицированы. Атрофия захватывает тимусзависимые периартериоллярные районы селезенки, а также паракортикальную область лимфатических узлов.

**Белковая недостаточность (БН).** Умеренная или тяжелая БН сопровождается значительным угнетением клеточного иммунитета, на которое указывают снижение числа Т-хелперов CD4<sup>+</sup> и уменьшение соотношения клеток CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Эксперименты по совместному культивированию показывают, что при этом В-лимфоциты не получают достаточной Т-клеточной «помощи». Отмечено снижение способности лимфоцитов



отвечать пролиферацией на митоген. Состояние незрелости циркулирующих Т-клеток выражается в повышенной активности лейкоцитарной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы. В основе изменений числа и функций Т-клеток может лежать снижение активности тимулина. При иммунизации обычно применяемыми вакцинами наблюдается недостаточно высокая продукция секреторных антител IgA — возможная причина частых инфекционных поражений слизистых оболочек.

В условиях БН страдает фагоцитарная функция. Ослаблен процесс опсонизации, в основном в результате снижения уровня различных компонентов комплемента — С3, С5 и фактора В.

Поглощение микроорганизмов фагоцитами не изменяется, тогда как способность фагоцитарных клеток разрушать захваченные микробы нарушена. Снижена также продукция некоторых цитокинов, в частности ИЛ-2 и ФНО.

Кроме того, БН сопровождается изменением некоторых показателей врожденного иммунитета, в том числе незначительным уменьшением образования лизоцима. При недостаточности кормления данного вида большое число бактерий связывается с эпителиальными клетками, что ухудшает заживление ран. Относительно качества и количества продуцируемой при БН слизи сведений крайне мало.

**Отдельные элементы кормления.** Хорошо изучено заметное влияние, которое оказывает на иммунный ответ недостаток *цинка*. Оно состоит в ослаблении кожных реакций гиперчувствительности замедленного типа, снижении соотношения клеток CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, нарушении функций Т-клеток. Острым и патогномичным признаком недостаточности цинка является уменьшение активности сывороточного тимулина — нонаполипептида, содержащего цинк.

*Железо* представляет собой, образно говоря, обоюдоострое оружие: оно необходимо для роста большинства микроорганизмов и наряду с этим для активности железозависимых ферментов, обеспечивающих функции лимфоцитов и фагоцитов. Поэтому дефицит железа в целом ведет к уменьшению способности нейтрофилов уничтожать бактерии и грибы, к снижению реакции лимфоцитов на митогены и нарушению активности НК-клеток.

*Селен и медь* также играют роль в осуществлении иммунного ответа. По новейшим данным, вирусы могут мутировать и изменять свою вирулентность при инфицировании животных, в питании которых имеется дефицит этих элементов. Вирус Коксаки, выделенный от мышей с дефицитом селена, вызывал сильное поражение миокарда; по сравнению с вирусом введенного мышам исходного, авирулентного штамма, вирулентный вирус от дефицитных по селену мышей имел шесть нуклеотидных замен.

Недостаток *витамина А* неблагоприятно отражается на структуре эпителия, приводя к метаплазии клеток и повышенному связыванию бактерий. Уменьшается число некоторых субпопуляций лимфоцитов и снижается их реакция на митоген.

Недостаток *витамина В<sub>6</sub> и фолатов* вызывает нарушения клеточного иммунитета, в особенности пролиферативной реакции лимфоцитов.

**Ожирение и избыточное питание.** У тучных животных наблюдаются изменения различных типов иммунореактивности, включая цитотоксичность, активность НК-клеток и способность фагоцитов лизировать поглощенные бактерии и грибы. Причиной нарушения иммунного статуса может быть изменение содержания в организме отдельных микроэлементов, липидов и гормонов.

Некоторые питательные вещества при умеренно избыточном поступлении с пищей обуславливают усиление ряда иммунных реакций, в частности клеточного иммунитета. К таким элементам питания относятся витамины А и Е, цинк и селен. Однако для большинства питательных веществ существует верхний предел потребления, превышение которого ведет к нарушению иммунных функций.

**Клиническое значение питания.** В настоящее время открыты новые возможности предупреждения первичных и вторичных инфекций у животных из групп повышенного риска при помощи соответствующего режима кормления. В клинических условиях пациенты в состоянии истощения подвергаются риску возникновения оппортунистических инфекций. Усиленное кормление в этом случае повышает иммунитет и снижает вероятность таких осложнений, как сепсис и плохое заживление ран.

**Контрольные вопросы и задания.** 1. Перечислите основные причины и отличительные особенности первичной и вторичной иммунологической недостаточности. 2. На какие структуры и функции иммунитета влияет неполноценное кормление?

---

## Глава 6

# ПРИКЛАДНАЯ ИММУНОЛОГИЯ

### 6.1. ВАКЦИНАЦИЯ

- Неспецифическая иммунизация, например путем введения цитокинов, может применяться, когда целесообразно стимулировать общую иммунореактивность.

- Адьюванты — вещества, усиливающие образование антител, обычно необходимы при иммунизации убитыми вакцинами.

- Технология рекомбинантных ДНК, по всей вероятности, станет основой для разработки вакцин следующего поколения.

- Вакцинация основана на способности организма формировать приобретенный иммунитет и иммунологическую память в отношении возбудителя.

- В качестве вакцин применяют самые разнообразные антигенные препараты, от целых микробов до просто пептидов и полисахаридов.

- Живые вакцины существенно отличаются от убитых и, как правило, эффективнее их.

- Вакцинация представляет собой форму активной иммунизации.

- Пассивная иммунизация путем непосредственного введения готовых антител еще сохраняет свое значение как средство противoinфекционной защиты в определенных обстоятельствах, например при столбняке, когда токсин уже проник в кровотоки.

Вакцинация, несомненно, самое известное и наиболее успешное применение иммунологических принципов в ветеринарии. Первая вакцина была названа так по болезни крупного рогатого скота — *vaccinia* (коровья оспа), вызываемой, как выяснилось впоследствии, вирусом. Два столетия назад ее применил английский врач Э. Дженнер. Это стало первой научно продуманной попыткой предотвратить инфекционное заболевание человека (натуральную оспу), причем автор метода ничего не знал ни о вирусах (или о любых других микробах), ни об иммунитете.

Лишь столетие спустя уже Л. Пастером был сформулирован фундаментальный принцип вакцинации: для создания напряженного иммунитета против высоковирулентных микроорганизмов можно применять препараты из тех же микробов, но с ослабленной путем определенного воздействия вирулентностью. Исполь-

зую в соответствии с этим высушенный спинной мозг кролика, зараженного вирусом бешенства, и прогретые культуры бацилл сибирской язвы, Пастер создал по сути прототипы современных вакцин. В то же время созданная Дженнером вакцина животного происхождения, содержащая вирус коровьей оспы (гетерологичная), не получила впоследствии какого-либо продолжения как метод.

Даже Л. Пастер не знал ничего о функции лимфоцитов или сущности иммунологической памяти; их открытие заставило себя ждать еще полстолетия. Тогда, наконец, с появлением клонально-селекционной теории Ф. Бернета (1957) и данных о Т/В-дифференциации лимфоцитов (1965) стал понятен ключевой механизм вакцинации: содержащийся в вакцине антиген должен вызвать клональную экспансию специфических Т- и/или В-лимфоцитов, оставив после себя популяцию клеток иммунологической памяти. При следующей встрече с тем же антигеном именно они способны дать вторичный ответ, который обычно быстрее и эффективнее первичного. Часто первичный ответ слишком слаб, чтобы сдерживать развитие опасной инфекции.

Таким образом, вакцинация приводит к формированию приобретенного иммунитета, а искусство создания вакцин заключается в разработке таких антигенных препаратов, которые безвредны для организма, вызывают нужную форму иммунного ответа и, кроме того, доступны по стоимости.

Благодаря вакцинации достигнуты успехи в предупреждении многих инфекционных заболеваний, но существуют и болезни, для защиты от которых вакцин еще не создано.

**Антигенные препараты, используемые как вакцины.** Выбор типа антигенного препарата для применения в качестве вакцины зависит от многих факторов. В общем, чем больше антигенов данного микроба останется в вакцине, тем лучше, и живые микроорганизмы, как правило, эффективнее убитых. Исключение составляют болезни, патогенез которых определяется действием токсина. В этом случае основой вакцины может служить сам токсин. Еще одно исключение — это вакцины, в которых нужные микробные антигены экспрессируются клетками других микробов, используемых в качестве вектора.

Для приготовления живых вакцин могут использоваться как штаммы дикого типа, так и аттенуированные, или ослабленные, штаммы микробов.

*Живые микроорганизмы штаммов дикого типа* редко используются для производства вакцин. За исключением вируса коровьей оспы, ни один полностью нативный (циркулирующий в природе) микроорганизм не служил когда-либо для приготовления используемых на практике вакцин. Однако известны испытания бычьего и обезьяньего ротавирусов в качестве вакцин для детей. Одно время внимание исследователей привлекала иммунизация микобактериями — возбудителями мышинного туберкулеза как средство

противотуберкулезной защиты. На Ближнем и Среднем Востоке, а также в России для создания иммунитета к кожному лейшманиозу делают прививки живой культуры *Leishmania tropica major*, выделенной от больного с легким течением болезни. Вполне вероятно, что в будущем будет получена еще одна хорошая гетерологичная (как у Дженнера) вакцина, но при этом возможны серьезные проблемы, связанные с требованием безвредности.

Наиболее эффективны *живые ослабленные вакцины*. При разработке вакцин самой плодотворной оказалась стратегия ослабления (аттенуации) вирулентности возбудителей, вызывающих болезни, при сохранении нужных антигенов. Первый успех на этом пути был достигнут А. Кальметтом и К. Гереном с одним из штаммов туберкулезных бактерий бычьего вида (*Mycobacterium bovis complex*), который за 13 лет (1908—1921) пересевов превратился в намного менее вирулентную форму, известную теперь как БЦЖ (BCG, *bacille Calmette—Guerin*) и в некоторой степени эффективную в качестве противотуберкулезной вакцины. По-настоящему удачными оказались работы по аттенуации вирусов. Началом их стало получение путем пассирования в организме мышей и куриных эмбрионах ослабленного штамма 17D вируса желтой лихорадки (1937). В дальнейшем принципиально сходный подход позволил создать вакцины против полиомиелита, кори, эпидемического паротита и краснухи. Об эффективности этих вакцин свидетельствует резкое снижение заболеваемости соответствующими инфекциями на протяжении двух-трех десятилетий.

Установлено, что аттенуация может быть результатом мутаций. В чем суть изменений, приводящих к аттенуации? Впервые ослабленные микробы были получены в результате серии случайных мутаций, индуцированных неблагоприятными условиями роста; их удалось выделить благодаря постоянной перепроверке и отбору по признаку утраты вирулентности при сохранении исходного антигенного состава. Эта длительная кропотливая работа была остроумно названа «генетической рулеткой». Когда стало возможным секвенирование вирусных геномов, оказалось, что результаты традиционного способа аттенуации весьма неоднозначны. Один пример этого — различия между вирусами полиомиелита трех типов, входящих в состав живой полиомиелитной вакцины Сейбина. Геном вируса типа 1 содержит 57 мутаций и почти никогда не ревертирует к дикому (вирулентному) типу, в то время как с вакцинными штаммами полиовирусов типов 2 и 3 это происходит часто, поскольку их безвредность зависит всего от двух ключевых мутаций. В некоторых случаях реверсия приводит к вспышкам поствакцинального паралитического полиомиелита. Одна из них, произошедшая в Швеции, стала достаточно убедительным аргументом для службы здравоохранения этой страны, чтобы прекратить применение живой вакцины, заменив ее убитой. Однако в пользу живой вакцины свидетельствует тот факт,



что во многих районах США она в настоящее время вытеснила вирус полиомиелита дикого типа в источниках водоснабжения и несомненно обеспечивает иммунную защиту части никогда не вакцинированного населения — яркий пример «коллективного иммунитета».

С появлением современной технологии получения рекомбинантных ДНК стало очевидным, что как вирусные, так и бактериальные аттенуированные вакцины должны создаваться на основе направленно точечных, а не случайных мутаций.

Убитые вакцины — это сохранившие нативность антигенов, но нежизнеспособные микроорганизмы. Эти вакцины создают по принципу упомянутых выше убитых вакцин Пастера. Некоторые из убитых вакцин высокоэффективны (антирабическая вакцина), эффективность же других невысока (сальмонеллезная и гриппозная вакцины) или спорна (чумная вакцина). Применение некоторых вакцин встречает возражения из-за их токсичности (цельноклеточная коклюшная вакцина). Можно надеяться, что некоторые из них будут заменены более эффективными вакцинами на основе ослабленных возбудителей, и уже видна определенная перспектива появления такой антирабической вакцины, а также препаратов, полученных методом генной инженерии.

Наиболее удачные из бактериальных вакцин — *инактивированные токсины и анатоксины*. Самыми эффективными среди всех бактериальных вакцин считаются столбнячная и дифтерийная вакцины, приготовленные из инактивированных экзотоксинов (табл. 5). Тот же принцип может, как оказалось, быть использован для приготовления вакцин и против ряда других инфекционных болезней.

##### 5. Вакцины, приготовленные на основе токсинов

Микроорганизм	Вакцина	Комментарий
<i>Clostridium tetani</i>	Токсин, инактивированный формальдегидом	Три инъекции анатоксина, адсорбированного на геле гидроксида алюминия; ревакцинация каждые 10 лет. Обычно вводят вместе со столбнячным анатоксином
<i>Clostridium perfringens</i>	То же	Иммунизируют новорожденных ягнят

Примечание. В список не включены препараты против многочисленных экзотоксинов стафилококков и стрептококков, а также против бактериальных эндотоксинов, подобных липополисахариду.

Столбнячный анатоксин может служить «носителем» в составе других вакцин. Столбнячный анатоксин кроме применения в качестве вакцины против столбняка используется еще и как «носитель» в вакцинах, состоящих из коротких пептидов, которые иначе лишены иммуногенности. Такой способ эффективен благодаря

тому, что население в большинстве вакцинировано против столбняка и обладает Т-клетками иммунологической памяти, распознающими токсин. Однако целесообразно использовать в качестве носителя белок того же микроба, против которого направлена конструируемая вакцина (в частности, пневмококковая, малярийная и т. д.).

Безвредными и эффективными вакцинами служат *поверхностные антигены* и фрагменты микробных клеток.

Иммунная система (главным образом В-клетки и антитела) распознает прежде всего поверхностные антигены большинства микроорганизмов и отвечает на них. Они и служат безвредной и эффективной вакциной в тех случаях, когда вторичное образование антител способно сдерживать инфекцию. Наиболее удачными оказались вакцины против инкапсулированных бактерий, капсульные полисахариды которых удается получить в препаративных количествах, и против вируса гепатита В, обладающего необычным свойством сверхсинтеза поверхностного антигена (HBs).

*Низкомолекулярные антигены* можно получать путем химического синтеза или молекулярного клонирования. Если установлено, что защиту обеспечивает небольшой пептид (нечастый случай), удобнее, возможно, получать его путем синтеза или клонирования в подходящем векторе экспрессии. Пример успешной реализации этого подхода — получение HBs-антигена, клонированного в клетках дрожжей. Изготовленная таким способом вакцина вытеснила теперь HBs-вакцину первого поколения, которую приходилось готовить трудоемким методом выделения HBs-антигена из крови носителей вируса и последующей очистки; при новом способе снизилась и стоимость вакцины.

Привлекательность молекулярного клонирования заключается и в том, что в продукт можно ввести дополнительные последовательности, например необходимые В- и Т-клеточные эпитопы, скомбинированные различным образом для оптимизации иммунного ответа. Т-лимфоциты распознают линейные аминокислотные последовательности, тогда как В-лимфоциты отвечают на трехмерную конфигурацию эпитопов антигена. Поэтому пептиды хорошо функционируют в качестве Т-клеточных эпитопов, но не способны имитировать структурированные В-клеточные эпитопы. Даже в том случае, если В-клеточная детерминанта имеет линейную конфигурацию, антитела, полученные к свободному гибкому пептиду, не связываются с ним так же оптимально, как с идентичной последовательностью в составе нативного белка, где она имеет более жесткую структуру.

Вакцины будущего — это микробные гены в комбинации с векторами для экспрессии антигена *in situ*.

Дальнейшее развитие подхода с применением клонирования генов предполагает введение нужного гена в такой вектор, кото-

рый способен после инъекции в организм обеспечивать репликацию и экспрессию с образованием большого количества антигена *in situ*. Ранее на роль вектора выдвигали вирус коровьей оспы (несмотря на изредка проявляемую им токсичность), однако его использованию препятствует то, что многие люди уже привиты против оспы и у них этот вирус будет слишком быстро выводиться из организма. В качестве альтернативы предлагались почти все из имеющихся аттенуированных вирусных вакцин.

Другой подход к созданию вакцины заключается в использовании в роли векторов аттенуированных бактерий, и естественным кандидатом на нее представляется вакцина БЦЖ, поскольку геном микобактерий, по расчетам, достаточно велик для включения генов любых других микробов, из которых необходимо создать вакцину. Имеется также ряд мутантных штаммов сальмонелл, способных при пероральном введении проиммунизировать лимфоидную ткань кишечника, прежде чем будут элиминированы. Эти бактерии идеально подходят как векторная вакцина для индукции местного иммунитета в кишечнике — очень важная задача, если учесть, что диарейные заболевания составляют главную причину смертности среди молодняка на земном шаре. Еще одно преимущество аттенуированных микроорганизмов как векторов заключается в том, что их могут поглощать макрофаги, вызывая в результате системный иммунный ответ вследствие миграции в другие части тела.

Самым новым направлением в этой области стала разработка метода вакцинирования чистой ДНК, в последовательность оснований которой включен подходящий промотор. Поразительным образом такая вакцина создает превосходный иммунитет, как гуморальный, так и клеточный, не вызывая при этом толерантности, которую можно было бы ожидать в случае потенциально неограниченного источника чужеродного антигена. Это направление, привлекающее огромный интерес, быстро развивается, и уже вскоре можно ожидать результатов испытаний «ДНКовой» гриппозной вакцины.

Когда нативный антиген непригоден для иммунизации, можно использовать *антиидиотипические вакцины*. Это единственный тип вакцин, созданный исключительно на основе теоретических представлений. Идея состоит в получении большого количества антиидиотипических моноклональных антител (анти-Id) против V-области (идиотипа) иммуноглобулина, заведомо обладающего защитной активностью. Отобранные соответствующим образом антитела анти-Id будут по пространственной конфигурации подобны эпитопам исходного иммунизирующего антигена и пригодны для использования с целью активной иммунизации вместо него. Такая стратегия, хотя и воспринимается нередко скептически, как плод «умозрительной иммунологии», все же может оказаться действительно эффективной в тех случаях, когда сам по

себе нативный антиген непригоден, т. е. не обладает иммуногенностью, как, например, некоторые бактериальные полисахариды или липид А из бактериального эндотоксина (липополисахарида, ЛПС). При этом моноклональные антитела имеют то преимущество, что они как белки должны индуцировать иммунологическую память, которой полисахариды и липиды обычно не вызывают.

### 6.1.1. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВАКЦИН

Официально допущенная к применению вакцина должна быть безусловно эффективной, причем эффективность всех применяемых на практике вакцин периодически перепроверяется. Действенность вакцины определяется многими факторами. Чтобы считаться эффективной, вакцина должна обладать следующими свойствами:

*индуцировать нужную форму иммунного ответа*; например, вызывать образование антител к токсинам и внеклеточным микробам, таким, как *Streptococcus pneumoniae*, или формирование клеточного иммунитета к внутриклеточно размножающимся возбудителям, таким, как туберкулезные микобактерии. Когда оптимальный тип ответа неизвестен (как при малярии), сконструировать эффективную вакцину гораздо труднее;

*быть стабильной при хранении*; это особенно важно для живых вакцин, которые постоянно, на всем пути от производства до кабинета врача, должны находиться при низкой температуре, что не всегда легко достижимо;

*обладать достаточной иммуногенностью*; в случае убитых вакцин ее нередко требуется повышать, применяя адьювант.

**Эффективность вакцин.** Живые вакцины обычно эффективнее убитых. Чтобы вызвать иммунитет необходимой напряженности, антиген должен обладать определенными свойствами. Преимущество живых вакцин по сравнению с убитыми состоит в том, что они обеспечивают нарастающее антигенное воздействие, которое длится сутки или недели, и создают иммунитет именно в том участке, где он необходим. На практике это особенно важно для формирования иммунитета слизистых оболочек. По-видимому, живые вакцины содержат наибольшее число различных микробных антигенов. Недостатками убитых вакцин могут быть также две следующие особенности вызываемого ими иммунного ответа: независимость от Т-клеток и рестрикция по антигенам главного комплекса гистосовместимости (МНС). Типичные Т-независимые антигены — это полисахариды; они не связываются с молекулами МНС и поэтому не вовлекают в ответ Т-лимфоциты. Для индукции Т-клеточной иммунологической памяти в современных вакцинах полисахариды конъюгируют либо со стандартным белковым носителем, таким, как столбнячный анатоксин, либо с од-



ним из белков того же микроба, например с белком наружной мембраны пневмококков, *Haemophilus* и др. Рестрикция по МНС влияет на ответ против коротких пептидов из 10...20 аминокислотных остатков и проявляется как «генетическая неотвечаемость» — такие пептиды взаимодействуют только с определенными молекулами МНС. Вероятно, отсутствие ответа из-за МНС-рестрикции — это скорее гипотетическая возможность, поскольку большинство предлагаемых вакцин содержит значительно более крупные пептиды. Тем не менее даже наиболее эффективные вакцины часто не обеспечивают стопроцентную иммунизацию; так, после полного курса вакцинации против гепатита В наблюдается отсутствие сероконверсии примерно у 5 % вакцинированных.

**Безвредность вакцин.** Безвредность вакцин, которой вначале не придавали должного значения, теперь становится главным условием их применения. Конечно, безвредность — весьма относительное понятие: небольшая болезненность или отек в месте инъекции и даже умеренная лихорадочная реакция обычно считаются приемлемыми последствиями вакцинации.

Возможны и более серьезные осложнения, зависящие от вакцины или от индивида. Вполне вероятно загрязнение вакцины посторонними белками или токсинами и даже живыми вирусами. Вакцина, называемая убитой, может оказаться недостаточно инактивированной, а аттенуированные вакцины способны ревертировать к дикому типу. Вакцинируемый индивид может обладать повышенной чувствительностью к следовой примеси какого-либо загрязняющего вакцину белка или страдать иммунологической недостаточностью, при которой любые живые вакцины, как правило, противопоказаны.

**Стоимость вакцинации.** Вакцинацию с полной уверенностью можно отнести к экономически наиболее эффективным способам борьбы с инфекционными заболеваниями, однако некоторые вакцины еще слишком дорогостоящи для большинства потребителей. Если учесть, что доходность производства иммунобиологических препаратов гораздо меньше, чем, например, антибиотиков, то нужно быть благодарными каждому еще сохраняющему свое производство изготовителю вакцин.

### 6.1.2. АДЬЮВАНТЫ

В 1920-х гг. при разработке гетерологичных сывороток для терапии инфекционных заболеваний человека было обнаружено, что некоторые вещества, в частности соли алюминия, добавленные в раствор антигена или эмульгированные в нем, весьма усиливают образование антител, т. е. действуют в качестве адъювантов. (Гидроксид алюминия до сих пор широко используется, например, в вакцинах, содержащих дифтерийный и столбнячный



анатоксины.) Впоследствии, исходя из современных представлений о механизмах активации лимфоцитов и формирования иммунологической памяти, многие исследователи пытались разработать адъюванты с лучшими свойствами, и особенно усиливающие Т-клеточный ответ.

Адъюванты либо удерживают антиген в месте введения, либо индуцируют образование цитокинов. Воздействие адъювантов на иммунный ответ в основном обусловлено, как предполагается, двумя их активностями: способностью удерживать (или даже накапливать) антиген в том месте, где он экспонируется лимфоцитам (эффект «депо»), и способностью вызывать синтез цитокинов, регулирующих лимфоцитарные функции. Соли алюминия действуют, вероятно, главным образом как депо, индуцируя образование мелких гранул, в которых они задерживаются вместе с адсорбированным антигеном. Адъюванты нового поколения, такие как липосомы и иммуностимулирующие комплексы (ISCOMs), позволяют достичь той же цели; заключенный в них антиген доставляется к антигенпрезентирующим клеткам. Адъюванты бактериального происхождения, такие как клеточные стенки микобактерий, эндотоксин и др., действуют, вероятно, в основном путем стимулирования образования соответствующих цитокинов. Это предположение подтверждается тем фактом, что цитокины действуют как эффективные адъюванты, особенно если связаны непосредственно с антигеном. Применение цитокинов в наибольшей степени целесообразно при вакцинации лиц, страдающих иммунологической недостаточностью, для которых вакцины обычного состава часто не эффективны. Можно также надеяться, что применение цитокинов позволит придавать иммунному ответу нужное направление — например, когда желательное образование только Тх1- или только Тх2-клеток памяти.

### 6.1.3. ПАССИВНАЯ ИММУНИЗАЦИЯ

Идея лечить инфекционные заболевания заранее приготовленными препаратами антител, хотя и вытесняемая успехами антибиотикотерапии, все же сохраняет свою ценность в определенных ситуациях. Когда токсины уже проникли в кровоток (например, при дифтерии, столбняке или после укуса змеи), и для их нейтрализации требуется высокий титр специфических антител, жизнь больного удастся спасти только введением именно таких препаратов, изготавливаемых обычно из плазмы крови гипериммунизированных лошадей, а иногда из сывороток лиц, перенесших заболевание. Если расположить препараты антител по градиенту удельной активности, то в конце этого ряда окажется нормальный иммуноглобулин — препарат, приготовленный из смеси образцов крови неиммунизированных доноров, но содержащий

тем не менее антитела к возбудителям банальных инфекций в количестве, вполне достаточном для того, чтобы при введении в дозе 100...400 мг IgG обеспечивать в течение месяца иммунную защиту больному, страдающему гипогаммаглобулинемией. При производстве каждой серии этого препарата в одной реакторной загрузке смешивается плазма крови более 1000 доноров, безопасная в отношении вирусов и возбудителей бактериальных инфекций.

Применение специфических моноклональных антител, теоретически привлекательное, на практике еще не имеет преимуществ перед традиционными методами серотерапии. В настоящее время оно осуществляется главным образом в области диагностики инфекционных заболеваний. Но ситуация может измениться, когда станут более доступными (и менее дорогостоящими) моноклональные антитела человека, полученные либо в культуре клеток, либо методами белковой инженерии.

Многие из веществ, используемых в качестве адъювантов в вакцинах, применяются также отдельно для стимуляции общей иммунореактивности (табл. 5). Лучшие результаты дают при этом не традиционные иммуноадъюванты, а цитокины, среди которых наиболее широко используется  $\alpha$ -интерферон (ИФ $\alpha$ ), в основном ввиду его антивирусной, а также и противоопухолевой активности. По-видимому, наиболее выраженный клинический эффект был получен при применении гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) для восстановления костномозгового кроветворения после цитотоксической химиотерапии: наблюдалась нормализация свертываемости крови и противоинфекционной резистентности.

### 5. Антигеннеспецифическая иммунотерапия

Источник получения препарата	Примечания
Микробный (фильтраты бактериальных культур БЦЖ)	Применялся Коули (1909) для лечения больных с опухолями. Проявляет некоторую противоопухолевую активность
Цитокины: ИФ $\alpha$	Эффективен при хронических инфекциях: гепатитах В, С, опоясывающем герпесе, вирусных папилломах; действует профилактически против простуды (а также некоторых опухолей)
ИФ $\gamma$	Эффективен в некоторых случаях хронического гранулематоза, лепроматозной лепры и лейшманиоза (кожного)
ИЛ-2	Эффективен при лейшманиозе (кожная форма)
Г-КСФ	Восстанавливает костномозговое кровообращение после цитотоксической химиотерапии

Источник получения препарата	Примечания
Ингибиторы цитокинов:	
Антагонисты ФНО	Эффективны при септическом шоке
Антагонисты ИЛ-1	Эффективны при тяжелой (церебральной) малярии
Антагонисты ИЛ-10	То же

Примечание. Антигеннеспецифическая стимуляция или подавление активности отдельных компонентов иммунной системы может иногда давать положительный клинический эффект.

Для лечения тяжелых или хронических воспалительных заболеваний предложено также применять ингибиторы цитокиновой активности. Различные подходы к инактивации фактора некроза опухолей (ФНО) и интерлейкина-1 (ИЛ-1) дали результаты при лечении больных с ревматоидным артритом и (с менее однозначными результатами) септическим шоком, вызванным грамотрицательными бактериями, а также тяжелой формы малярии. Можно надеяться, что в ближайшие несколько лет клиническая фармакология цитокинов и их ингибиторов будет настолько разработана, что появится реальная возможность использовать свойства этих коммуникационных молекул иммунной системы так же целенаправленно, как при вакцинации используются свойства лимфоцитов.

Идея использовать неспецифическую стимуляцию иммунной системы, чтобы вызвать отторжение опухолей, впервые была осуществлена Коули почти сто лет назад. Используя фильтраты бактериальных культур, он добился желаемого эффекта, по-видимому, благодаря высвобождению в результате их применения цитокинов, таких, как ФНО и ИФ. Однако попытки получить аналогичные результаты при помощи очищенных цитокинов или стандартных иммуностимуляторов (например, БЦЖ) оказались успешными только в случаях опухолей некоторых типов. Поэтому современные изыскания в этой области направлены в основном на индукцию антигенспецифического противоопухолевого иммунитета, подобного антимикробному. Надежда добиться положительных результатов опирается на достоверные факты спонтанного отторжения опухолей, которое в некоторых случаях происходит так, как будто опухоли представляли собой аллотрансплантаты.

## 6.2. ПРИНЦИПЫ РЕГИСТРАЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА

Разнообразие форм иммунного ответа предопределяет широкий набор методов их регистрации. Однако каждой форме иммунореагирования соответствует только свой, определенный набор

методов исследования, что важно знать для правильного подбора методов тестирования иммунного состояния организма.

При регистрации антителообразования необходимо учитывать наличие циркулирующих в крови и лимфе антител; секреторных, или местных, образующихся локально слизистыми покровами антител; антител, содержащихся в клетках-продуцентах.

*Сывороточные антитела* представлены преимущественно IgG и IgM, которые, как уже указывалось, взаимодействуют в основном с растворимыми и корпускулярными антигенами соответственно. Следовательно, антитела, ассоциированные с IgG, можно обнаружить при помощи реакций, основанных на феномене преципитации, а связанные с IgM — при помощи реакций, основанных на феномене агглютинации. Антитела, участвующие в формировании феномена преципитации (преципитины) выявляют в реакциях кольцевой преципитации (пробирочная) и преципитации в гелях (пластинчатая). В обоих вариантах ингредиенты реакции должны быть прозрачными, чтобы визуально зарегистрировать образовавшийся преципитат в виде кольца на границе двух сред при постановке пробирочной РП (реакция преципитации) или в виде линий между лунками с реагентами при постановке реакции диффузионной преципитации (РДП).

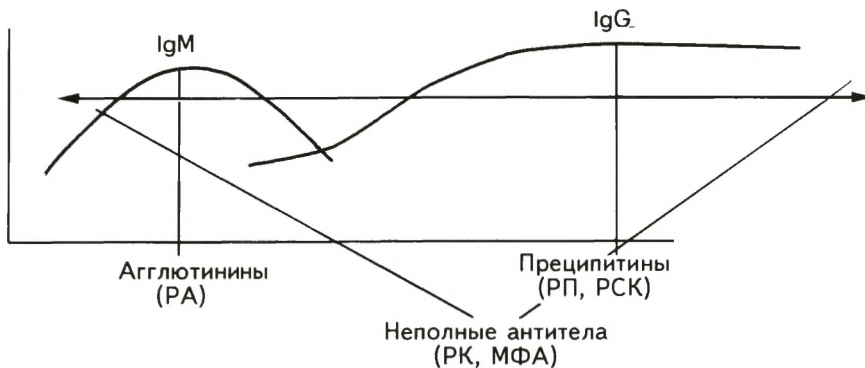
Антитела, участвующие в формировании феномена агглютинации (агглютинины), выявляют в реакциях агглютинации — пробирочной, пластинчатой, кольцевой в различных вариантах. Агглютинат обычно хорошо виден глазом в форме беловато-сероватых, трудно разбиваемых при встряхивании комочков. Для выявления агглютининов в молоке реакцию ставят с подкрашенным антигеном.

Для повышения чувствительности серологических (от лат. *serum* — сыворотка) реакций обычно растворимые антигены закрепляют на какой-либо крупной частице, получая искусственный корпускулярный антиген (например, в реакциях латекс-агглютинации или непрямой гемагглютинации), или вводят вторую, индикаторную систему (например, в реакции связывания компонента).

Во всех этих реакциях уровень антител определяют в титрах, принимая за последний наибольшее разведение сыворотки, обеспечивающее положительный результат реакции.

Для определения *количества антител* к растворимому антигену можно применить метод Гейдельберга или иммунорадиохимический. Первый метод наиболее доступный, основан он на учете прироста белка в преципитате, полученном с определенным количеством антигена в зоне эквивалентных соотношений реагентов.

Если циркулирующие с кровотоком антитела окажутся неполными, применяют тест Кумбса, основанный на использовании антивидовой сыворотки. Последняя объединяет антиген с антителом в видимые агрегаты, связанные одним функционирующим актив-



**Рис. 68.** Принципы серологического тестирования бруцеллезного процесса у рогатого скота

ным центром с антигенами. Таким же образом, но более полно, независимо от класса и полноценности, будет выявлять антитела метод флюоресцирующих антител в непрямом варианте, поскольку в отличие от других серологических реакций он обнаруживает антитела, связавшиеся с фиксированным антигеном. Однако титры антител, выявляемые разными реакциями, не будут совпадать, что в определенной мере зависит и от качества антигена.

На практике нередко для диагностики одной болезни приходится использовать целый набор серологических методов. Особенно показателен в этом отношении бруцеллез. Для его обнаружения применяют две серологические реакции — РА и РСК. Первой выявляют свежие случаи болезни, второй — развитие инфекционного процесса. В качестве арбитражного метода используют и третий тест — реакцию Кумбса, поскольку синтез неполных антител опережает образование полных антител, улавливаемых в РА и РСК. Кроме того, экспериментально доказано совпадение результатов исследования животных на бруцеллез реакциями агглютинации, связывания комплемента, Кумбса (РК) с показаниями метода флюоресцирующих антител (МФА) в непрямом варианте. Таким образом, последняя реакция принципиально информативнее всех предыдущих диагностических тестов (рис. 68). Она может регистрировать антитела классов М, G, как полные, так и неполные.

Диагностические серологические тесты не позволяют строго разграничить вакцинальный и эпизоотический процессы у бруцеллезного скота. Их можно дифференцировать при исследовании классов иммуноглобулинов в динамике. Если, скажем, через 1,5...2 мес синтез IgM снизится или заместится синтезом IgG, то это будет характеризовать эпизоотический процесс, связанный с репликацией возбудителя в организме.

Наличие иммуноглобулинов определенного класса важно исследовать и в других случаях. Количество их устанавливают при



помощи методов радиальной иммунодиффузии, а при низкой концентрации — радиоиммуноанализа. Метод радиальной иммунодиффузии основан на прямой зависимости диаметра кольца преципитата, который образуют иммуноглобулиновые пробы с антисывороткой, смешанной с гелем. Радиоиммуноанализ основан на учете радиоактивного антигена, оставшегося над осадком из-за конкурентного связывания нативного антигена. Последний метод более чувствителен, позволяет определять сверхмалые количества антигена (в пикограммах), но требует специального оборудования и меченых реагентов.

При определении титра секреторных антител к бактериям используют реакцию агглютинации со слизью. Уровень секреторных антител не совпадает с содержанием сывороточных антител и в десятки раз превышает последнее.

Реже обнаруживают антителопродуцирующие клетки. Их выявляют при помощи меченых антител или антигенов. В первом случае наиболее популярным является сэндвич-тест (от англ. sandwich — многослойный), смысл которого сводится к последовательному нанесению на мазок-отпечаток или срез лимфоидной ткани сначала взвеси или раствора соответствующего антигена, а затем гомологичной ему меченой флюорохромом антисыворотки. Светящийся антиген локализуется на клетках, продуцирующих антитела, высвечивая их контуры.

Если нужно обнаружить не антитело-, а иммуноглобулинпродуцирующие клетки, используют прямой и непрямой варианты МФА с применением меченой антивидовой сыворотки ко всем глобулинам или к иммуноглобулинам определенного класса. Антитела можно также тестировать *in vitro* в реакциях торможения агглютинации, преципитации, в реакциях лизиса, конглоутинации, иммунного прилипания, опсонизации, а *in vivo* — в реакции защиты.

*Гиперчувствительность I типа*, протекающую как системная или локальная анафилаксия (атопия), тестируют посредством выявления IgE. Поскольку последний не участвует в обычных серологических реакциях, используют антигенные свойства его М-цепей или цитофильные свойства Fc-фрагмента. Тестирование, основанное на использовании антигенных свойств иммуноглобулина, состоит в применении антивидовых сывороток при помощи методов радиальной иммунодиффузии или более чувствительных иммунорадиохимических методов. Из-за низкой концентрации IgE-антител в сыворотке последние более предпочтительны.

Реагиновую активность IgE-антител тестируют путем выявления гомотитропности Fc-фрагмента молекулы иммуноглобулина с помощью реакции, разработанной Праусницем и Кюстнером (1921). Можно также воспользоваться реакцией пассивной кожной анафилаксии (ПКА) на видоидентичных животных. Этим животным внутрикожно вводят испытуемую сыворотку в различных

разведениях, а через 1...2 ч внутривенно инокулируют предполагаемый аллерген с синькой Эванса. Через несколько минут животное убивают и со стороны мездры воспаленного участка кожи учитывают диаметр окрашенных пятен, величина которых прямо пропорциональна количеству IgE-антител.

*Гиперчувствительность II типа*, обусловленную реакциями иммунных комплексов, особенно IgG-антителами, тестируют также при помощи ПКА-пробы, но на морских свинках. IgG обладают гетероцитотропностью и могут проявлять гиперчувствительность немедленного типа на негомологичных животных. IgG-реагины можно выявить и в тесте дегрануляции базофилов, но опять-таки животного другого вида, например кролика.

*Гиперчувствительность туберкулинового типа (ГТТ)* тестируют на животных и лабораторными методами. При определении ГТТ на животных предположительно сенсibilизированным особям вводят внутрикожно (предпочтительно), подкожно, наносят на скарифицированную кожу или на слизистую оболочку глаз аллерген. В положительном случае через 12...48 ч на месте аппликации последнего развивается продуктивное воспаление, по степени выраженности которого судят о контакте организма с микробом, гомологичным примененному аллергену. Таким образом диагностируют туберкулез, паратуберкулезный энтерит рогатого скота, сап, мелиоидоз, псевдотуберкулез, туляремию, листериоз, бруцеллез, сальмонеллез и др.

Из лабораторных тестов чаще других используют реакцию бласттрансформации лимфоцитов и реакцию задержки подвижности (миграции) макрофагов. Реакцию трансформации сенсibilизированных лимфоцитов в бласты (большие клетки с сетчатым хроматином в отличие от глыбок хроматина зрелых малых лимфоцитов) под действием гомологичного аллергена можно поставить в пенициллиновых флаконах со средой 199. Если через 3...5 дней культивирования лейкоцитов во флаконах с гомологичным аллергеном будет больше лимфобластов, чем во флаконах без аллергена, реакцию считают положительной.

Реакцию миграции макрофагов ставят также в среде 199, которой заливают фиксированные на двух чашках Петри капилляры, заполненные тщательно отмытыми лейкоцитами предположительно сенсibilизированного животного. В среде с гомологичным аллергеном миграция макрофагов из капилляров подавляется соответствующим фактором лимфоцитов; в среде, не содержащей гомологичного аллергена, макрофаги выходят и распространяются по дну чашки Петри вокруг выходного отверстия капилляров на гораздо большей площади. Данная реакция является чувствительным и специфичным тестом на ГТТ и вместе с реакцией бласттрансформации лимфоцитов используется для диагностики туберкулеза.

### 6.3. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Микробные клетки несут на своей поверхности разнообразные антигены, среди которых имеются детерминанты, общие нескольким микроорганизмам или даже идентичные животным клеткам, и уникальные, присущие только данному виду или варианту микроскопических существ. Токсигенные штаммы обычно содержат эти специфичные детерминанты и в экзопродуктах. Для успешного проведения иммунохимического анализа очень важно получить антисыворотку (т. е. иммунную сыворотку) на максимально очищенные специфичные для вида или варианта антигены. Достигается это предварительной дезинтеграцией микробных структур, выделением и очисткой необходимых антигенных комплексов, а также путем специфической адсорбции антисыворотки, полученной на взвесь целых микробных клеток к их оболочкам или на раствор экзотоксина. Пользуются и разведением антисыворотки, чтобы избавиться от неспецифических реакций. Специфичную антисыворотку используют для иммунохимической идентификации антигенов в нативном виде или в виде конъюгатов (антитело + фермент) с видимыми под обычным световым микроскопом ферментами, обнаруживаемыми под люминесцентным микроскопом флюорохромами или видимыми под электронным микроскопом контрастными веществами.

В ветеринарной практике приходится также анализировать растворимые антигены микроорганизмов. Иммунохимической идентификации обычно подвергают клостридии, эшерихии, стафилококки и некоторые другие продуценты экзотоксинов, а также органы и ткани животных, инфицированных сибиреязвенным микробом. Причем в первом случае экзотоксины накапливают обычно культивированием бактерий на специальных средах, во втором — преципитиноген экстрагируют изотоническим раствором хлорида натрия. В лабораториях чаще идентифицируют взвесь микробных клеток, т. е. корпускулярный антиген.

Иммунологические методы, таким образом, имеют следующие отличительные особенности.

Многие иммунологические методы основаны на *взаимодействии антигена с антителом*; высокая специфичность антител позволяет идентифицировать, выделять или количественно определять исследуемый антиген.

*Клеточные популяции* можно выявить и идентифицировать по маркерам клеточной поверхности при помощи иммунофлюоресцентных и иммуногистохимических методов.

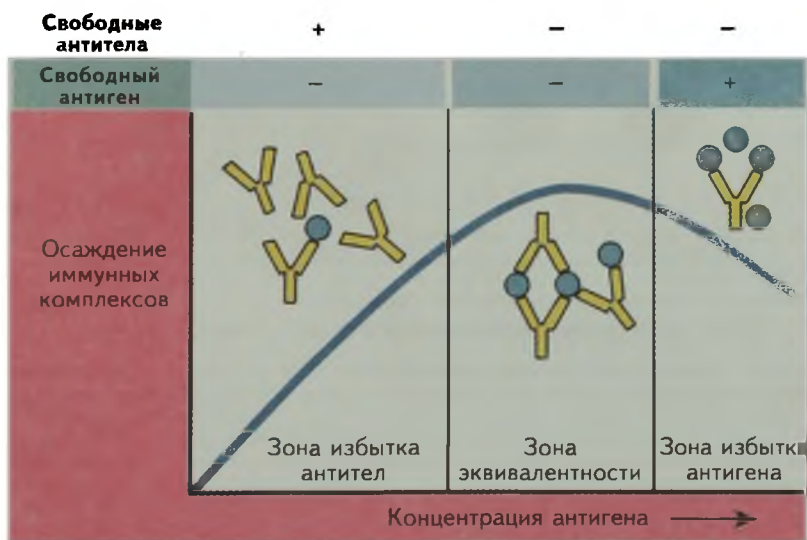
*Выделение популяций клеток*, несущих определенные поверхностные маркеры, можно осуществить различными методами, включая проточную цитофлюориметрию с использованием клеточного сортера, пэннинг («просвечивание» через подложку) и ультрацентрифугирование в градиенте плотности.

Основными показателями функциональной активности лимфоцитов служат продукция антител или цитокинов, пролиферативная реакция на антиген или цитотоксическая активность.

**Реакция преципитации.** Одним из первых описанных проявлений взаимодействия антиген—антитело было образование преципитата при смешивании обоих реагентов в эквивалентных или близких к эквивалентным количествах. Оно наблюдается при постановке классической реакции преципитации с растворимыми антигенами и антителами (рис. 69).

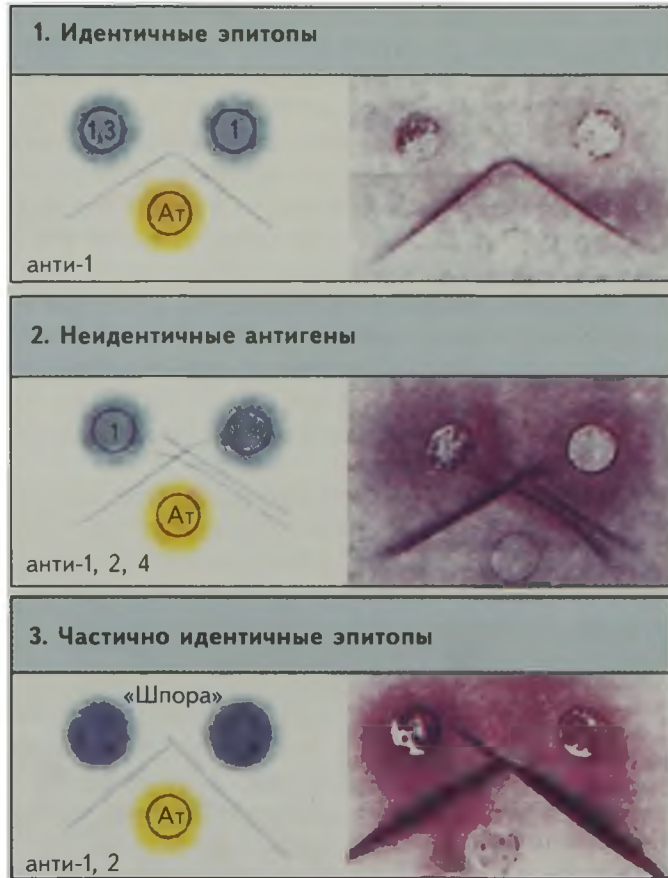
Если проводить эту реакцию в агаровом геле, можно дифференцировать отдельные реакции антиген—антитело, обусловленные различными популяциями антител, присутствующими в сыворотке. Такой метод, названный методом двойной иммунодиффузии, применяется также для проверки сходства между различными антигенами (рис. 70).

Однако некоторые смеси антигенов слишком сложны для разделения просто путем диффузии и преципитации, и для анализа таких смесей был разработан метод иммуноэлектрофореза —



**Рис. 69.** Реакция преципитации.

Классический пример взаимодействия антиген—антитело *in vitro* — это реакция преципитации. Для ее постановки антиген в возрастающих концентрациях добавляют к раствору антител. Количество осаждающихся иммунных комплексов вначале возрастает, а затем понижается. Таким образом, кривая преципитации имеет три зоны. *Зона избытка антител:* количества антигена недостаточно для того, чтобы в реакцию вступили все антитела; в супернатанте определяются свободные антитела. *Зона эквивалентности:* количества антигена достаточно для связывания и осаждения всех имеющихся антител; свободные антигены и антитела в супернатанте отсутствуют. *Зона избытка антигена:* количество антигена превышает необходимое для связывания всех антител, что ведет к снижению содержания антител в преципитате. Это обусловлено солиubilизацией комплексов антиген—антитело вследствие избытка антигена. Выраженность этого феномена варьируется в зависимости от типа антител и вида организма, от которого получены антитела



**Рис. 70. Реакция преципитации в геле: двойная диффузия.**

Для проведения двойной иммунодиффузии агаровый гель наливают на предметные стекла, после застывания вырезают в нем лунки и заполняют их исследуемыми растворами антигена (Ag) и антител (At). Растворы диффундируют в гель, и на той линии, где происходит взаимодействие Ag и At (с перекрестным связыванием и осаждением иммунных комплексов), образуется линия (дуга) преципитации. Ее можно наблюдать визуальнo, если промыть гель (для удаления растворимых белков) и нанести на него краситель, выявляющий белки, например ку-масси синий. Такой метод может быть использован для определения родства между антигенами (синие кружки) и в реакции с данными тест-антителами (желтый кружок). При этом возможны результаты трех основных типов (цифры в синих кружках обозначают эпитопы антигена). В реакции (1) дуги преципитации, образованные антителами и двумя исследуемыми антигенами, сливаются: это показывает, что антитела взаимодействуют с идентичными эпитопами на двух антигенах (эпитоп 1). Такой результат не означает полную идентичность самих антигенов, он свидетельствует только о том, что данные антитела не выявляют различий между ними. В реакции (2) антитела выявляют 3 разных антигена, которые образуют независимые дуги преципитации. В реакции (3) антигены имеют общий эпитоп 1, однако один из них несет еще эпитоп 2. Этот случай отличается от реакции (1) тем, что здесь антитела могут различить антигены, поскольку вступают в реакцию с обоими эпитопами. В результате взаимодействия с антиэпитопом 1 образуется линия идентичности, а там, где антиэпитоп 2 реагирует с эпито-пом 2, формируется «шпора», указывающая на частичную идентичность двух антигенов



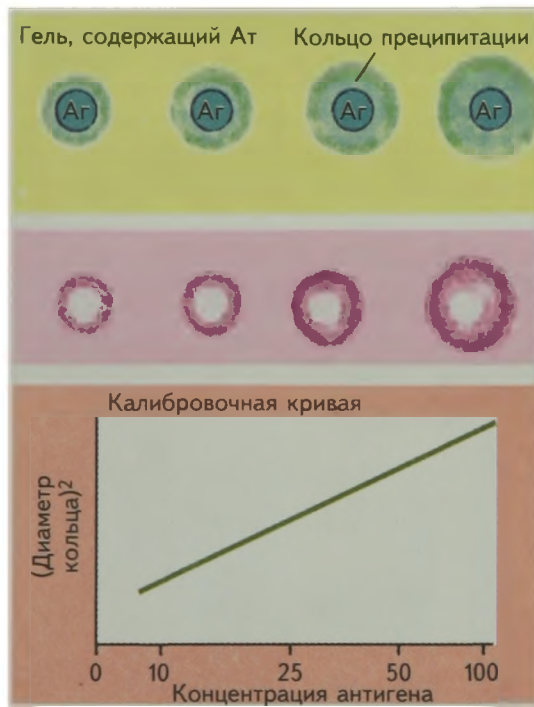


Рис. 71. Простая радиальная иммунодиффузия.

Простая радиальная иммунодиффузия дает возможность количественно определять антигены (Аг). В агаровый гель добавляют антитела (Ат), затем наливают его на предметные стекла и оставляют для застывания. В застывшем геле вырезают лунки и вносят в них стандартный объем раствора антигена различной концентрации. Стекла оставляют не менее чем на 24 ч. В течение этого времени антиген диффундирует в гель и образует с антителами растворимые комплексы (при избытке антигена). Комплексы продолжают диффундировать, связывая все больше антител, пока не будет достигнута точка эквивалентности и не произойдет осаждение комплексов с образованием кольца. По радиусу зоны, ограниченной кольцом преципитации, определяют ее площадь. Величина площади пропорциональна концентрации антигена, которую вычисляют при помощи калибровочной кривой (график внизу). Для определения концентрации антител применяют тот же метод, но в обратной постановке, т. е. в гель добавляют антиген, а антитела вносят в лунки

прежде чем выявлять антигены визуально в реакции преципитации, их разделяют по заряду с помощью этого метода.

Методы, основанные на диффузии в геле, позволяют определять антигены и антитела лишь качественно, количественную же оценку реагирующих компонентов проводят разработанным позднее методом простой радиальной иммунодиффузии (рис. 71).

Иммунодиффузию в электрическом поле можно производить с одновременным встречным движением антигенов и антител; этот способ назван встречным электрофорезом. Аналогичная модификация простой радиальной иммунодиффузии получила название встречного электрофореза (рис. 72).

Описанные методы используются для определения антигенов и антител в концентрации от 20 мкг/мл до 2 мг/мл.

## Встречный электрофорез

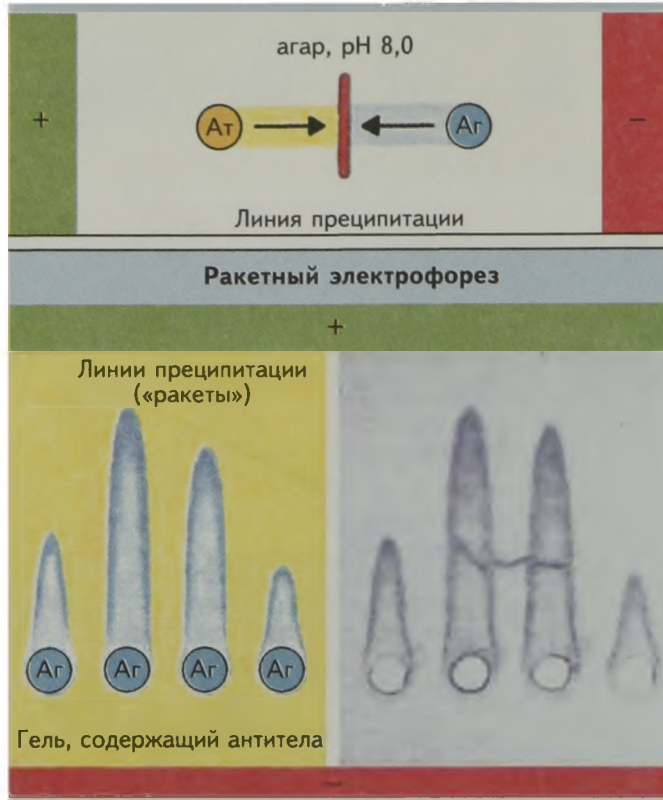


Рис. 72. Встречный электрофорез.

Иммуноэлектрофорез позволяет разделить сложные смеси антигенов, например антигены, содержащиеся в сыворотке крови. Разделение осуществляют в агаровом геле, помещенном в электрическое поле, причем pH геля устанавливают так, чтобы положительно заряженные белки перемещались к катоду, а отрицательно заряженные — к аноду. Встречный электрофорез проводят в агаровом геле, pH которого устанавливают так, чтобы антитела (Ат) несли суммарный отрицательный заряд, а исследуемый антиген (Аг) — положительный. В электрическом поле антиген и антитела движутся навстречу друг другу и преципитируют. Принцип метода тот же самый, что и при двойной иммунодиффузии, однако чувствительность выше в 10—20 раз. Ракетный электрофорез позволяет количественно определять антиген в антителосодержащем геле, pH которого подбирают с таким расчетом, чтобы движения антител не происходило, а антиген нес суммарный отрицательный заряд. Линия преципитации очерчивает область в виде ракеты, длина которой пропорциональна концентрации антигена. Определить эту концентрацию можно по калибровочной кривой. Внизу справа — фотография окрасленного геля. Оба метода основаны на различии суммарных зарядов антигена и антител при выбранном pH; для большинства антигенов такие различия существуют, так как антитела имеют более высокую изоэлектрическую точку (т. е. несут нейтральный заряд при более высоком значении pH, чем большинство антигенов). Если заряды антигена и антител существенно не различаются, можно химически модифицировать антиген, чтобы сдвинуть изоэлектрическую точку. Ракетный электрофорез проводят и в обратной постановке, если требуется определить концентрацию антител; здесь важно правильно подобрать гель и pH для иммобилизации антигена, чтобы не нарушалась его структура и не возникало препятствий для реакции антиген—антитело

**Реакции гемагглютинации и связывания комплемента.** Если антитела присутствуют в столь низких концентрациях, что их не удастся обнаружить и количественно определить при помощи встречного и ракетного электрофореза, применяют реакцию гемагглютинации. Она основана на способности антител перекрестно связываться с эритроцитами, взаимодействуя с их поверхностными антигенами.

Реакция антиген—антитело ведет к образованию иммунных комплексов, которые связывают комплемент при его активации по классическому пути, и на этом основан один из количественных методов определения антигенов и антител (рис. 73). При помощи реакций гемагглютинации и связывания комплемента удастся выявлять антитела, присутствующие в концентрации менее 1 мкг/мл.

**Прямая и непрямая иммунофлюоресценция.** Иммунофлюоресцентные методы широко используются для обнаружения аутоан-

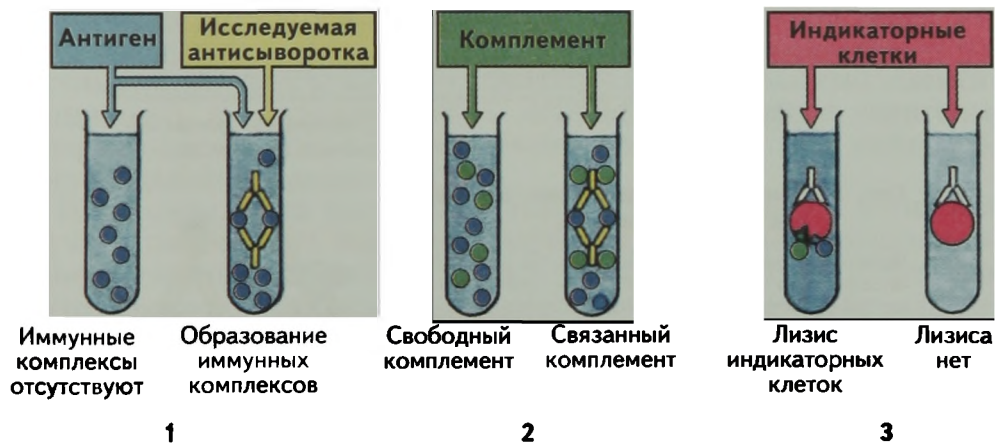
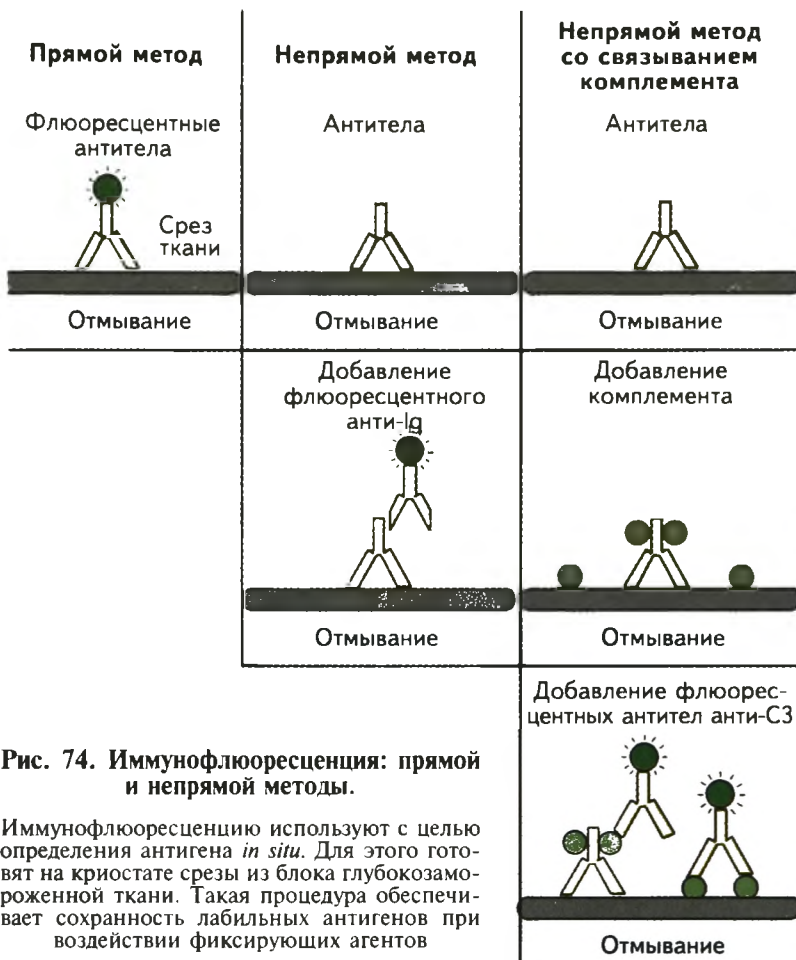


Рис. 73. Реакция связывания комплемента.

Определение антител на основе реакции связывания комплемента. 1. Готовят последовательные двукратные разведения исследуемой сыворотки, разливают их по пробиркам (или вносят в лунки) и в каждую добавляют фиксированное количество антигена. Если сыворотка содержит антитела, образуются иммунные комплексы. 2. К смеси добавляют комплемент. Если комплексы присутствуют, они связывают комплемент и «потребляют» его. 3. На конечном этапе постановки реакции в смесь вносят индикаторные клетки (эритроциты) вместе с субагглютинирующим количеством антиэритроцитарных антител. Если в смеси осталось какое-то количество комплемента, клетки будут лизированы; если же комплемент связан иммунными комплексами на этапе (2), его не хватит для лизиса эритроцитов. Применяют такое количество комплемента, которого как раз достаточно, чтобы лизировать индикаторные клетки при отсутствии потребления комплемента иммунными комплексами. Тест часто проводят на пластиковых планшетах. Данную реакцию можно также использовать для определения антигенов, применяя фиксированное количество антител и антиген в различных разведениях. В этом случае особое значение приобретает постановка соответствующих контролей, так как некоторые препараты антител потребляют комплемент еще до того, как добавлен антиген. Например, это может произойти в том случае, если сыворотка уже содержит иммунные комплексы. Некоторые антигены также обладают антикомплементарной активностью. Поэтому необходимы два контроля с внесением только антител и только антигена; ни тот, ни другой реагент не должен сам по себе связывать комплемент



**Рис. 74. Иммунофлюоресценция: прямой и непрямой методы.**

Иммунофлюоресценцию используют с целью определения антигена *in situ*. Для этого готовят на криостате срезы из блока глубокозамороженной ткани. Такая процедура обеспечивает сохранность лабильных антигенов при воздействии фиксирующих агентов

тител и антител к тканевым и клеточным антигенам (рис. 74). Хотя эти методы технически более сложные, чем описанные выше, они имеют явное преимущество в тех случаях, когда требуется определить число видов антител. Используя срезы тканей (содержащих большое число антигенов), на одном предметном стекле можно выявить антитела к нескольким разным антигенам, установив при этом их внутритканевое (клеточное) или внутриклеточное распределение.

Кроме того, с помощью иммунофлюоресцентных тестов можно идентифицировать отдельные клетки в клеточной суспензии, т. е. выявлять антигены на поверхности живых клеток. Для этой цели суспензию живых клеток, окрашенных специфичными флюоресцентными реагентами, пропускают через проточный флюоресцентный клеточный сортер — прибор, измеряющий интенсивность свечения каждой клетки в разных областях спектра и затем разделяющий клетки по параметрам свечения. Данный метод

позволяет выделять различные клеточные популяции, т. е. разделять клетки, несущие специфические поверхностные антигены и соответственно этому окрашенные различными флюоресцентно меченными антителами.

**Иммунологический анализ антигенов и антител при помощи меченых реагентов.** Методы этой категории отличаются очень высокой чувствительностью и экономичностью в расходовании реагентов (рис. 75).

Наиболее распространенный из всех иммунологических методов — это, вероятно, иммуносорбентный анализ антител с применением лигандов, меченных радиоизотопами или ферментами (ELISA, рис. 76); он позволяет исследовать большое число образцов в относительно короткое время. (Вместо радиоактивных меток теперь все чаще применяют флюоресцентные или хемилюминесцентные маркеры.) Количество антигена можно измерять при помощи метода «двойной антигенной ловушки» или конкурентного иммуноанализа с применением любого маркера для определения.

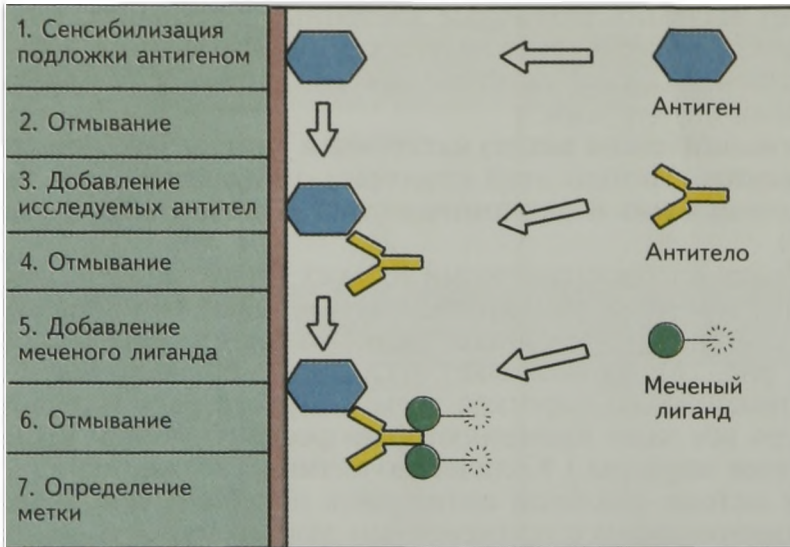
**Иммуноблоттинг и иммунопреципитация.** Описанные выше методы обычно применяют для определения уровня конкретных известных антигенов и антител, однако часто необходимо идентифицировать и охарактеризовать неизвестные заранее антигены, содержащиеся в многокомпонентной смеси. Для этой цели особенно подходит иммуноблоттинг.

При проведении иммуноблоттинга сложную смесь антигенов вначале подвергают гель-электрофорезу, а затем фракционированные пептиды переносят на лист нитроцеллюлозы (блот) для идентификации индивидуальных антигенов при помощи специфических антисывороток. Производя предварительное разделение в геле с додецилсульфатом натрия или в геле для изоэлектрического фокусирования, можно получить данные о размерах и изоэлектрической точке исследуемых антигенов, а также о сходстве (родстве) между ними (рис. 77).

В некоторых случаях в результате электрофореза в геле и процедуры блоттинга антиген денатурирует так, что некоторые из его эпитопов разрушаются и теряют способность связываться со специфическими антителами. В такой ситуации вместо блоттинга следует использовать иммунопреципитацию, чтобы установить, какой антиген связывают антитела. Данный метод может быть применен для определения как растворимых, так и мембранных антигенов.

**Определение комплемента.** Наиболее простой способ измерения активности комплемента состоит в определении концентрации сыворотки, вызывающей гемолиз 50 % клеток в стандартном препарате эритроцитов, сенсibilизированных антигеном (ЭСА). Реакцию проводят в пробирках или на микропланшетах. Для приблизительной оценки активности комплемента более удобен про-



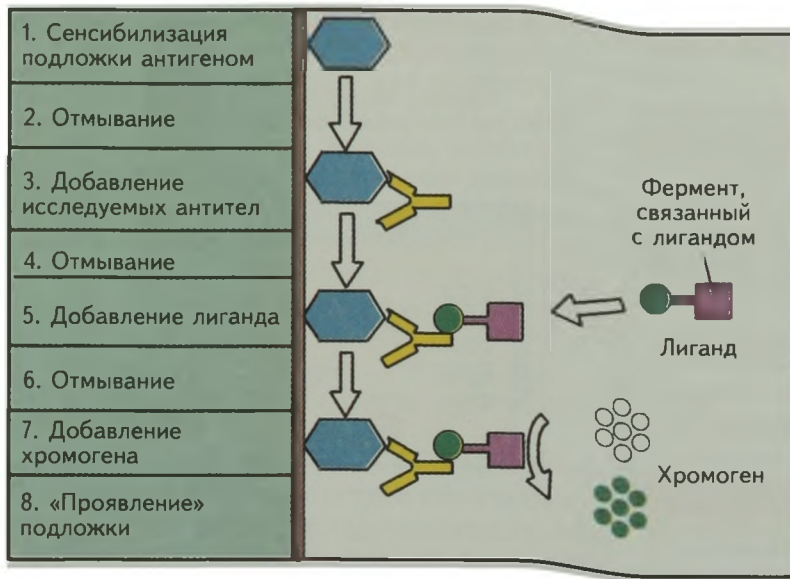


Типичная кривая титрования

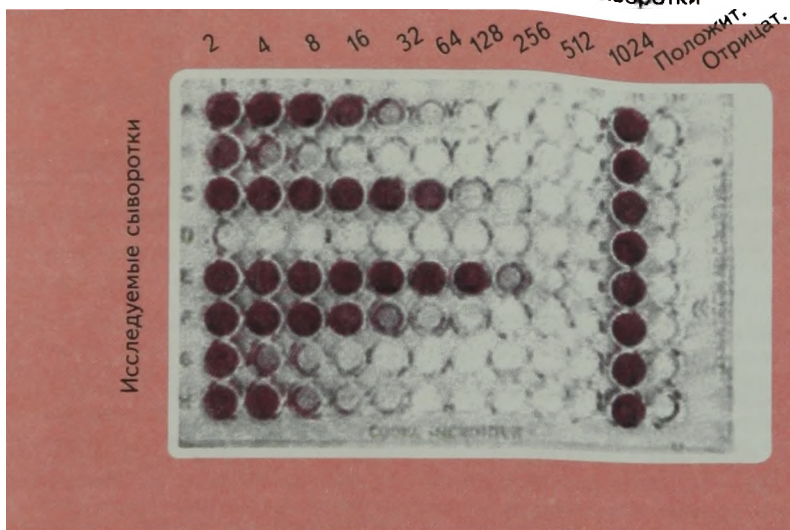


Рис. 75. Иммуноанализ антител.

1. Антиген в солевом растворе инкубируют на пластиковой подложке или в пробирках, в результате чего небольшое его количество адсорбируется на поверхности пластика. 2. Свободный антиген удаляют путем отмывания. (Подложку затем можно обработать избытком постороннего белка, чтобы предотвратить последующее неспецифическое связывание белков.) 3. Добавляют исследуемые антитела, которые связываются с антигеном. 4. Несвязавшиеся белки удаляют отмыванием. 5. Антитела определяют при помощи меченого лиганда. Лигандом может служить, например, стафилококковый белок А, который связывается с Fc-областью IgG; чаще используют другие антитела, специфичные по отношению к исследуемым антителам. Применяя лиганд, который связывается с антителами определенного класса или подкласса, можно дифференцировать изоформы антител. 6. Несвязанные антитела удаляют отмыванием. 7. Определяют связавшуюся метку. Типичная кривая титрования представлена внизу. С повышением количества антител интенсивность сигнала возрастает линейно от фонового значения до уровня плато. Титр антител можно определить правильно лишь в линейной области. Уровень плато, как правило, в 20...100 раз выше фонового. Чувствительность метода обычно составляет приблизительно 1...50 нг специфических антител в 1 мл. Специфичность метода можно проверить, добавив свободный тест-антиген в повышающихся концентрациях к исследуемым антителам на этапе (3). Антиген связывается с антителами и блокирует их соединение с антигеном, фиксированным на подложке. При добавлении возрастающих количеств свободного антигена интенсивность сигнала снижается



Величина, обратная разведению сыворотки



**Рис. 76. Ферментный иммуносorbентный анализ.**

Планшет (подложку) для проведения ELISA готовят точно так же, как для иммуноанализа антител (см. рис. 75) до этапа 4. В этой системе лигандом служит молекула, способная выявить антитела и ковалентно связанная с ферментом, например пероксидазой. Лиганд соединяется с тестируемыми антителами, и после предварительного удаления несвязавшегося лиганда отмыванием (6) связанный лиганд можно визуализировать путем добавления хромогена (7) — бесцветного субстрата, который под влиянием связанного с лигандом фермента превращается в окрашенный продукт реакции. Внизу — фотография «проявленного» планшета (8). Количество тестируемых антител определяют по содержанию окрашенного продукта реакции путем сканирования оптической плотности

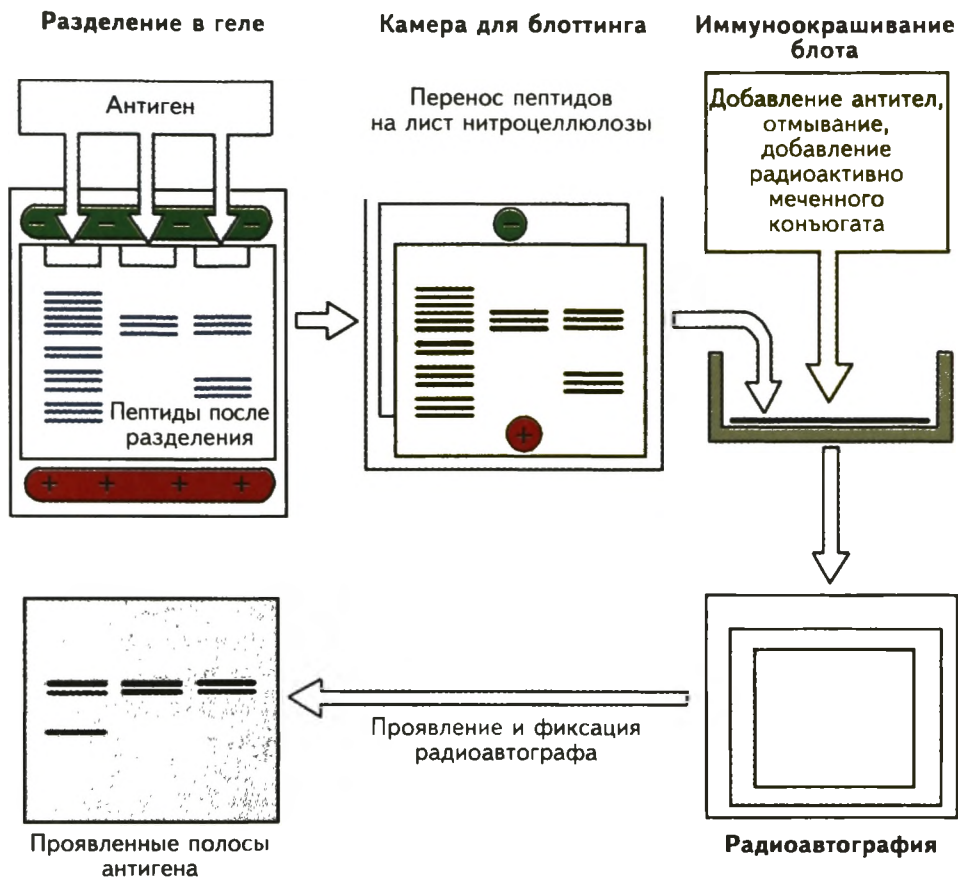


Рис. 77. Иммуноблоттинг.

Для проведения иммуноблоттинга исследуемые антигены сначала разделяют методом электрофореза в геле, например в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия или в геле для изоэлектрического фокусирования. Полученные фракции переносят электрофоретически на лист нитроцеллюлозы (блот), помещенный в специальную камеру. Затем блоты обрабатывают антителами к специфическому антигену, отмывают и добавляют радиоактивно меченный конъюгат для определения связавшихся с антигеном антител. Принцип подобен тому, который используется в РИА или ELISA. После повторного отмывания лист нитроцеллюлозы помещают в кассету с рентгеновской пленкой для радиоавтографии; на проявленной пленке видны полосы локализации антигена, связавшего меченые антитела. Метод можно модифицировать, используя хемилюминесцентную метку или конъюгат антител с ферментом (как в ELISA), выявляющий связанный материал при нанесении непосредственно на нитроцеллюлозный лист вместе с хромогеном

стой радиальный гемолиз. Этот метод сходен с простой радиальной иммунодиффузией, за исключением того, что в лунки вносят исследуемую сыворотку, а гель содержит ЭСА. Вокруг лунки, содержащей активный комплемент, образуется зона гемолиза, величина которой пропорциональна количеству комплемента в исследуемой сыворотке. Данный метод позволяет определять общую активность компонентов классического и лектинового (см. с. 76) путей активации (C1—C9), однако если в сыворотке обнаружен

дефицит комплемента, этим методом невозможно установить, отсутствием какого компонента дефицит обусловлен.

Существуют также методы для определения различных отдельных компонентов комплемента по их содержанию или функциональной активности. Это важное различие, так как компонент может присутствовать в нормальном количестве, но быть функционально не активным. Содержание (уровень) индивидуальных белков комплемента обычно определяют при помощи радиоиммуноанализа (РИА) или ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), используя антитела, специфичные к данному белку. Для измерения функциональной активности в суспензию сенсibilизированных эритроцитов вносят все компоненты комплемента, необходимые для лизиса, за исключением исследуемого белка.

**Получение чистых антител.** В иммунологических исследованиях часто возникает необходимость в получении очищенных препаратов антител, т. е. антигенспецифических либо неспецифических иммуноглобулинов. Выделение неспецифических иммуноглобулинов из сыворотки обычно проводят путем последовательного фракционирования белков, которое включает следующие этапы:

осаждение гамма-глобулинов в 30...50%-ном растворе сульфата аммония;

гель-фильтрация для получения молекул соответствующих размеров;

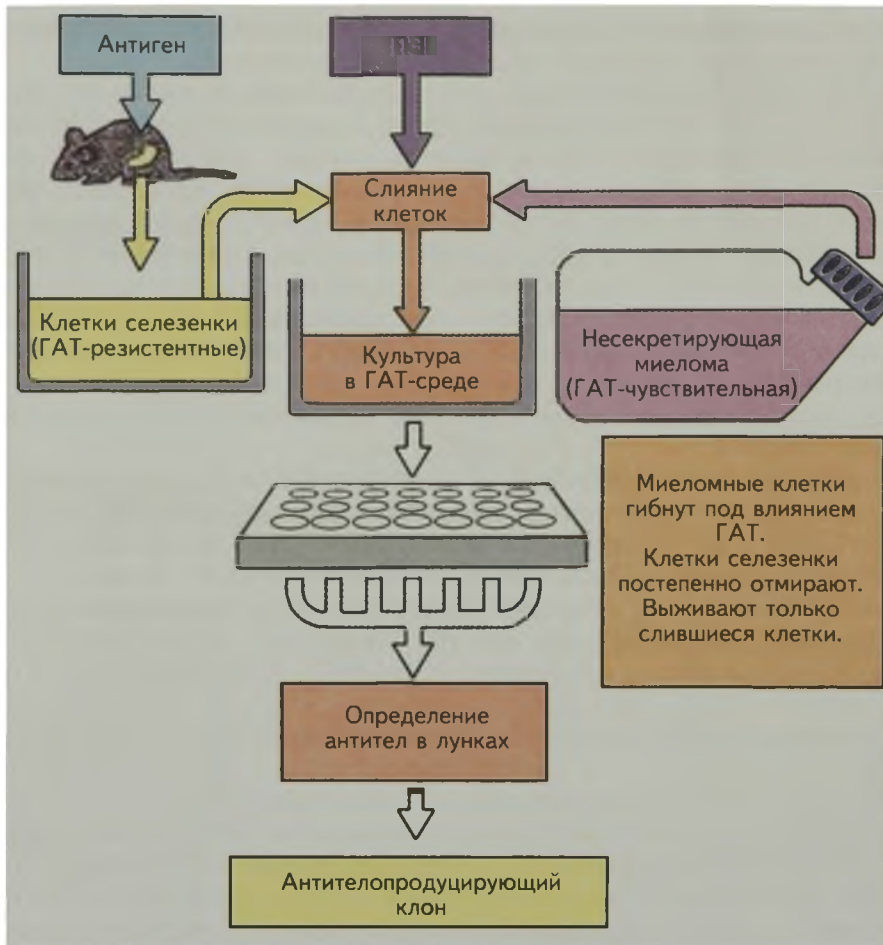
ионообменная хроматография с целью выделения молекул, несущих суммарный положительный заряд при нейтральном рН;

аффинная хроматография с использованием естественных лигандов иммуноглобулинов, например стафилококкового белка А (компонент клеточной стенки стафилококков, связывающийся с областью С<sub>γ</sub>2 и С<sub>γ</sub>3 большинства подклассов IgG, т. е. IgG1, IgG2 и IgG3).

Выделение антигенспецифических иммуноглобулинов осуществляют методом аффинной хроматографии. Антиген «пришивают» к частицам сефарозы и связавшиеся с ним «чистые» антитела элюируют с иммуносорбента хаотропными агентами (например, тиоцианатом натрия) или буферным раствором (глицин—НСl или диэтиламина). Метод аффинной хроматографии применяют и для получения очищенных препаратов антигенов.

**Получение моноклональных антител.** Другим способом получения индивидуальных антител определенной специфичности служит гибридная технология — создание иммортализованной (бессмертной) линии клеток, продуцирующих антитела только одной специфичности, т. е. моноклональные (рис. 78). В такой культуре можно поддерживать антителообразование неопределенно долгое время. Моноклональные антитела несравнимо лучше соответствуют целям иммуноанализа, чем гетерогенные сыворотки, получаемые от иммунных животных, и поэтому нашли широкое





**Рис. 78. Получение моноклональных антител.**

Животных (обычно мышей или крыс) иммунизируют антигеном. Когда продукция антител достигает высокого уровня, из селезенки животных (могут быть использованы и лимфатические узлы) готовят суспензию клеток. Затем вызывают слияние спленоцитов с клетками миеломной линии, применяя для этой цели полиэтиленгликоль (ПЭГ) — агент, способствующий слиянию клеточных мембран. Процесс проходит успешно лишь у небольшого числа клеток. Клеточную смесь, содержащую слившиеся клетки, культивируют в ГАТ-среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин. Аминоптерин является высокотоксичным агентом, блокирующим один из метаболических путей — синтез пуринов. Клетки могут использовать обходной метаболический путь, если в среде присутствуют его метаболиты — гипоксантин и тимидин. Спленоциты способны расти в ГАТ-среде, однако миеломные клетки в ней погибают, так как имеют метаболический дефект, не позволяющий использовать обходной путь синтеза пуринов. Клеточная суспензия, вносимая в ГАТ-среду, содержит спленоциты, клетки миеломы и слившиеся клетки. Спленоциты погибают в культуре естественным путем через 1...2 нед, клетки миеломы не выживают в ГАТ, слившиеся же клетки сохраняют жизнеспособность, поскольку сочетают свойства «бессмертной» миеломы и клеток селезенки, использующих обходной метаболический путь. Некоторые из слившихся клеток сохраняют также способность продуцировать антитела, как исходные спленоциты. Культуральную среду из всех лунок планшета, где зарегистрирован рост клеток, исследуют на присутствие антител желаемой специфичности (часто при помощи иммуносорбентного анализа). Культуры, продуцирующие антитела, клонируют, разводя клеточную взвесь при посеве с таким расчетом, чтобы на каждую лунку приходилась только одна клетка. Эта клетка-предшественница дает начало формированию «бессмертного» клона, продуцирующего моноклональные антитела.



применение в различных областях биологии в качестве высоко-специфичных зондов.

Эффективно продуцировать моноклональные антитела могут любые В-клетки, необходимо лишь сделать их для этого бессмертными и пролиферирующими. Чаще всего для этой цели получают гибридные клетки — путем слияния мышинных спленоцитов с миеломными В-клетками от мышей той же линии, не секретирующими собственных антител. Возможно также получить межлинейные или межвидовые гибриды, однако они часто нестабильны. Другой метод иммортализации — это трансформация клеток, например в случае В-клеток человека путем инфицирования вирусом Эпштейна—Барр.

Разработан также новый метод получения антител, основанный на использовании бактериофагов. При помощи этого интересного метода удается получить экспрессию на поверхности нитевидного бактериофага M13 переменных областей ( $V_H$  и  $V_L$ ) в виде фрагментов (Fv) антител, связывающих антиген с определенной специфичностью и авидностью. Располагая библиотекой таких экспрессируемых бактериофагом фрагментов, можно производить отбор (на основе взаимодействия со специфическим антигеном) фаговых частиц, продуцирующих тот или иной Fv-фрагмент. Кроме того, если данным бактериофагом инфицировать соответствующие бактерии, они начинают выделять Fv-белок в большом количестве в культуральную среду. Такой подход не требует обязательной иммунизации животных или человека.

Моноклональные антитела представляют собой четко определенный реагент, но они не обладают более высокой специфичностью по сравнению с поликлональной антисывороткой, распознающей антиген в результате взаимодействия иммуноглобулинов с его различными эпитопами.

**Выделение популяций лимфоцитов.** Для проведения многих иммунологических исследований *in vivo* и *in vitro* требуются те или иные популяции лимфоцитов. Их получают от экспериментальных животных, в основном из тимуса, селезенки и периферических лимфатических узлов. Некоторые специальные исследования требуют выделения клеток из других участков организма, например из пейеровых бляшек. Рециркулирующие клетки можно получить путем канюлирования грудного лимфатического протока и сбора клеток в течение нескольких часов. У человека наиболее легко выделить лимфоциты периферической крови, а хирургическим путем можно получить также клетки селезенки, миндалин и лимфатических узлов. Однако хирургически отобранный материал часто содержит инфекционные агенты или опухолевые клетки, в зависимости от заболевания, которое вызвало необходимость хирургического вмешательства. Следует иметь в виду, что клеточные популяции, содержащиеся в перечисленных тканях, совершенно различны как по степени зрелос-

ти лимфоцитов, так и по численному соотношению в них клеток разных типов.

Тимус является источником довольно чистой Т-клеточной популяции, однако составляющие ее лимфоциты различаются по степени зрелости. При работе с лимфоцитами из других органов и тканей часто возникает необходимость в выделении отдельных субпопуляций для анализа их особых функций. Применение с этой целью описанного выше проточного флюоресцентного клеточного сортера, позволяющего разделять лимфоциты по их поверхностным маркерам, разрешает получать лишь ограниченное число клеток, поскольку скорость цитометрии с сортировкой весьма низкая. Существует, однако, и ряд методов, позволяющих выделять лимфоциты и их отдельные субпопуляции сразу из всего объема исследуемого образца, — центрифугирование в градиенте плотности, розеткообразование, пэннинг и магнитное разделение.

Выделение в градиенте плотности основано на том, что лимфоциты имеют меньшую плотность, чем эритроциты и гранулоциты. Этот способ позволяет выделять большую часть лимфоцитов крови. Розеткообразование и пэннинг («просеивание» через подложку) используют для выделения субпопуляций. Пэннинг представляет собой разновидность аффинной хроматографии применительно к лимфоцитам. На сходном принципе основан и способ разделения при помощи магнитных гранул, покрытых специфическими антителами (например, анти-CD4). При смешивании с клетками гранулы связывают те из них, которые распознаются фиксированными антителами. Эти клетки можно затем смыть с гранул или выделить путем наложения магнитного поля. Другой способ — он применяется для удаления ненужной клеточной популяции, — основан на использовании антител и комплемента. Если к смеси клеток добавить специфические антитела (например, анти-CD8), а затем комплемент, клетки соответствующей субпопуляции будут лизированы. Конечно, для этого метода пригодны лишь такие антитела, которые связывают комплемент; кроме того, клетки-мишени должны нести на поверхности достаточное количество молекул антигена, чтобы фиксировать литическую дозу комплемента.

Источником определенных популяций лимфоцитов могут служить антигенспецифические Т-клеточные линии, культивируемые в течение длительного периода. Получение таких линий позволяет обойтись без частого выделения первичных культур из органов и тканей животных.

**Методы получения эффекторных клеток.** Разработаны различные методы для определения эффекторных функций лимфоцитов, в частности продукции антител, цитотоксичности и опосредованной Т-лимфоцитами помощи и супрессии.

В-лимфоциты, продуцирующие IgM- или IgG-антитела, можно определить при помощи метода локального гемолиза, или реакции бляшкообразования (рис. 79). Другим способом выявления

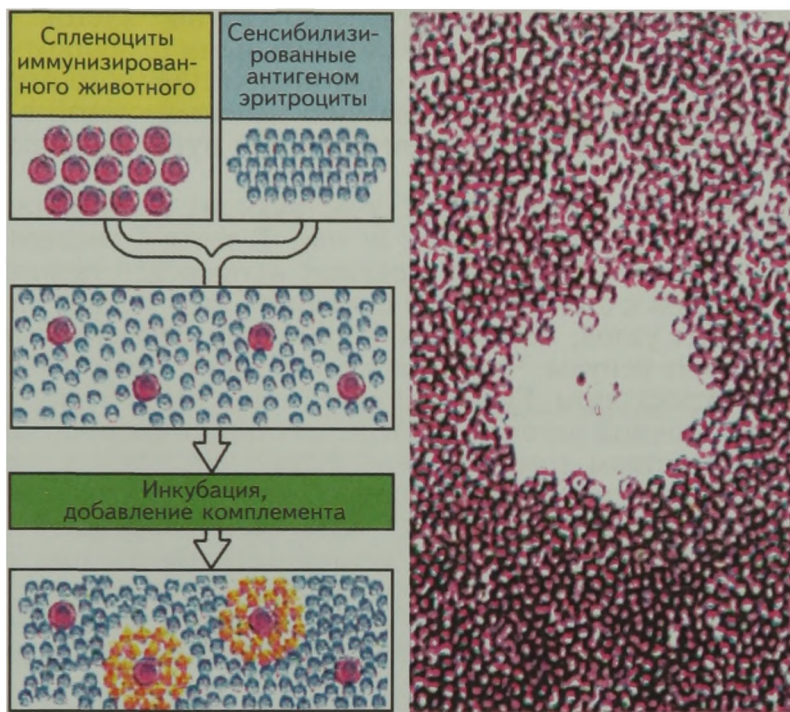


Рис. 79. Определение бляшкообразующих клеток.

Для определения антителообразующих клеток методом локального гемолиза, или бляшкообразования, к исследуемой клеточной популяции добавляют эритроциты, сенсibilизированные антигеном. При последующей инкубации эритроциты, окружающие антителообразующую клетку, связывают секретируемые ею специфические антитела и в результате лизируются комплементом. Вид образующейся при этом зоны просветления — бляшки — с В-клеткой в центре показан справа. Локальный гемолиз может быть двух типов. **Прямой локальный гемолиз:** антигенспецифические IgM-антитела, продуцируемые антителообразующей клеткой, способны непосредственно вызывать комплементзависимый гемолиз, поскольку эти антитела обладают высокой комплементсвязывающей активностью. **Непрямой локальный гемолиз:** антигенспецифические IgG-антитела связывают комплемент не столь эффективно, и чтобы усилить способность IgG-продуцирующих клеток лизировать эритроциты-мишени, требуется добавление антител анти-IgG. Сочетая тесты прямого и непрямого локального гемолиза, можно раздельно определять число IgM- и IgG-образующих клеток

антителообразующих клеток служит иммуноферментный тест ELISPOT. Он позволяет определять функционально активные Т-клетки, секретирующие те или иные растворимые медиаторы, т. е. цитокины. Определение проводят на подложке с иммобилизованными антителами к специфическому цитокину (например, анти-ИФ). Эти антитела связывают данный цитокин, выделяемый Т-клеткой в окружающую зону, и эффект связывания можно выявить путем соответствующей обработки подложки: вокруг цитокинвыделяющих Т-клеток будут видны окрашенные пятнышки.

**Миграция лимфоцитов.** В экспериментах по изучению миграции лимфоцитов *in vivo* обычно исследуют распределение в тех

или иных тканях введенных внутривенно меченых клеток. Клетки метят либо радиоизотопами, либо стабильными флюорохромами. Радиоактивную метку применяют для количественного определения клеточной миграции. Локализацию меченых клеток в органе можно установить радиоавтографически или путем флюоресцентной микроскопии.

Определение молекул адгезии, участвующих в миграции лимфоцитов, проводят, как правило, *in vitro*. В тесте Стэмпера—Вудруфа (Stamper—Woodroffe) определяют непосредственно адгезию лимфоцитов к стенкам венул с высоким эндотелием на срезах лимфатических узлов, пейеровых бляшек или других тканей, содержащих такие венулы. Число адгезированных клеток подсчитывают под микроскопом. Если при добавлении антител против молекул межклеточной адгезии уровень адгезии снижается, это служит доказательством того, что они взаимодействуют в участках, близких к активным центрам данных молекул. Другим способом выявления молекул адгезии может быть блокирование *in vitro* адгезии лимфоцитов к монослою эндотелиальных клеток. В этом случае, чтобы убедиться в присутствии молекул адгезии, метят лимфоциты или эндотелиальные клетки и используют блокирующие адгезию антитела для иммунопреципитации специфических молекул адгезии.

**Контрольные вопросы и задания.** 1. Дайте определение неспецифической, активной и пассивной вакцинации, живым, рекомбинантным и убитым вакцинам. 2. Дайте характеристику современным подходам к созданию эффективных вакцин. 3. Перечислите требования, предъявляемые к вакцинам. 4. В чем роль адьювантов в системе иммунизации? 5. Поясните сущность иммунных диагностических реакций. 6. В чем особенности иммунологических реакций? 7. Изложите сущность следующих иммунологических методов диагностики инфекционных заболеваний: РП, РИД, РГА, РСК, прямой и непрямой ИФ, иммунологический анализ антигенов и антител с помощью меченых реагентов, ферментный иммуносорбентный анализ, иммуноблоттинг, получение моноклональных антител, определение компонента.

---

# ОГЛАВЛЕНИЕ

●

<i>Введение</i> .....	3
<b>Глава 1. Антигены</b> .....	5
1.1. Распознавание антигена — основа приобретенного иммунитета .....	5
1.2. Антигены животного происхождения .....	8
1.3. Антигены бактериальной клетки .....	9
<b>Глава 2. Защитные механизмы макроорганизма</b> .....	13
2.1. Естественная резистентность .....	13
2.2. Иммунная система организма .....	23
2.2.1. Лимфоидные ткани первичных и вторичных лимфоидных органов и образований .....	24
2.2.2. Циркуляция лимфоцитов .....	33
2.3. Клетки, осуществляющие иммунный ответ .....	36
2.3.1. Лимфоидные клетки .....	42
2.3.2. Мононуклеарные фагоциты .....	51
2.3.3. Антигенпрезентирующие клетки .....	52
2.3.4. Полиморфно-ядерные гранулоциты, тучные клетки и тромбоциты .....	55
2.4. Антитела и клеточные рецепторы для них .....	59
2.4.1. Иммуноглобулины — особое семейство белков .....	61
2.4.2. Строение антител .....	65
2.5. Комплемент .....	69
2.5.1. Активация комплемента .....	74
2.5.2. Биологические эффекты комплемента .....	81
<b>Глава 3. Иммунный ответ организма</b> .....	89
3.1. Механизмы иммунного ответа .....	89
3.2. Источники разнообразия антигенраспознающих структур. Теория образования антител .....	93
3.3. Распознавание антигена .....	97
3.3.1. Связывание антител с антигеном .....	98
3.3.2. Распознавание антигена Т-клетками .....	102
3.3.3. Процессинг и презентация антигена .....	103
3.4. Реакции клеточного иммунитета .....	108
3.4.1. Цитокины и их клеточные рецепторы .....	110
3.4.2. Защитные механизмы, независимые от Т-клеток .....	117
3.4.3. Т-зависимый клеточный иммунный ответ .....	122
3.4.4. Роль макрофагов в иммунном ответе .....	123
3.4.5. Образование гранулем .....	126
3.4.6. Взаимодействие клеток при гуморальном иммунном ответе .....	127
3.5. Воспаление .....	131
3.6. Гиперчувствительность — типы I, II, III и IV .....	135
3.6.1. Гиперчувствительность I (немедленного) типа .....	137
3.6.2. Гиперчувствительность II типа .....	139
3.6.3. Гиперчувствительность III типа .....	143
3.6.4. Гиперчувствительность IV типа .....	148



3.7. Иммунитет к бактериальным и микотическим инфекциям .....	152
3.7.1. Иммунитет к бактериям .....	153
3.7.2. Иммунитет к грибам .....	168
<b>Глава 4. Регуляция иммунного ответа .....</b>	<b>170</b>
4.1. Антиген как фактор иммунорегуляции. Антигенпрезентирующие клетки ...	171
4.2. Регуляторное влияние антител .....	174
4.3. Нейроэндокринная регуляция иммунного ответа .....	175
4.4. Иммунологическая толерантность .....	178
<b>Глава 5. Иммунопатология .....</b>	<b>182</b>
5.1. Первичная иммунологическая недостаточность .....	184
5.2. Вторичная иммунологическая недостаточность .....	185
5.3. Кормление и иммунологическая реактивность .....	187
<b>Глава 6. Прикладная иммунология .....</b>	<b>191</b>
6.1. Вакцинация .....	191
6.1.1. Эффективность вакцин .....	197
6.1.2. Адъюванты .....	199
6.1.3. Пассивная иммунизация .....	199
6.2. Принципы регистрации иммунного ответа .....	201
6.3. Иммунологические методы .....	206

*Учебное издание*

**Кисленко Виктор Никифорович,  
Кольчев Николай Матвеевич**

## **ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ**

**Часть 2. Иммунология**

Учебник для вузов

Художественный редактор **В. А. Чуракова**  
Компьютерная верстка **Н. А. Зубковой**  
Корректор **Н. С. Седова**

Сдано в набор 31.01.06. Подписано в печать 23.10.06. Формат 60 × 88<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная. Гарнитура Ньютон. Печать офсетная. Усл. печ. л. 13,72. Изд. № 061. Тираж 2000 экз. Заказ № 6949.

ООО «Издательство «КолосС», 101000, Москва, ул. Мясницкая, д. 17.  
Почтовый адрес: 129090, Москва, Астраханский пер., д. 8. Тел. (495) 680-99-86,  
тел./факс (495) 680-14-63, e-mail: koloss@koloss.ru, наш сайт: www.koloss.ru

Отпечатано с готовых диапозитивов в ОАО ордена «Знак Почета»  
«Смоленская областная типография им. В. И. Смирнова».  
214000, г. Смоленск, пр-т им. Ю. Гагарина, 2.