

## СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие . . . . .	11
Список аббревиатур . . . . .	14
<b>Глава 1. Введение в иммунологию . . . . .</b>	<b>15</b>
1.1. Краткий обзор истории иммунологии . . . . .	15
1.1.1. Зарождение иммунологии . . . . .	15
1.1.2. Развитие иммунологии до середины XX века . . . . .	17
1.1.3. «Новая иммунология» 50–80-х годов XX века . . . . .	19
1.1.4. Современный этап развития иммунологии — молекулярная иммунология . . . . .	22
1.2. Естественная история иммунитета . . . . .	23
1.3. Краткое изложение иммунологии . . . . .	28
1.3.1. Молекулы-мишени иммунитета (образы патогенности, антигены) и распознающие их рецепторы . . . . .	29
1.3.2. Иммунная система . . . . .	31
1.3.3. Первая линия иммунной защиты . . . . .	35
1.3.4. Адаптивный иммунный ответ . . . . .	36
1.3.5. Эффекторные механизмы иммунного ответа. Взаимосвязь факторов врожденного и адаптивного иммунитета . . . . .	41
1.3.6. Иммунологическая память . . . . .	44
<b>Глава 2. Врожденный иммунитет . . . . .</b>	<b>47</b>
2.1. Миелоидные клетки как основа врожденного иммунитета . . . . .	47
2.1.1. Кроветворные стволовые клетки и миелопоэз . . . . .	47
2.1.2. Нейтрофилы . . . . .	52
2.1.3. Эозинофилы . . . . .	57
2.1.4. Тучные клетки и базофилы . . . . .	58
2.1.5. Моноциты и макрофаги . . . . .	63
2.1.6. Дендритные клетки . . . . .	71
2.1.7. Клетки, вовлекаемые в иммунные процессы при воспалении . . . . .	78
2.2. Распознавание чужого в системе врожденного иммунитета . . . . .	79
2.2.1. Toll-подобные рецепторы . . . . .	80
2.2.2. Лектиновые и другие мембранные паттернраспознающие рецепторы . . . . .	85
2.2.3. Цитоплазматические паттернраспознающие рецепторы . . . . .	88
2.2.4. Активация клеток врожденного иммунитета . . . . .	88
2.2.5. Биологическая опасность, ее маркеры и реакция на них организма . . . . .	94
2.3. Клеточные механизмы врожденного иммунитета . . . . .	95
2.3.1. Молекулы адгезии . . . . .	96
2.3.1.1. Селектины и их рецепторы . . . . .	96
2.3.1.2. Интегрины и их рецепторы . . . . .	98
2.3.2. Хемотаксические факторы. Хемокины . . . . .	105
2.3.2.1. Основные группы хемоаттрактантов . . . . .	105
2.3.2.2. Хемокины и их рецепторы . . . . .	106
2.3.2.3. Хемокины в очаге воспаления. Интерлейкин-8 и другие провоспалительные хемокины . . . . .	115
2.3.3. Эмиграция и хемотаксис лейкоцитов . . . . .	118

Данное пособие является ознакомительным  
Коммерческое использование данного файла запрещено

Еще больше полезного и уникального  
материала ищите в нашем сообществе  
ВраЧитаLLa (самообразование врача)



ВраЧитаLLa

2.3.4. Фагоцитоз . . . . .	122
2.3.4.1. Адгезия фагоцитов к объектам фагоцитоза. Феномен опсонизации . . . . .	123
2.3.4.2. Рецепторы для распознавания опсонинов (Fc- и C3-рецепторы) . . . . .	126
2.3.4.3. Активация, обусловленная связыванием рецепторов фагоцитов. Формирование фагоцитарной чаши . . . . .	130
2.3.4.4. Формирование и созревание фагосомы . . . . .	132
2.3.5. Бактерицидная функция фагоцитов . . . . .	133
2.3.5.1. Кислородзависимые факторы бактерицидности . . . . .	134
2.3.5.2. Оксид азота и его производные . . . . .	137
2.3.5.3. Факторы бактерицидности, не зависящие от кислорода и оксида азота . . . . .	138
2.3.6. Секреторная и киллерная активность фагоцитов . . . . .	143
2.3.6.1. Выброс фагоцитами продуктов деградации (дегрануляция) . . . . .	143
2.3.6.2. Дегрануляция эозинофилов как основа внеклеточного цитоллиза . . . . .	145
2.3.6.3. Контактная киллерная активность миелоидных клеток . . . . .	147
2.4. Вклад лимфоидных клеток во врожденный иммунитет.	
Естественные киллеры . . . . .	149
2.4.1. Характеристика естественных киллеров . . . . .	149
2.4.2. Развитие и гомеостаз популяции естественных киллеров . . . . .	151
2.4.3. Рецепторы естественных киллеров . . . . .	153
2.4.3.1. Активирующие рецепторы естественных киллеров . . . . .	155
2.4.3.2. Ингибирующие рецепторы естественных киллеров . . . . .	158
2.4.4. Эффекторные функции естественных киллеров . . . . .	160
2.4.4.1. Контактный цитоллиз и его стадии . . . . .	160
2.4.4.2. Цитолитический иммунный синапс и передача сигнала от рецепторов естественных киллеров . . . . .	161
2.4.4.3. Механизмы контактного цитоллиза . . . . .	164
2.4.5. Естественные киллеры и иммунная защита . . . . .	165
2.5. Гуморальные факторы врожденного иммунитета . . . . .	166
2.5.1. Система комплемента . . . . .	167
2.5.1.1. Факторы системы комплемента . . . . .	168
2.5.1.2. Активация комплемента по альтернативному пути . . . . .	171
2.5.1.3. Активация комплемента по классическому пути . . . . .	174
2.5.1.4. Активация комплемента по лектиновому пути . . . . .	176
2.5.1.5. Атака клеточной мембраны . . . . .	177
2.5.1.6. Факторы контроля системы комплемента . . . . .	179
2.5.1.7. Роль комплементзависимых процессов в иммунной защите и повреждении . . . . .	180
2.5.2. Белки острой фазы воспаления. Пентраксины . . . . .	181
2.5.3. Биогенные амины . . . . .	185
2.5.4. Липидные медиаторы. Эйкозаноиды . . . . .	186
2.5.5. Цитокины . . . . .	190

2.5.5.1. Общая характеристика цитокинов. . . . .	190
2.5.5.2. Рецепторы для цитокинов . . . . .	198
2.5.5.3. Внутриклеточная передача сигнала при действии цитокинов . . . . .	201
2.5.5.4. Особенности функционирования системы цитокинов. Цитокиновая сеть . . . . .	203
2.5.5.5. Провоспалительные цитокины. . . . .	206
2.5.6. Интерфероны. . . . .	218
2.5.6.1. Интерфероны типов I и III . . . . .	220
2.5.6.2. Интерферон $\gamma$ . . . . .	226
<b>Глава 3. Адаптивный иммунитет. . . . .</b>	<b>231</b>
3.1. Молекулы, распознающие антигены. . . . .	231
3.1.1. Иммуноглобулины/антитела . . . . .	231
3.1.1.1. Строение иммуноглобулинов. Полипептидные цепи. . . . .	232
3.1.1.2. V-домены и антигенсвязывающие участки иммуноглобулинов . . . . .	238
3.1.1.3. С-домены, изотипы и антигенные варианты иммуноглобулинов . . . . .	239
3.1.2. В-клеточный рецептор. . . . .	242
3.1.2.1. Мембранный иммуноглобулин . . . . .	242
3.1.2.2. Дополнительные полипептидные цепи В-клеточного рецептора. . . . .	243
3.1.3. Т-клеточный рецептор и связанные с ним молекулы . . . . .	244
3.1.3.1. Димеры $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$ . . . . .	245
3.1.3.2. Комплекс CD3 . . . . .	247
3.1.3.3. Коррецепторы Т-клеток. . . . .	249
3.1.4. Генетические основы формирования и перестройки генов антигенраспознающих рецепторов . . . . .	251
3.1.4.1. Формирование генов рецепторов лимфоцитов . . . . .	252
3.1.4.2. Соматический мутагенез V-генов иммуноглобулинов . . . . .	260
3.1.4.3. Переключение константных генов иммуноглобулинов . . . . .	260
3.1.4.4. Переключение синтеза с мембранных на секретируемые иммуноглобулины. . . . .	262
3.2. Антигены. . . . .	263
3.2.1. Антигены, распознаваемые В-клетками, и их взаимодействие с антителами. . . . .	263
3.2.1.1. Чужеродность антигенов. . . . .	264
3.2.1.2. Иммуногенность антигенов. . . . .	265
3.2.1.3. Специфичность антигенов. . . . .	271
3.2.1.4. Взаимодействие антигенов и антител . . . . .	276
3.2.2. Главный комплекс гистосовместимости и антигены, распознаваемые Т-клетками. . . . .	281
3.2.2.1. Главный комплекс гистосовместимости. . . . .	282
3.2.2.2. Процессинг антигена для Т-клеток . . . . .	288
3.2.2.3. Особенности распознавания антигенных лигандов рецепторными комплексами Т-клеток . . . . .	295

3.2.2.4. Суперантигены .....	297
3.3. Лимфоидные клетки .....	298
3.3.1. В-лимфоциты .....	301
3.3.1.1. Характеристика В-лимфоцитов .....	301
3.3.1.2. Развитие В-лимфоцитов .....	302
3.3.1.3. Субпопуляции В-лимфоцитов .....	310
3.3.2. Т-лимфоциты .....	314
3.3.2.1. Субпопуляции Т-клеток .....	314
3.3.2.2. «Классические» $\alpha\beta$ Т-клетки .....	317
3.3.2.3. Развитие $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов .....	318
3.3.2.4. Селекция тимоцитов и формирование субпопуляций CD4 <sup>+</sup> и CD8 <sup>+</sup> клеток .....	326
3.3.2.5. Естественные регуляторные Т-клетки .....	333
3.3.2.6. NKT-клетки .....	336
3.3.2.7. $\gamma\delta$ Т-клетки .....	338
3.4. Органы иммунной системы .....	342
3.4.1. Первичные лимфоидные органы .....	344
3.4.1.1. Костный мозг .....	344
3.4.1.2. Тимус .....	345
3.4.1.3. Бурса Фабриция. Аналоги бursы и тимуса .....	358
3.4.1.4. Гуморальные факторы, контролирующие развитие лимфоцитов .....	359
3.4.1.5. Апоптоз, его роль в развитии и функционировании клеток иммунной системы .....	364
3.4.2. Вторичные (периферические) лимфоидные органы .....	371
3.4.2.1. Лимфатические узлы .....	372
3.4.2.2. Селезенка .....	374
3.4.2.3. Лимфоидная ткань слизистых оболочек .....	376
3.4.2.4. Лимфоидная ткань, связанная с кожей .....	380
3.4.2.5. Рециркуляция лимфоцитов .....	381
3.4.2.6. Обновление и гомеостаз лимфоидной популяции .....	385
3.5. Активация лимфоцитов и запуск иммунного ответа .....	389
3.5.1. Презентация антигена .....	389
3.5.1.1. Миграция клеток, участвующих в презентации антигена .....	392
3.5.1.2. Иммунный синапс .....	394
3.5.1.3. Костимуляция .....	399
3.5.2. Активация Т-лимфоцитов .....	403
3.5.2.1. Молекулярные основы активации Т-клеток .....	403
3.5.2.2. Проявления активации Т-клеток .....	413
3.5.2.3. Пролиферативная экспансия клонов Т-хелперов .....	414
3.5.3. Дифференцировка Т-хелперов .....	416
3.5.3.1. Th1- и Th2-клетки .....	416
3.5.3.2. Th17 и другие адаптивные субпопуляции Т-клеток .....	423
3.5.3.3. Цитокины, контролирующие и опосредующие адаптивные реакции лимфоцитов .....	426
3.6. Иммунный ответ .....	430

3.6.1. Клеточный иммунный ответ . . . . .	432
3.6.1.1. Цитотоксический Т-клеточный иммунный ответ . . . . .	433
3.6.1.2. Воспалительный Т-клеточный иммунный ответ . . . . .	441
3.6.2. Гуморальный иммунный ответ . . . . .	446
3.6.2.1. Активация В-лимфоцитов. Роль Т-клеток и цитокинов . . . . .	447
3.6.2.2. Дифференцировка и селекция В-клеток в зародышевых центрах . . . . .	453
3.6.2.3. Дифференцировка плазматических клеток и секреция антител . . . . .	458
3.6.2.4. Эффекторные функции антител . . . . .	462
3.6.2.5. Гибридомы и моноклональные антитела. Генно-инженерные антитела . . . . .	465
3.6.3. Иммунологическая память и вторичный иммунный ответ. . .	468
3.6.3.1. В-клетки памяти . . . . .	469
3.6.3.2. Т-клетки памяти . . . . .	470
3.6.3.3. Вторичный иммунный ответ . . . . .	476
3.6.4. Неклассические проявления иммунных реакций. . . . .	479
3.6.4.1. Функциональная активность В1-клеток . . . . .	479
3.6.4.2. Тимуснезависимый иммунный ответ и антигеннезависимая дифференцировка антителообразующих клеток . . . . .	481
3.6.4.3. Проявления активности $\gamma\delta$ T- и $CD8\alpha\alpha^+$ Т-клеток. . . . .	483
3.6.4.4. Иммунологические функции NKT-клеток . . . . .	485
3.6.5. Иммунные процессы в слизистых оболочках (мукозальный иммунный ответ) . . . . .	486
3.6.5.1. Локальные процессы в слизистых оболочках при внедрении патогенов . . . . .	486
3.6.5.2. Аfferентное и центральное звенья мукозального иммунного ответа . . . . .	487
3.6.5.3. Роль миграции клеток в мукозальном иммунитете . . . .	488
3.6.5.4. Эффекторные механизмы мукозального иммунитета. . .	492
3.6.5.5. Развитие мукозального иммунного ответа при повторном контакте с патогеном . . . . .	495
3.6.6. Контроль и регуляция иммунного ответа . . . . .	495
3.6.6.1. Генетический контроль иммунного ответа . . . . .	496
3.6.6.2. Эндокринный и нервный контроль иммунного ответа . . . . .	500
3.6.6.3. Регуляция иммунного ответа . . . . .	505
3.6.6.4. Регуляторные Т-клетки . . . . .	512

#### **Глава 4. Иммуитет в защите и повреждении организма.**

<b>Патология иммуитета . . . . .</b>	<b>518</b>
4.1. Защитные функции иммуитета . . . . .	518
4.1.1. Противоинфекционный иммуитет . . . . .	518
4.1.1.1. Инфекционные агенты как иммуногены. Запуск противоинфекционного иммуитета . . . . .	518

4.1.1.2. Проявления иммунной защиты против основных групп патогенов . . . . .	532
4.1.1.3. Протективный иммунитет при инфекционных заболеваниях. . . . .	540
4.1.2. Противоопухолевый иммунитет . . . . .	541
4.1.2.1. Концептуальные аспекты . . . . .	541
4.1.2.2. Антигены, ассоциированные с опухолями . . . . .	543
4.1.2.3. Эффекторные механизмы противоопухолевого иммунитета. . . . .	546
4.1.2.4. Механизмы избегания опухолью иммунного надзора. . .	550
4.1.2.5. Пути активизации противоопухолевой защиты . . . . .	552
4.2. Иммунитет в аллогенных системах. . . . .	553
4.2.1. Генетика гистосовместимости . . . . .	554
4.2.2. Трансплантационный иммунитет . . . . .	555
4.2.3. Трансплантация костного мозга. Реакция «трансплантат против хозяина». . . . .	560
4.2.4. Пересадка органов в клинической практике. Подходы к преодолению трансплантационной реакции . . . . .	563
4.2.5. Переливание крови. . . . .	564
4.3. Иммунологическая толерантность и анергия. . . . .	566
4.3.1. Искусственная иммунологическая толерантность к трансплантатам. . . . .	566
4.3.2. Естественная иммунологическая толерантность . . . . .	569
4.3.2.1. Ауто толерантность и ее механизмы . . . . .	569
4.3.2.2. Выбор между активацией и анергией в лимфоидной ткани слизистых оболочек. . . . .	577
4.3.2.3. Иммунологически привилегированные органы . . . . .	580
4.3.2.4. Иммунологические взаимоотношения матери и плода . . . .	582
4.4. Аутоиммунная патология . . . . .	588
4.4.1. Иммунопатогенез аутоиммунных заболеваний . . . . .	589
4.4.1.1. Причины нарушения ауто толерантности . . . . .	589
4.4.1.2. Генетические аспекты аутоиммунной патологии . . . . .	597
4.4.1.3. Иммунологические механизмы повреждения при аутоиммунных процессах . . . . .	598
4.4.2. Аутоиммунные заболевания. . . . .	600
4.4.2.1. Органоспецифические аутоиммунные заболевания . . . .	601
4.4.2.2. Системные аутоиммунные заболевания. . . . .	605
4.5. Гиперчувствительность . . . . .	607
4.5.1. Аллергия немедленного типа (гиперчувствительность I типа) . . . .	609
4.5.1.1. Общая схема развития и проявления аллергических процессов. . . . .	609
4.5.1.2. Аллергены. . . . .	611
4.5.1.3. Индукция аллергического иммунного ответа. . . . .	612
4.5.1.4. Механизмы реализации аллергических реакций . . . . .	615
4.5.1.5. Роль нарушения баланса субпопуляций Т-клеток . . . . .	622
4.5.1.6. Роль наследственных и внешних факторов в развитии аллергии. . . . .	623

4.5.1.7. Аллергические заболевания . . . . .	624
4.5.1.8. Принципы лечения аллергических заболеваний . . . . .	627
4.5.2. Другие типы гиперчувствительности. . . . .	630
4.5.2.1. Цитотоксический тип гиперчувствительности (гиперчувствительность II типа) . . . . .	630
4.5.2.2. Гиперчувствительность, связанная с иммунокомплексной патологией (гиперчувствительность III типа) . . . . .	632
4.5.2.3. Гиперчувствительность замедленного типа (гиперчувствительность IV типа). . . . .	635
4.6. Опухоли иммунной системы — лимфопролиферативные процессы . . . . .	639
4.6.1. Лимфоидные клетки при лимфопролиферативных процессах и их соответствие нормальным прототипам. . . . .	640
4.6.2. Генетические перестройки и вирусная инфекция при лимфопролиферативных процессах . . . . .	642
4.7. Иммунодефициты . . . . .	646
4.7.1. Первичные иммунодефициты . . . . .	646
4.7.1.1. Общие проблемы генетики первичных иммунодефицитов. . . . .	647
4.7.1.2. Локализация иммунологических дефектов при первичных иммунодефицитах . . . . .	648
4.7.1.3. Нарушение иммунной защиты и проявления иммунопатологии при первичных иммунодефицитах. Проблемы диагностики и лечения. . . . .	651
4.7.1.4. Первичные иммунодефициты, связанные с поражением врожденного иммунитета . . . . .	655
4.7.1.5. Первичные иммунодефициты, связанные с поражением адаптивного иммунитета. . . . .	660
4.7.1.6. Другие иммунодефициты с поражением лимфоцитов. . . . .	669
4.7.2. ВИЧ-инфекция и синдром приобретенного иммунодефицита. . . . .	676
4.7.3. Вторичные иммунодефициты. . . . .	686
4.7.3.1. Иммунодефицитные состояния, обусловленные гибелью иммуноцитов . . . . .	688
4.7.3.2. Вторичные иммунодефициты, обусловленные функциональными нарушениями лимфоцитов. . . . .	692
4.7.3.3. Физиологические иммунодефициты . . . . .	694
4.8. Применение методов и принципов иммунологии в практической медицине: иммунодиагностика, иммунопрофилактика, иммунотерапия . . . . .	700
4.8.1. Основы современной иммунодиагностики. . . . .	700
4.8.1.1. Области использования иммунологических методов в клинико-лабораторной практике . . . . .	700
4.8.1.2. Методология лабораторной иммунодиагностики. . . . .	701
4.8.1.3. Оценка состояния врожденного иммунитета . . . . .	704

---

4.8.1.4. Оценка состояния адаптивного иммунитета . . . . .	705
4.8.2. Иммунопрофилактика . . . . .	709
4.8.2.1. Вакцинация против возбудителей инфекционных заболеваний. . . . .	709
4.8.3. Иммунотерапия. . . . .	720
4.8.3.1. Медикаментозная иммунотерапия. . . . .	721
4.8.3.2. Иммунодепрессанты . . . . .	725
4.8.3.3. Иммунобиотерапия . . . . .	727
Послесловие . . . . .	738
Предметный указатель . . . . .	740

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Данная книга первоначально задумывалась как переработанный и обновленный вариант учебника «Основы иммунологии», вышедшего более десяти лет тому назад (в 1999 г.) в издательстве «Медицина». Однако изменения, которые произошли за этот срок в иммунологии, столь глубоки, что потребовали не просто обновления или дополнения старого текста новыми сведениями, а создания новой книги. В этом читатель сможет убедиться, сопоставляя структуры старой и новой книг или, проще, сравнивая их оглавления.

Задача, которую ставил перед собой автор, состояла в создании систематизированного свода современных иммунологических знаний, приемлемого как для начинающих изучать иммунологию, так и для опытных иммунологов. Учитывая значительную степень сложности этой науки, ее многочисленные пересечения со смежными фундаментальными научными дисциплинами, эта задача во всей ее полноте выглядит практически неразрешимой. Однако может быть избрана некая степень приближения к этому идеалу, определяемая возможностями охвата «иммунологического поля» самим автором и соблюдения баланса полноты описания и доступности изложения.

При написании книг, претендующих на отражение современного состояния науки, возникает еще одна проблема: темп развития науки в наше время очень стремителен и можно не сомневаться, что уже через 5 лет книга будет выглядеть, по крайней мере в некоторых ее разделах, устаревшей. Избежать этого невозможно, и единственным выходом из положения может служить периодическое переиздание книги с внесением изменений хотя бы по узловым вопросам.

Сосредотачивая внимание на последних достижениях науки, не следует, однако, забывать о существовании другой задачи, менее подверженной веяниям времени и, возможно, более существенной, чем отражение последних новаций. Эта задача (на этот раз вполне соответствующая требованиям к учебникам) состоит в выявлении стабильных устоев данной конкретной науки, наиболее существенных ее составляющих, которые мало изменяются со временем. Именно эти устои определяют индивидуальный «портрет» науки. Отмечу, что уникальная особенность иммунологии состоит в том, что ее «сердцевина» не вполне стабилизировалась и меняется во времени в большей степени, чем основы других наук. Достаточно сказать, что на протяжении полувека парадигма иммунологии менялась по меньшей мере два раза — сначала при рождении «неинфекционной» (по преимуществу клеточной) иммунологии в 50–60-е годы XX века и затем — совсем недавно, при формировании новых представлений об иерархии и взаимодействии врожденного и адаптивного иммунитета. Читатели с большим стажем знакомства с руководствами и учебниками по иммунологии, написанными в разное время, согласятся, что книги по иммунологии, опубликованные в 30-х, 60-х и 2000-х годах, порой как будто излагают основы разных наук. Уточнение сущности иммунологии и сохранение преемственности с предшествующими периодами развития науки являлось одной из важных задач, стоявших перед автором данной книги.

Структура книги во многом определяется желанием автора донести многообразие иммунологических знаний по возможности широким способом.

Этой цели служит развернутое «Введение в иммунологию», представляющее собой первую главу руководства. Можно сказать, что в ней содержится трехкратное изложение основ иммунологии. Сначала это сделано в форме экскурса в историю — как описание основных вех становления и развития иммунологии. Не следует рассматривать это описание как краткую историю иммунологии: автор не владеет спецификой этой науки. Второй раз динамический аспект использован в эскизном описании естественной истории иммунитета, которая также не является сколько-нибудь полным изложением филогенеза иммунитета, а отражает лишь реализацию во времени самых важных событий развития иммунологических явлений и процессов. Наконец, в этой главе представлено краткое описание основ иммунологии в ее современном понимании, но без каких-либо деталей. Пользуясь возможностью, автор вводит основные термины иммунологии (антиген, антитело, иммунологическое распознавание и т.д.), но намеренно избегает использования более частных терминов. Задача этой главы состоит в таком кратком и нерасчлененном изложении материала, которое позволит охватить предмет иммунологии единым взглядом.

Остальные главы книги содержат описание того же материала, но уже в детализованном виде, который может быть воспринят лишь как сумма фрагментов. Их объединение в целое потребует особых усилий, которые могут быть подкреплены возвращением к главе 1. Этот материал размещен в трех главах. Назначение двух из них очевидно: они посвящены описанию феноменологии и механизмов соответственно врожденного и адаптивного иммунитета. Отмечу, что еще недавно эти разделы иммунологии казались несопоставимыми по объему и значимости, поскольку к врожденному иммунитету иммунологи традиционно относились свысока как к «предымунологии» и охотно уступали соответствующий материал другим наукам, например, патофизиологии. Следы такого несбалансированного отношения к врожденному и адаптивному иммунитету видны в любом учебнике по иммунологии, написанном после второй мировой войны, включая учебник-предшественник этой книги. Лишь коренное изменение иммунологической идеологии, порожденное работами С.А. Janeway и его последователей, привело к восстановлению должного баланса.

Содержание последней главы требует отдельного комментария. В предыдущих главах описываются явления и их механизмы практически без оценки их значимости с точки зрения поддержания здоровья или развития болезней. Для восполнения этого пробела потребовалось специальное рассмотрение роли иммунных механизмов в защите от двух основных проявлений биологической агрессии — инфекционных атак и опухолевого роста. Здесь же отражены «издержки» иммунитета, в основном адаптивного, в виде поломок тонкого механизма дискриминации «свое—чужое» с развитием аутоагрессии, а также чрезмерных проявлений иммунных процессов (гиперчувствительности), вызывающих повреждение, и их недостаточности, проявляющейся в виде разнообразных иммунодефицитов. Глава завершается кратким изложением областей, касающихся прямого применения в практике принципов и методов иммунологии — иммунодиагностики, иммунопрофилактики и иммунотерапии. Эти стремительно

развивающиеся направления клинической иммунологии еще не сложились в зрелые разделы науки, многое в них основано на поспешных выводах, продиктованных практическим запросом. Однако они чрезвычайно важны и перспективны. Автор совершенно сознательно отказался от более полного и детального рассмотрения этих проблем — в силу их научной «незавершенности» и заведомо прикладной ориентации, не соответствующей доминирующей направленности книги.

Обилие иллюстративного материала отражает основную идеологию книги — стремление к доступному описанию сложных явлений и процессов.

Автор совершенно отчетливо представляет, что предлагаемая книга полна недочетов и несовершенств, что может быть компенсировано знакомством с другими аналогичными изданиями — отечественными и зарубежными.

*А.А. Ярилин*

## СПИСОК АББРЕВИАТУР

BCR — антигенраспознающий рецептор В-лимфоцитов (*B-cell reseptor*)  
CDR — участок, определяющий комплементарность (*Complementarity determining region*)  
CLP — общий лимфоидный предшественник (*Common lymphoid progenitor*)  
ELP — ранний лимфоидный предшественник (*Early lymphoid progenitor*)  
G-CSF — гранулоцитарный колониестимулирующий фактор  
GM-CSF — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор  
GM-линия — гранулоцитарно-макрофагальная линия  
HLA — лейкоцитарный антиген человека (*Human leukocyte antigen*)  
IFN — интерферон  
IL — интерлейкин  
ITAM — активационный тирозинсодержащий мотив иммунорецепторов (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)  
ITIM — ингибирующий тирозинсодержащий мотив иммунорецепторов (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*)  
KIR — иммуноглобулиноподобный рецептор киллерных клеток (*Killer cell Ig-like receptor*)  
LFA — функциональный антиген лимфоцитов (*Lymphocyte fuctional antigen*)  
MBL — маннозсвязывающий лектин (*Mannosa-binding lectin*)  
M-CSF — моноцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор  
MHC — главный комплекс гистосовместимости (*Major histocompatibility complex*)  
MHC-I — молекула главного комплекса гистосовместимости I класса  
MHC-II — молекула главного комплекса гистосовместимости II класса  
NK-клетки — естественная киллерная клетка (*Natural killer*)  
PAMP — патогенассоциированные молекулярные паттерны, образы патогенности (*Pathogen-associated molecular patterns*)  
PI<sub>3</sub>K — фосфатидилинозитол 3-киназа  
PLC — фосфолипаза C  
SCF — фактор стволовых клеток (*Stem cell factor*)  
TCR — антигенраспознающий рецептор Т-лимфоцитов (*T-cell reseptor*)  
TGF — трансформирующий фактор роста (*Transforming growth factor*)  
TIL — лимфоцит, инфильтрирующий опухоль (*Tumor-infiltrating lymphocyte*)  
TLR — Toll-подобный рецептор (*Toll-like receptor*)  
TNF — фактор некроза опухоли (*Tumor necrosis factor*)  
АКТГ — адренокортикотропный гормон  
АПК — антигенпрезентирующая клетка  
АТФ — аденозинтрифосфат  
БЦЖ — бацилла Кальмета–Жерена  
ВИЧ — вирус иммунодефицита человека  
ГДФ — гуанинозиндифосфат  
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота  
ЛПС — липополисахарид  
РНК — рибонуклеиновая кислота  
РТПХ — реакция «трансплантат против хозяина»  
СКВ — системная красная волчанка  
ТКИН — тяжелая комбинированная иммунная недостаточность  
ТН — тимуснезависимый  
ТН-1 антиген — тимуснезависимый антиген (ответ) типа 1  
ТН-2 антиген — тимуснезависимый антиген (ответ) типа 2  
цАМФ — циклический аденозинмонофосфат

# Глава 1

## Введение в иммунологию

### 1.1. КРАТКИЙ ОБЗОР ИСТОРИИ ИММУНОЛОГИИ

#### 1.1.1. Зарождение иммунологии

По происхождению иммунология — прикладная медицинская наука. Ее предыстория насчитывает более 2 тыс. лет. На протяжении этого времени основным подходом в данной области был эмпирический поиск путей предотвращения инфекционных заболеваний. В основе такого поиска было достоверное наблюдение о том, что люди, перенесшие некоторые «заразные болезни», повторно ими не заболевали. Ярко и очевидно этот факт проявлялся при оспе — именно это заболевание стало «плацдармом» для формирования иммунологии.

Описано предупреждение развития оспы у наследника китайского императора с помощью нанесения на слизистую носа материала из пустул людей, выздоравливающих от оспы. Это первое письменное свидетельство, которое однозначно можно отнести к области иммунологии (около 1 тыс. лет до н.э.). Профилактический опыт в данном случае был успешным. Подобный подход, позже названный европейцами вариоляцией (от лат. *variola* — оспа), был, по-видимому, независимо разработан в разных вариантах во многих регионах Азии. Во всяком случае, вариоляция была широко распространена к началу XVIII века, когда жена британского посла в Константинополе, леди Монтегю, в своих письмах (это был скорее роман в письмах) описала и пропагандировала эту процедуру. На протяжении XVIII века практика вариоляции, особенно после ее усовершенствования Р. Суттоном (*R. Sutton*), получила широкое распространение в Европе, вписавшись в идеологию эпохи Просвещения. Европейские монархи подвергали вариоляции своих детей и внуков в знак причастности прогрессивным веяниям времени (по настоянию Екатерины II оспа была привита ей и ее сыну — будущему императору Павлу I). Надо признать, что вариоляция несла значительный риск и нередко приводила к развитию заболевания и смерти, что в конце концов было осознано европейцами, не готовыми жертвовать даже единичными гражданами ради абстрактного прогресса (в азиатской традиции с большей легкостью относятся к индивидуальным утратам). Вариоляция была запрещена в большинстве стран.

В 90-х годах XVIII века английский врач Э. Дженнер (*E. Jenner*), работавший в сельской скотоводческой местности, сделал наблюдение, что коровницы, контактировавшие со скотом, больным коровьей оспой, если и заболевали человеческой оспой, то переносили ее легко (самим коровницам этот факт был известен давно). Основываясь на этом подтвержденном, но все-таки эмпирическом факте, Э. Дженнер предпринял рискованный эксперимент на человеке: он привил коровью оспу от заболевшей ею коровницы 8-летнему Джеймсу Фиппсу. Реакция на прививку проявилась в виде кратковременного недомогания. Повторная прививка коровьей оспы дала еще более слабую реакцию. После этого Дженнер предпринял шаг, который в

настоящее время мог бы быть расценен как преступление: привил подростку материал от больного человеческой оспой. Заболевание не развилось. Отчет об этом успешном опыте вакцинации (от латинского *vacca* — корова) был опубликован в научной прессе в 1796 г. Однако эту публикацию нельзя расценивать как начало иммунологии, поскольку речь в ней шла о конкретной профилактической процедуре, а не об общих принципах и правилах, которые можно было бы расценивать как фундамент новой науки. На протяжении XIX века вакцинация приобрела широкое распространение в цивилизованном мире и применялась в практически неизменном виде до недавнего времени, когда международное сообщество признало факт элиминации оспы (1980).

Рождение иммунологии как науки связано с именем Л. Пастера (*L. Pasteur*). Широко известно, что Л. Пастер создал микробиологию и доказал роль микроорганизмов в развитии и распространении заразных (инфекционных) заболеваний. Он же сформулировал общие принципы иммунологической профилактики инфекционных заболеваний, что рассматривают как отправную точку иммунологии как самостоятельной науки. В качестве точки отсчета ее существования принимают 1880 г., когда были опубликованы результаты исследований Л. Пастера по созданию и успешному испытанию живой ослабленной вакцины против куриной холеры. Суть экспериментов состояла в том, что курам прививали вибрионы куриной холеры, долгое время культивированные в неблагоприятных условиях, что не вызывало у животных заболевания и в то же время предотвращало развитие заболевания при последующем введении активных возбудителей холеры кур, убивавших невакцинированных птиц. Фактически был получен результат, сходный с результатом Э. Дженнера, но с двумя существенными различиями. Во-первых, Л. Пастер ставил эксперимент на птицах, а не на человеке. Во-вторых, профилактический эффект основывался не на «перекрестной защите», индуцированной предварительным введением родственного, но иного инфекционного агента, а на сознательно разработанной процедуре «ослабления» (аттенуации) возбудителя, используемого для профилактической иммунизации. Тем не менее термин «вакцинация» применяют ко всем типам профилактики, основанным на предварительном введении инфекционного материала, возбудителя или его молекул.

В результате этого исследования Л. Пастер ввел еще один, более значимый термин — **иммунитет**. Он происходит от латинского *immunitas* — освобождение. Феодалное право обозначало этим термином наличие у некоторых слоев населения привилегий, их освобождение от податей и т.д. Термин сохранился в качестве правового до наших дней и используется для обозначения неприкосновенности дипломатов — дипломатического иммунитета. Интересно, что в древности термином «иммунитет» обозначали также устойчивость к ядам, в том числе приобретенную благодаря приему их в малых дозах («Фарсалия» Лукана, I век н.э.). Слово «иммунитет» с медицинским значением («освобождение от болезни») впервые зафиксировано в 1869 г. в словаре Литтре (*Littrais*). Л. Пастер вкладывал в это понятие близкий, но более конкретный смысл — снижение вероятности развития инфекционного заболевания после повторного заражения, т.е. после ранее перенесенной инфекции.

Серия исследований Л. Пастера привела к созданию вакцин против сибирской язвы и краснухи свиней. В 1885 г. Л. Пастер и его ученики создали вакцину против бешенства, на этот раз предназначенную для человека (элемент риска при этом также присутствовал, но апробация вакцины была оправдана предшествующим экспериментальным опытом; важно отметить, что для оценки эффективности вакцины вирус бешенства не вводили). Фактически при этом использовали уже современные принципы клинических испытаний препаратов.

### 1.1.2. Развитие иммунологии до середины XX века

В ближайшие десятилетия после открытий Л. Пастера в результате интенсивной деятельности в основном французско-русской (в Институте Пастера работало много русских, внедрявших затем идеи и практические подходы иммунологии в России) и немецкой школ были достигнуты успехи в развитии прикладной иммунологии и заложены основы иммунологической теории.

Первыми следует упомянуть работы И.И. Мечникова, открывшего фагоцитоз и интерпретировавшего его как фундаментальный механизм иммунитета. В это время был создан ряд новых вакцин, причем не только учениками Л. Пастера, но и немецкими учеными, тяготевшими, главным образом, к школе Р. Коха (*R. Koch*). В этом ряду надо выделить работы Э. Беринга (*E. Behring*), показавшего (совместно с С. Китазато, 1890) возможность иммунизации против инактивированных токсинов (анатоксинов) и «переноса иммунитета» с сывороткой крови. Фактически опыт с переносом иммунитета послужил первым свидетельством существования **антител** — гуморальных факторов, опосредующих специфичный в отношении возбудителя инфекционного заболевания иммунитет. Термин «антитело» ввел П. Эрлих (*P. Ehrlich*) в 1891 г. Р. Кох, прославившийся открытием и изучением возбудителя туберкулеза и внесший большой вклад в развитие иммунологии, описал реакцию на туберкулин (1890), ставшую первым примером иммунного процесса, обусловленного лимфоцитами (задолго до того, как возможность развития таких реакций была теоретически обоснована).

Ученые один за другим описывали новые иммунологические феномены и факторы. И.И. Мечников первым стал говорить о существовании специализированной системы (иммунной системы), функция которой — формирование и осуществление реакций иммунитета. Л. Дейтч (*L. Deutsch*) ввел термин «**антиген**» (1903) для обозначения веществ, на которые реагирует иммунная система, обеспечивая их удаление из организма. Разработав способ окрашивания клеток, П. Эрлих описал основные разновидности лейкоцитов, которые уже тогда считали эффекторными (исполнительными) клетками иммунитета. Он же описал тучные клетки — главные эффекторы аллергических реакций немедленного типа. **Аллергия** была открыта в 1902 г. Ш. Рише (*C. Richet*) и П. Портье (*P. Portier*), описавшими феномен анафилаксии. Ж. Борде (*J. Bordeau*) открыл **систему комплемента**. Начало развиваться учение о неинфекционном иммунитете, т.е. о возможной направленности иммунологических механизмов не против инфекционных агентов, а против тканей — чужеродных и даже собственных. Основы иммунологических процессов, направленных против чужеродных тканей внутри вида

животных, были в принципе раскрыты К. Ландштейнером (*K. Landsteiner*), показавшим наличие генетически детерминированного полиморфизма на примере эритроцитов — он открыл группы крови системы АВ0. Возможность аутоиммунных процессов, т.е. иммунных процессов, направленных против собственных антигенов, была обоснована П. Эрлихом и Ю. Моргенротом (*Y. Morgenroth*) в первые годы XX века.

Этот новый и разнообразный фактический материал осмысливали в процессе его накопления. К началу XX века существовало 2 основных теоретических направления в иммунологии — клеточное, созданное И.И. Мечниковым, и гуморальное, родоначальником которого был П. Эрлих (именно за альтернативные, но равные по значимости теории иммунитета они были удостоены Нобелевской премии в 1908 г.). И.И. Мечников полагал, что в основе иммунной защиты лежат клеточные механизмы фагоцитоза, хотя и не отрицал вклада гуморальных факторов (прежде всего антител), например, в качестве опсонизирующих агентов. В теориях П. Эрлиха содержались элементы, значительно опережающие время, в частности, идея предсуществования и селекции рецепторов для антигенов, ставшая через полвека на ином научном фундаменте основой современной иммунологии.

Открытия, разработки и теории рубежа XIX–XX вв. послужили основой классической иммунологии. За работы этого периода было присуждено 6 Нобелевских премий, в том числе самая первая премия по физиологии и медицине, присужденная Э. Берингу (табл. 1.1).

**Таблица 1.1.** Нобелевские премии по физиологии и медицине, присужденные за исследования, относящиеся к области иммунологии

Год	Ученые	Формулировка
1901	Е. von Behring (Германия)	За работы по серотерапии и ее использование в борьбе против дифтерии
1905	R. Koch (Германия)	За исследования и открытия в области туберкулеза
1908	И.И. Мечников (Россия), P. Ehrlich (Германия)	За создание теорий иммунитета
1913	C. Richet (Франция)	За открытие и изучение анафилаксии
1919	J. Bordet (Бельгия)	За открытие комплемента
1930	K. Landsteiner (Австрия)	За открытие групп крови человека
1951	M. Theiler (ЮАР)	За создание вакцины против желтой лихорадки
1960	F. Burnet (Австралия), P. Medawar (Великобритания)	За исследование приобретенной иммунологической толерантности
1972	R. Porter (Великобритания), G. Edelman (США)	За установление химического строения антител
1980	B. Benacerraf (США), J. Dausset (Франция), G. Snell (США)	За открытие поверхностных структур клеток, регулирующих иммунологические реакции

Окончание табл. 1.1

Год	Ученые	Формулировка
1984	N. Jerne (Великобритания), C. Milstein (Великобритания), G. Koehler (Германия)	За разработку теории идиотипической сети; за разработку технологии гибридом
1987	S. Tonegava (Япония)	За открытие генетических механизмов генерации разнообразия антигенраспознающих рецепторов
1996	R. Zinkernagel (Швейцария), P. Doherty (США)	За открытие механизмов распознавания антигенов Т-клетками с участием молекул МНС

Однако на протяжении 20–30 гг. XX века иммунология постепенно превращалась в раздел медицинской микробиологии и интенсивность ее развития существенно снизилась. Единственное серьезное фундаментальное достижение за этот период — создание иммунохимии (*K. Landsteiner*, *M. Heidelberger* и др.) в результате приложения к иммунологии законов химической кинетики. Это способствовало прогрессу в понимании взаимодействия антигенов и антител в период, когда антитела еще не были выделены в чистом виде, и их природу только начали изучать (работы *A.W. Tiselius* по электрофорезу сывороточных белков, показавшие, что антитела принадлежат преимущественно к фракции  $\gamma$ -глобулинов).

### 1.1.3. «Новая иммунология» 50–80-х годов XX века

Несмотря на то, что во время второй мировой войны фундаментальные научные исследования практически не проводили, именно тогда была доказана роль лимфоцитов в иммунологических процессах. Сразу после окончания войны начался новый этап развития иммунологии, на котором доминировало неинфекционное клеточное направление. Работы в области инфекционной иммунологии (в тот период они практически полностью сводились к вакцинологии) продолжались, но были оттеснены на периферию науки, поскольку основывались исключительно на принципах «классической иммунологии» предшествующего периода. Тогда иммунологические процессы особенно четко разделили на специфические (в современной терминологии — адаптивный иммунитет) и неспецифические (таковыми считались проявления врожденного иммунитета); последние не вызывали интереса в рамках «новой иммунологии». Довольно активно проводили исследования в области гуморального иммунитета; достаточно сказать, что именно в этот период антитела не только были выделены, но и достаточно полно охарактеризованы с химической точки зрения в качестве особых белков — иммуноглобулинов в работах Р. Портера (*R. Porter*) и Дж. Эдельмана (*G. Edelman*). Однако основные успехи нового витка развития иммунологии были связаны не с ними.

Иммунология в течение 4 послевоенных десятилетий была основана прежде всего на изучении роли лимфоцитов в иммунитете. П. Медавар (*P. Medawar*) в исследованиях, начатых еще во время войны, доказал иммунологическую природу отторжения аллотрансплантатов и вместе с други-

ми исследователями показал, что главный фактор трансплантационного иммунитета — не антитела, а лимфоциты, способные перенести эту форму иммунитета интактным реципиентам (*E. Mitchison*). Одновременно с этим генетики обнаружили гены, которые кодируют молекулы, определяющие тканевую несовместимость. Главные из этих генов образуют комплекс, названный главным комплексом гистосовместимости — МНС (от *Major histocompatibility complex*). В контексте этих исследований сформировалось очень важное противопоставление «свое—чужое».

Эти экспериментальные факты, а также революционные достижения в области биологии (точнее, возникшей тогда молекулярной биологии) вступили в противоречие с «инструктивными» теориями синтеза антител, возникшими в 30-е годы. Суть этих теорий сводилась к тому, что уникальная структура антител и их способность специфически связывать антиген обусловлена влиянием антигена на химическую структуру белка-антитела или на его конформацию (по современной терминологии — фолдинг). Такие представления противоречили аксиомам молекулярной биологии и были отвергнуты. Взамен было предложено несколько вариантов селекционных теорий, возрождавших представления П. Эрлиха (теория боковых цепей) о стимуляции антигеном синтеза предсуществующих комплементарных ему рецепторов. Наиболее полно отражала воззрения тех лет (а по принципиальным позициям — и сегодняшнего дня) селекционно-клональная теория Ф.М. Бернета (*F.M. Burnet*, 1957), особенно в совместной редакции Ф.М. Бернета и Дж. Ледерберга (*J. Lederberg*).

Суть селекционно-клональной теории сводится к следующему. В организме спонтанно возникают клоны лимфоцитов, несущих на своей поверхности рецепторы, специфичные ко всем возможным антигенам (точнее их участкам — эпитопам). При этом 1 клон распознает 1 эпитоп. Характер реакции лимфоцитов на распознаваемый их рецепторами антиген зависит от степени зрелости: недостаточно зрелые лимфоциты погибают, а зрелые пролиферируют и дифференцируются в антителообразующие и другие эффекторные клетки. Поэтому клоны, распознающие антигены, представленные в данном организме, погибают и остаются только клоны, распознающие чужеродные антигены.

В процессе экспериментальной разработки этой проблемы П. Медавар и его сотрудники открыли явление иммунологической толерантности, т.е. «терпимости» к чужеродным субстанциям, если они вводилось до завершения созревания иммунной системы. Тем самым было показано, что дискриминация «своего» и «чужого» не задана генетически, а формируется в онтогенезе.

В 60-е годы XX века был достигнут значительный прогресс в анализе гетерогенности лимфоцитов. Открытие иммунологической роли тимуса [Дж. Миллер (*J.F.A.P. Miller*), 1961] позволило разделить лимфоциты на две популяции — тимусзависимые (Т) и зависимые от бursы — органа, в котором развиваются эти клетки у птиц (В). Было показано, что при образовании антител В- и Т-клетки кооперируют, причем В-клетки служат предшественниками антителопродуцентов, а Т-клетки — их «помощниками» (Т-хелперы). В то же время Т-клетки могут выступать в качестве самостоятельных исполнителей иммунологических функций (например, при отторжении

трансплантата или защите от вирусов) в качестве цитотоксических Т-лимфоцитов (Т-киллеров). В начале 70-х годов возникло учение о Т-супрессорах — клетках, подавляющих иммунный ответ, в частности на аутоантигены. Тогда же была открыта еще одна разновидность лимфоцитов — естественные киллеры (NK-клетки) — аналоги цитотоксических Т-лимфоцитов в системе врожденного иммунитета.

Очередные вопросы касались природы антигенспецифических рецепторов В- и Т-клеток и механизмов распознавания ими антигенов. Ответы на эти вопросы в отношении В-лимфоцитов были найдены быстро. На поверхности В-клеток обнаружили мембранные иммуноглобулины — антитела, определявшие специфичность клонов В-клеток (что подтвердило одно из положений теории Бернета). Торжеством идей Ф.М. Бернета стало создание гибридомной технологии, позволившей получать моноклональные антитела [Дж. Кохлер (*G. Kohler*), К. Мильштейн (*C. Milstein*), 1975]. Обеспечив слияние антителообразующих клеток с опухолевыми (т.е. придав антителопродуцентам способность к неограниченной пролиферации), удалось разделить популяцию на клоны и выделить их гомогенные продукты — моноклональные антитела. Биотехнологическая важность этого достижения (возможность получать гомогенные антитела заданной специфичности в неограниченном количестве) даже превзошла его теоретическую значимость. Фактически это определило переход иммунологии на новый уровень, произошедший примерно десять лет спустя. В конце 1970-х годов была в принципе раскрыта природа разнообразия антигенраспознающей способности антител — С. Тонегава (*S. Tonegawa*) открыл и расшифровал процесс реаранжировки (перестройки) вариабельных генов В-лимфоцитов; позже было показано, что на той же основе формируется разнообразие V-генов Т-лимфоцитов.

Установление природы антигенраспознающего рецептора Т-клеток и закономерностей распознавания антигенов этими лимфоцитами было другой важнейшей проблемой иммунологических исследований в 70-е годы. Главный прорыв в этой области связан с работами Р. Цинкернагеля (*R. Zinkernagel*) и П. Догерти (*P. Dogherti*), установивших, что Т-клетки распознают не свободный антиген, а его фрагмент, встроенный в состав молекул МНС. Природа Т-клеточного рецептора (TCR) была установлена только в начале 80-х годов. Оказалось, что TCR — не иммуноглобулины, но родственные им молекулы двух разных типов.

В 80-е годы сформировалось учение о цитокинах, однако оно было основано на данных, полученных в предшествующие десятилетия. Были расшифрованы основные процессы, происходящие в тимусе, связанные с дифференцировкой и селекцией Т-лимфоцитов. В начале 80-х годов произошло событие, оказавшее большое влияние на иммунологию: было описано новое заболевание, иммунодефицит вирусной природы — синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), — которое сразу приобрело высокую социальную значимость. Это способствовало росту финансирования исследований в области иммунологии и повышению их методического уровня, что затронуло как фундаментальную науку, так и прикладные клинико-иммунологические исследования. В этот период начинается распространение базовых методов современной иммунологии — иммуноферментного анализа, а затем — проточной цитометрии.

Этот период развития иммунологии, показавший важность клеточных основ адаптивного иммунитета и фактически игнорировавший факторы врожденного иммунитета, завершился во второй половине 80-х годов XX века, когда в иммунологию стали интенсивно внедрять методы и принципы молекулярной иммунологии. Конец этого периода ознаменовался своеобразным кризисом, показавшим, что не все экспериментальные данные предшествовавшего периода выдерживают испытание новыми научными подходами: так, применение методов клеточного и молекулярно-генетического клонирования показало, что разновидность Т-лимфоцитов — Т-супрессоры, как таковые, супрессорами не являются.

#### **1.1.4. Современный этап развития иммунологии — молекулярная иммунология**

Молекулярно-биологические методы и технологии стали неотъемлемой частью иммунологии на рубеже 80-х и 90-х годов, что ознаменовало ее переход на новый уровень. В это время важным показателем достоверности данных стало применение при исследованиях генетических подходов. Чрезвычайно широкое применение получили трансфекция и нокаут генов, а также использование клеточных клонов и моноклональных антител. Для этого периода характерно активное обращение (на новом методическом и идеологическом уровнях) к инфекционной иммунологии, включая создание вакцин нового типа. Одновременно обострился интерес к практическому применению получаемых результатов (возможно, это стало следствием чрезвычайного удорожания научных исследований, проведению которых необходимо было дать практическое обоснование). Излюбленной областью создания и применения новых молекулярно-биологических моделей стала иммуноонкология. Понятие «вакцина» претерпело изменения: теперь этим термином стали обозначать не только профилактические антиинфекционные препараты, как прежде, но и препараты для лечения онкологических, аллергических и аутоиммунных заболеваний. Однако следует признать, что, несмотря на большую интенсивность исследований и чрезвычайно высокий методический и технологический уровень работ, проводимых в данных направлениях, реальные практически значимые достижения в них невелики.

К особенностям этого периода развития иммунологии можно отнести чрезвычайно высокие требования к методической стороне исследований, явно выраженную прикладную ориентацию и очевидное пренебрежение теоретическими обобщениями. Экспериментальные достижения этого периода очень многочисленны, но их значимость не всегда можно оценить. Назовем лишь некоторые из них: расшифровка сигнальных путей, обеспечивающих активацию лимфоцитов и клеток врожденного иммунитета; изучение дендритных клеток, как клеток, связывающих врожденный и адаптивный иммунитет (с дендритными клетками связаны многие попытки практического применения достижений иммунологии, в частности при создании вакцин разного рода); расшифровка факторов и механизмов, определяющих распределение клеток в организме и пути их рециркуляции, а также гомеостаз лимфоидных клеток; открытие механизмов формирования лимфоидных органов; обнаружение гетерогенности хелперных Т-лимфоци-

тов и их связи с патологией; повторное открытие супрессорных Т-клеток (теперь в качестве регуляторных Т-лимфоцитов) и др.

Наиболее крупным теоретическим обобщением, повлекшим большое число экспериментальных исследований и практически значимых разработок, послужило учение Ч. Джанеуея (*Ch. Janeway*) и его последователей о природе распознавания во врожденном иммунитете и иерархических взаимодействиях врожденного и адаптивного иммунитета. При этом, во-первых, был открыт новый тип иммунологического распознавания, заставивший отказаться от представлений о неспецифичности врожденного иммунитета, во-вторых, было обосновано представление о невозможности запуска адаптивного иммунитета без предварительной активации врожденного иммунитета. Исследования, проводимые в области иммунологии в XXI веке, в большей или меньшей степени ориентированы на эту концепцию.

В настоящее время часто высказывают опасение, что иммунология как самостоятельная научная дисциплина исчезает, растворяясь в молекулярной биологии (аналогичное «растворение» в микробиологии констатировалось в предвоенный период). Едва ли это возможно, поскольку у иммунологии есть собственный объект исследований — специфические взаимодействия между антигенами и их рецепторами, лежащие в основе дискриминации «свое—чужое», — имеющих разнообразные проявления и со временем приобретающий все новые аспекты.

## 1.2. ЕСТЕСТВЕННАЯ ИСТОРИЯ ИММУНИТЕТА

Филогенез иммунитета неотделим от истории возникновения и развития многоклеточных организмов. Возникновение *Metazoa* (многоклеточные) означает формирование автономных организмов, имеющих внутреннюю среду, заполненную принадлежащими данному организму клетками и ограниченную барьером, отделяющим ее от окружения. Окружение *a priori* враждебно организму, поскольку служит источником агрессии, конкуренции и т.д. Агрессия может состоять в проникновении других организмов (прежде всего одноклеточных) во внутреннюю среду многоклеточного организма с последующей конкуренцией за территорию и ресурсы, а также возможным активным повреждением клеток или их отравлением токсинами и метаболитами. Таким образом, сам факт возникновения обособленного сообщества клеток, имеющего хотя бы элементарные интегрирующие системы и воспроизводящегося как единое целое, послужило достаточным основанием для возникновения «службы» поддержания клеточного и молекулярного постоянства внутренней среды. Такая «служба» и стала прообразом иммунной системы.

Из сказанного выше следует, что первое условие формирования иммунитета — наличие «охраняемой» замкнутой территории с ее обязательным отграничением от внешней среды. Второе условие — появление факторов, специализированных для обеспечения постоянства охраняемой внутренней среды путем ее освобождения от поступивших извне агентов (т.е. для обеспечения иммунитета в его прямом первоначальном смысле — освобождение). Со времен И.И. Мечникова общепризнано, что таким фактором

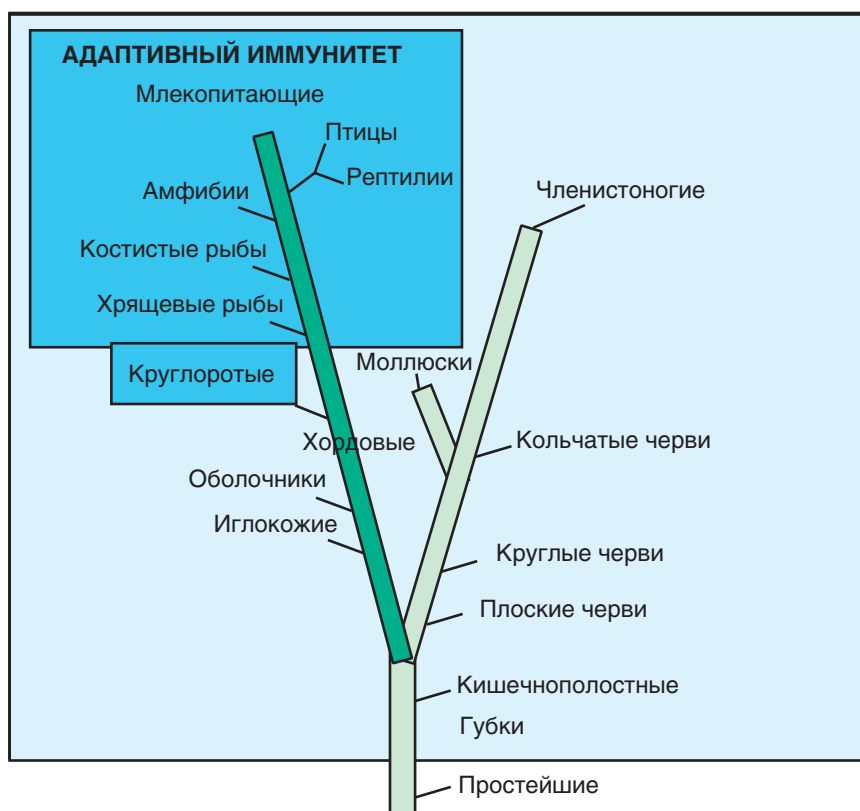
стали специализированные клетки мезенхимального происхождения — подвижные амебоциты, предки фагоцитов млекопитающих. Они обладают выраженной способностью к фагоцитозу — механизму, обеспечивающему элиминацию потенциально агрессивных клеток, проникших во внутреннюю среду организма.

Важное условие эффективной работы этого гомеостатического механизма — способность защитных клеток отличать потенциально агрессивные чужие клетки от собственных. Принцип, на который опирается такое распознавание, стал основой иммунитета во всех его проявлениях. Таким образом, иммунная система, не имея возможности «дождаться» проявления агрессивности проникших извне клеток, рассматривает в качестве потенциально опасных любые чужеродные клетки и молекулы. По-видимому, такое «решение» эволюции наиболее универсально и оправдано: действительно чужеродные объекты практически всегда вредны, даже если они не проявляют активной агрессии.

Возникновение рецепторов, позволяющих «опознать» чужое, стало третьим основополагающим событием на пути формирования иммунитета (после возникновения внутренней среды многоклеточных и специализированных клеток-фагоцитов). Действительно, наличие патогенраспознающих рецепторов, как их теперь называют, — чрезвычайно древнее «изобретение» эволюции, общее для животных и растений. Отметим сразу, что иммунитет растений и животных эволюционировал в последующем разными путями, однако общий принцип распознавания чужеродных объектов сохранился.

В процессе эволюции вида закреплялись гены, кодирующие молекулы, предназначенные для распознавания не просто «чужого», но заведомо опасного для данного организма. Эти рецепторы — мембранные или растворимые молекулы, обладающие пространственным сродством (и потому способные их распознавать) к наиболее общим и связанным с патогенностью молекулярным маркерам чужеродных агентов: компонентам клеточной стенки бактерий, эндотоксинам, нуклеиновым кислотам и т.д. Каждый рецептор распознает не индивидуальную молекулу, а целую группу подобных молекул, служащих **образами (паттернами) патогенности**. Молекулы-рецепторы представлены не только на поверхности клеток-эффекторов иммунитета, но и в гранулах, в которые попадают чужеродные агенты при фагоцитозе. Патогенраспознающие молекулы присутствуют также в жидких средах организма и способны инактивировать токсины и убивать чужеродные клетки. Относительно небольшое число генов, кодирующих такие рецепторы, обеспечивает распознавание практически всех патогенов, не составляя чрезмерной «обузы» для многоклеточного организма.

В результате распознавания образов патогенности происходит активация клеток — иммунцитов, что позволяет им убивать и затем элиминировать патогены. Это происходит с помощью цитолиза — внутриклеточного (наиболее совершенного, связанного с фагоцитозом), внеклеточного (вызываемого секретируемыми факторами) и контактного. Патогены могут быть убиты или подготовлены к фагоцитозу растворимыми бактерицидными факторами и рецепторными молекулами. Во всех случаях окончательное расщепление убитых патогенов происходит в процессе фагоцитоза.



**Рис. 1.1.** Филогенез врожденного и адаптивного иммунитета. На упрощенном филогенетическом древе (обозначены только те таксоны, у которых исследовали иммунитет) отмечены зоны действия врожденного и адаптивного иммунитета. Круглоротые выделены в особую группу как животные, у которых адаптивный иммунитет развивался не по «классическому» пути

Так, схематично можно представить систему иммунитета, которую принято называть врожденной. Эта форма иммунитета характерна для всех многоклеточных животных (в несколько иной форме — и для растений). Ее возраст — 1,5 млрд лет. Система врожденного иммунитета весьма эффективно защищала первичноротых многоклеточных животных, а также низших вторичноротых, часто имевших крупные размеры (рис. 1.1). Проявления врожденного иммунитета на разных стадиях эволюции и в разных таксонах чрезвычайно разнообразны. Однако общие принципы его функционирования одинаковы на всех стадиях развития многоклеточных. Главные составляющие врожденного иммунитета:

- **распознавание** чужеродных агентов во внутренней среде организма с помощью рецепторов, специализированных на узнавании «образов» патогенности;
- **элиминация** опознанных чужеродных агентов из организма путем фагоцитоза и расщепления.

У хордовых произошло скачкообразное формирование другой разновидности иммунитета: примерно 500 млн лет назад возник адаптивный (т.е. приспособительный) или приобретенный иммунитет. Ветвь адаптивного иммунитета, получившая интенсивное развитие, зародилась у хрящевых рыб. Особый вариант адаптивного иммунитета, основанный на использовании других распознающих и эффекторных молекул, обнаружен у более примитивных хордовых — круглоротых. Адаптивный иммунитет тесно связан с врожденным и во многом основывается на его проявлениях. Однако эти типы иммунитета сильно различаются (табл. 1.2).

**Таблица 1.2.** Основные свойства врожденного и адаптивного иммунитета

Характеристика	Врожденный иммунитет	Адаптивный иммунитет
Условия формирования	Формируется в онтогенезе вне зависимости от «запроса»	Формируется в ответ на «запрос» (поступление чужеродных агентов)
Объект распознавания	Группы чужеродных молекул, связанных с патогенностью	Индивидуальные молекулы (антигены)
Эффекторные клетки	Миелоидные, частично лимфоидные клетки	Лимфоидные клетки
Тип реагирования популяции клеток	Популяция клеток реагирует как целое (не клонально)	Реакция на антиген клональная
Распознаваемые молекулы	Образы патогенности; стрессорные молекулы	Антигены
Распознающие рецепторы	Патогенраспознающие рецепторы	Антигенраспознающие рецепторы
Угроза аутоагрессии	Минимальная	Реальная
Наличие памяти	Отсутствует	Формируется иммунологическая память

Существенное отличие адаптивного иммунитета от врожденного — способ распознавания чужого (табл. 1.3). В адаптивном иммунитете оно осуществляется при помощи молекул особого типа (иммуноглобулинов или других белков суперсемейства иммуноглобулинов), при этом распознаются не паттерны, а индивидуальные молекулы или небольшие группы сходных молекул, называемые антигенами. Существует порядка  $10^6$  различных антигенов. Такое число рецепторов не только не может быть представлено на одной клетке, но и не может быть закодировано в геноме позвоночных, содержащем только десятки тысяч генов. Именно поэтому в процессе эволюции адаптивного иммунитета сформировался сложный механизм генерации разнообразия антигенспецифических рецепторов: при развитии специализированных клеток (лимфоцитов), происходит перестройка их генов, кодирующих антигенраспознающие рецепторы, что приводит к образованию в каждой клетке рецептора с уникальной специфичностью. При активации каждая клетка может дать начало клону, все клетки которого будут иметь рецепторы той же специфичности. Таким образом, каждый конкретный антиген распознают не все лимфоциты, а только отдельные их клоны, имеющие специфические антигенраспознающие рецепторы.

Таблица 1.3. Основные типы иммунологического распознавания

Характеристика	Групповое (паттерновое)	Индивидуальное (антигенное)
Объект распознавания	Консервативные молекулярные структуры — образы патогенности	Антигенные эпитопы (в составе свободных молекул или встроенные в молекулы МНС)
Дискриминация «свое—чужое»	Совершенная, сложилась в филогенезе	Несовершенная, формируется в онтогенезе
Потребность в костимуляции	Нет	Есть
Время реализации эффекта	Немедленно	Требует времени (адаптивный иммунный ответ)
Связь с различными формами иммунитета	Связано с врожденным иммунитетом	Связано с адаптивным иммунитетом
Формирование генов рецепторов	Детерминированы генетически	Формируются в процессе дифференцировки клеток
Клетки, несущие рецепторы	Любые ядерные клетки (преимущественно миелоидные)	Только В- и Т-лимфоциты
Распределение на клетках	Все клетки в популяции экспрессируют одинаковые рецепторы	Клональное
Рецепторы	TLR, NLR, CLR, RIG, DAI, <i>Scavenger</i> -рецепторы, растворимые рецепторы	BCR (на В-клетках), TCR- $\gamma\delta$ , (на $\gamma\delta$ T-клетках), TCR- $\alpha\beta$ (на $\alpha\beta$ T-клетках)

Если паттернраспознающие рецепторы врожденного иммунитета образовались в процессе эволюции как молекулы, распознающие чужеродные, но не собственные молекулы организма, то специфичность антигенраспознающих рецепторов системы адаптивного иммунитета формируется случайно. Это потребовало развития дополнительных механизмов селекции для устранения «ненужных» и «опасных» (направленных против «своего») клонов лимфоцитов. Такие механизмы достаточно эффективны, однако все же не полностью устраняют риск развития аутоиммунных процессов — иммунных реакций, направленных против собственных антигенов, вызывающих повреждение организма хозяина.

Оба типа иммунитета образуют целостную систему, при этом врожденный иммунитет служит фундаментом для развития адаптивного. Так, лимфоциты распознают антиген в процессе презентации, осуществляемой преимущественно клетками врожденного иммунитета. Удаление из организма антигена и несущих его клеток происходит с помощью реакций, в основе которых лежат механизмы врожденного иммунитета, получившие специфический компонент, т.е. направленные на конкретный антиген и действующие с повышенной эффективностью.

Клональный характер адаптивного иммунного ответа создал возможность возникновения иммунологической памяти. При врожденном иммунитете память не развивается и каждый раз реакции на внедрение чужерод-

ных молекул развиваются как впервые. В процессе адаптивного иммунитета формируются клоны клеток, сохраняющих «опыт» предыдущего иммунного ответа, что позволяет им реагировать на повторную встречу с антигеном значительно быстрее, чем при первичном контакте, и формировать при этом более сильный ответ. Наличие клеток памяти делает организм устойчивым к довольно широкому кругу патогенов. Вероятно, именно возможность формирования иммунологической памяти послужила преимуществом, позволившим закрепиться в процессе эволюции такому «дорогостоящему» для организма, громоздкому, во многом ненадежному и даже опасному механизму, как адаптивный иммунный ответ.

Таким образом, адаптивный иммунитет базируется на трех главных процессах:

- распознавании антигенов (как правило, чужеродных для организма) независимо от их связи с патогенностью, с помощью клонально распределенных рецепторов;
- элиминации распознанных чужеродных агентов;
- формировании иммунологической памяти о контакте с антигеном, позволяющей быстрее и эффективнее удалять его при повторном распознавании.

Адаптивный иммунитет имеет еще одно преимущество, отсутствующее у врожденного иммунитета — способность защищать организм от агрессии изнутри (т.е. от злокачественных новообразований). Риск развития злокачественных опухолей вследствие мутаций или вирусной трансформации клеток существенно возрос при увеличении в эволюции размеров организма, произошедшем примерно тогда же, когда возник адаптивный иммунитет. Помимо этого нельзя исключить, что адаптивный иммунитет возник как частное проявление изменений более высокого порядка, с которыми связаны существенные эволюционные преимущества, раскрыть которые предстоит в будущем.

### 1.3. КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ИММУНОЛОГИИ

Все вопросы, затронутые в этой главе, будут детально рассмотрены в других разделах книги. Задача этой главы — описание структуры и функций иммунной системы в общем виде, без подробностей. Это позволит сформировать общее представление о системе иммунитета, в частности, представить план ее строения и определить основные решаемые ею задачи. При этом будут введены основные понятия иммунологии, знакомство с которыми облегчит восприятие последующего, значительно более сложного материала.

**Иммунитет** — это способность многоклеточных организмов поддерживать постоянство своего макромолекулярного состава путем удаления чужеродных молекул, что обеспечивает устойчивость к инфекционным агентам и резистентность к опухолям. При этом под «чужеродными макромолекулами» понимают прежде всего продукты чужеродной генетической информации (по Р.В. Петрову), отличимые от продуктов собственных генов организма-хозяина. Развитие иммунных реакций против собственных макромолекул возможно, но только при патологии.

### 1.3.1. Молекулы-мишени иммунитета (образы патогенности, антигены) и распознающие их рецепторы

В недавнем прошлом существовало единственное понятие для обозначения чужеродных агентов, против которых может быть направлен иммунитет — антигены. В настоящее время ситуация коренным образом изменилась и возникла необходимость в выделении нескольких групп таких агентов.

- **Образы патогенности**, или патогенассоциированные молекулярные паттерны (*Pathogen-associated molecular patterns* — **PAMP**) — группы молекул, как правило, отсутствующие в организме-хозяине, но характерные для патогенов (вирусов, бактерий, грибов, простейших, паразитов). При этом PAMP однозначно связаны с патогенностью и поэтому могут рассматриваться как знаки опасности, наиболее универсальный сигнал о проникновении в организм **не просто чужеродного, но биологически агрессивного** агента. Рецепторы для PAMP (**паттернраспознающие рецепторы**) позволяют распознавать все возможные типы патогенов и представлены у всех многоклеточных, включая не только животных, но и растения. Узнавание PAMP — основа распознавания во врожденном иммунитете; в определенной степени PAMP способны узнавать и клетки адаптивного иммунитета.
- **Антигены** — высокомолекулярные соединения, способные специфически стимулировать иммунокомпетентные лимфоидные клетки и обеспечивать тем самым развитие иммунного ответа. Распознавание антигенов происходит индивидуально (а не по группам, как в случае PAMP). Антигены распознаются **антигенспецифическими рецепторами**, представленными на клетках одного типа — лимфоцитах. Распознавание антигенов — позднее эволюционное приобретение, связанное с возникновением адаптивного иммунитета.
- **Стрессорные молекулы** — собственные молекулы организма, экспрессируемые на мембране при клеточном стрессе и сигнализирующие преимущественно об опасности эндогенного происхождения. Они распознаются рецепторами некоторых разновидностей лимфоцитов (например, естественными киллерами). По своей активности эти молекулы и их рецепторы занимают промежуточное положение между врожденным и адаптивным иммунитетом. Родственную группу молекул образуют **образы опасности** (*danger-associated molecular patterns*, **DAMP**) — эндогенные молекулы, сигнализирующие о любом повреждающем воздействии (температурном, лучевом, инфекционном и т.д.); эти процессы не полностью контролируются иммунной системой. Некоторые образы опасности (белки теплового шока) распознаются паттернраспознающими рецепторами и их можно рассматривать как эндогенные эквиваленты PAMP.

Чужеродность — не обязательное, но очень важное свойство факторов, против которых направлены реакции иммунитета. Именно поэтому должна существовать четкая граница, отделяющая внутреннюю среду организма от внешней — барьерные ткани (кожа и слизистые оболочки). Однако иногда возникает необходимость расширить или сузить границы чужеродности. Так, отнюдь не на все компоненты содержимого кишечника и других трактов развивается иммунный ответ (например, компоненты пищи, микроорганизмы-симбионты не рассматриваются иммунной системой как чужеродные), а некоторые участки внутренней среды организма, в силу особого рода

изоляции, оказываются в значительной степени исключенными из зоны контроля со стороны адаптивного иммунитета (например, ЦНС, полость глаза) и при нарушении изоляции, становятся объектом иммунной атаки.

Молекулы трех названных выше групп распознаются тремя типами рецепторов клеток иммунной системы.

- **Рецепторы, распознающие патогены** (*Pathogen-recognizing receptors*, PRR), предназначены для распознавания РАР. К этой группе относят мембранные и внутриклеточные **толл-подобные рецепторы** (Toll-like receptors — TLR), т.е. рецепторы, подобные первоначально обнаруженным у *Drosophila melanogaster* toll-рецепторам; внутриклеточные NOD-рецепторы (от *Nucleotide oligomerizing domains*) и ряд других мембранных, внутриклеточных и растворимых рецепторов. Наибольшее количество и наиболее широкий спектр патогенраспознающих рецепторов экспрессируют миелоидные клетки врожденного иммунитета. Однако в той или иной степени эти рецепторы присутствуют и на (или в) других клетках, включая лимфоидные. Патогенраспознающие рецепторы обладают сродством к РАР и некоторым эндогенным образам опасности. Через эти рецепторы в клетку поступают сигналы, включающие «гены воспаления», что обуславливает последующее развитие воспалительного процесса и других реакций врожденного иммунитета.
- **Антигенраспознающие рецепторы** представлены только на В- и Т-лимфоцитах. Важная особенность этих рецепторов — гигантская вариабельность их антигенраспознающих доменов (миллионы вариантов в пределах одного организма). Все варианты антигенраспознающих рецепторов не могут быть одновременно представлены на одной клетке. Они распределяются между клетками клонально, т.е. рецепторы, отличающиеся по специфичности, представлены на разных клонах лимфоцитов. Выделяют 3 разновидности антигенраспознающих рецепторов. На В-клетках представлены **В-клеточные рецепторы** (BCR — *B-cell receptors*), имеющие иммуноглобулиновую природу. При дифференцировке В-лимфоцитов в плазматические клетки в ходе иммунного ответа эти рецепторы секретируются в растворимой форме, называемой **антителами**. BCR распознают свободный и связанный с мембраной антиген, точнее, фрагмент молекулы антигена, называемый **эпитопом**. **Т-клеточные рецепторы** (TCR — *T-cell receptor*) существуют в двух вариантах. По названию входящих в их состав полипептидных цепей, эти рецепторы обозначают как  $\alpha\beta$ TCR и  $\gamma\delta$ TCR. Они представлены на мембране двух различных типов Т-клеток и не секретируются.  $\alpha\beta$ TCR распознает не нативный антиген, а его фрагмент (эпитоп), презентируемый в составе специализированных **молекул главного комплекса гистосовместимости** — МНС (*Major histocompatibility complex*), которые экспрессируются на поверхности клеток. Существует 2 класса молекул МНС — I и II. МНС-I присутствуют на всех клетках и связывают эндогенные пептиды, транспортируемые в эндоплазматический ретикулум — место синтеза МНС — из цитозоля. МНС-II экспрессированы только на специализированных — антигенпрезентирующих клетках (АПК) (см. далее) и связывают пептиды экзогенного происхождения, попадающие в клетку в результате эндоцитоза. Соответственно распознавание чужеродных пептидов в составе МНС-I сигнализирует о

цитозольной локализации патогена или его продуктов, а распознавание таких пептидов в составе МНС-II — о внеклеточной локализации патогена или присутствии его в эндосомах или фагосомах. В распознавании TCR-комплексов антигенного пептида с молекулами МНС принимают участие **корцепторы** — CD4 и CD8, обладающие сродством соответственно к молекулам МНС-II и МНС-I (но не к антигенному пептиду). Таким образом, антигенный пептид в составе молекул МНС-I распознают Т-клетки, несущие корцептор CD8, а в составе МНС-II — Т-клетки, несущие CD4. Распознавание липидных эпитопов происходит при участии «неклассических молекул МНС» — CD1. Эти комплексы распознаются  $\alpha\beta$ TCR ограниченной варибельности, экспрессируемые Т-клетками популяции **НКТ**. Условия распознавания антигена  $\gamma\delta$ TCR изучены слабо; известно, что для этого не требуется образования комплекса фрагментов антигена с молекулами МНС.

- **Рецепторы, распознающие стрессорные молекулы**, представлены преимущественно на естественных киллерах (NK-клетках), однако их выявляют также на  $\gamma\delta$ T-клетках, реже — на других субпопуляциях Т-лимфоцитов. Выделяют несколько групп этих рецепторов — NKG2D, NCR и др. NK-клетки экспрессируют также группу рецепторов, распознающих молекулы МНС, независимо от связанного с ними антигенного пептида (NKG2, некоторые рецепторы группы KIR и др.). Однако, в отличие от рассмотренных выше, рецепторы, распознающие стрессорные молекулы, нередко генерируют не активирующий, а ингибирующий сигнал.

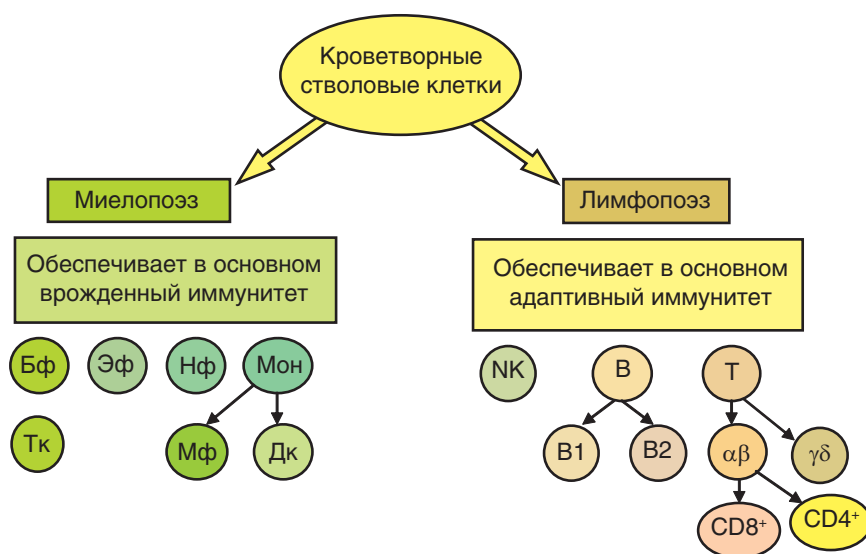
### 1.3.2. Иммунная система

Иммунные процессы осуществляются клетками костномозгового происхождения, относящимися к двум кроветворным линиям — **миелоидной** и **лимфоидной**. Миелоидные клетки «отвечают» за реакции врожденного, лимфоидные — преимущественно за реакции адаптивного и только частично — врожденного иммунитета (рис. 1.2).

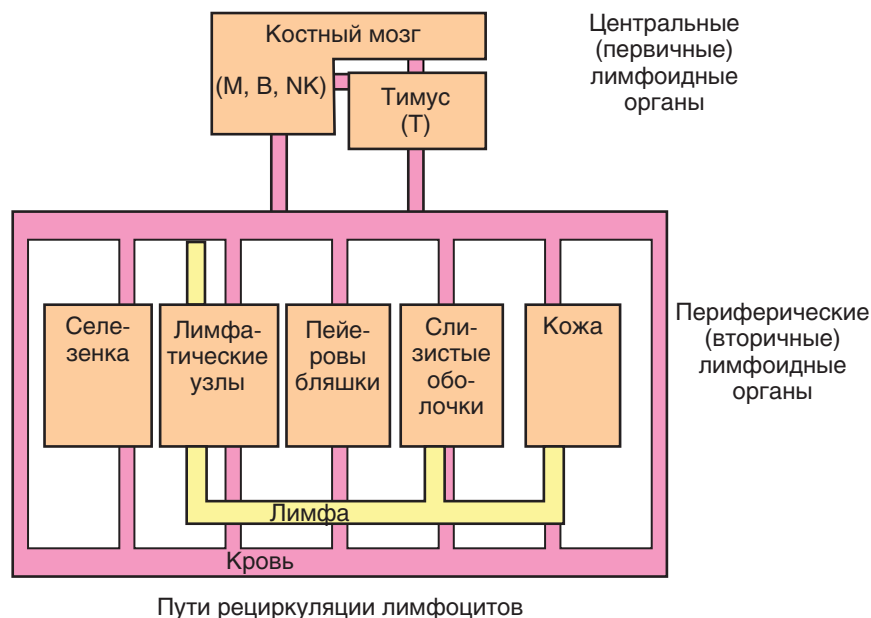
Врожденный иммунитет реализуется клетками (преимущественно фагоцитами), практически не нуждающимися в межклеточных контактах и коммуникациях. В связи с этим отсутствует необходимость их локализации в специализированных органах иммунной системы: амебоциты беспозвоночных и миелоидные клетки позвоночных широко распределены по организму; особенно богаты ими барьерные ткани. До формирования адаптивного иммунитета (например, у беспозвоночных) специальные органы иммунной системы отсутствовали.

Адаптивный иммунный ответ основан на постоянных межклеточных контактах и кооперации между клетками. Кроме того, в связи с клональной природой ответа возникает необходимость в особых механизмах концентрации (рекрутирования) клеток конкретных клонов в определенном месте. Обеспечение диалога между клетками и их вовлечение в иммунный ответ возможно лишь в условиях органной структуры. Поскольку адаптивный иммунный ответ обеспечивается лимфоидными клетками, органы иммунной системы являются прежде всего **лимфоидными органами**.

Иммунная система состоит из центрального и периферического отделов (рис. 1.3). Центральный отдел содержит органы (**первичные, или цент-**



**Рис. 1.2.** Основные ветви гемопоэза, обеспечивающие функционирование врожденного и адаптивного иммунитета: Бф — базофилы; Эф — эозинофилы; Нф — нейтрофилы; Мон — моноциты; Тк — тучные клетки; Мф — макрофаги; Дк — дендритные клетки; NK — NK-клетки (естественные киллеры); В (B1, B2) — В- (B1-, B2-) лимфоциты; Т — Т-лимфоциты;  $\alpha\beta$ ,  $\gamma\delta$  — Т-клетки, несущие антигенные рецепторы TCR, содержащие  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи или  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепи;  $CD4^+$  и  $CD8^+$  — Т-клетки, экспрессирующие указанные молекулы (коррецепторы)



**Рис. 1.3.** Схема организации лимфоидной ткани. В прямоугольниках указаны обозначения органов. Между ними — пути циркуляции клеток — кровь и лимфа

**ральные, лимфоидные органы**), в которых происходят дифференцировка и созревание лимфоцитов: **костный мозг** и **тимус (вилочковая железа)**. Костный мозг — основной орган лимфо- и гемопоэза. Кроме того, он служит местом сосредоточения эффекторных клеток адаптивного иммунитета (например, плазмочитов). Таким образом, только тимус является чисто центральным лимфоидным органом. Основная его функция — обеспечение развития Т-лимфоцитов (см. ниже). У птиц, некоторых рептилий, а также у жвачных млекопитающих имеется особый тип центральных лимфоидных органов или лимфоидных структур, в которых развиваются В-лимфоциты (у птиц и рептилий — сумка, или **бурса Фабриция**). Название центральных лимфоидных органов определило обозначение основных типов лимфоцитов: **Т (тимусзависимые)** и **В (бурсазависимые)**. Название третьего типа лимфоидных клеток — **НК-клеток** — происходит от выполняемой ими функции (**естественные киллеры** — *natural killers*).

Периферический отдел иммунной системы образован **вторичными** (периферическими) **лимфоидными органами**: неинкапсулированными лимфоидными структурами, связанными со слизистыми оболочками, диффузно распределенными лимфоидными и миелоидными клетками и инкапсулированными (т.е. истинными, морфологически изолированными) лимфоидными органами. Лимфоидные органы взаимосвязаны путями **рециркуляции** лимфоцитов (лимфатическая и кровеносная системы). Выделяют 3 разновидности инкапсулированных лимфоидных органов — **лимфатические узлы, селезенка и пейеровы бляшки**. Все лимфоидные органы организованы сходным образом. В качестве примера можно рассмотреть структуру лимфатических узлов (см. рис. 3.68). В них выделяют зоны сосредоточения Т-лимфоцитов (паракортикальные зоны), В-лимфоцитов (фолликулы), а также сегменты, в которых В- и Т-клетки соседствуют друг с другом. В селезенке аналогично структурирована белая пульпа. Собственно, именно белая пульпа представляет вторичный лимфоидный орган, тогда как красная пульпа имеет иную структуру и ее функции только частично относятся к иммунитету. Аналог лимфатических узлов — пейеровы бляшки кишечника, содержащие структуры, связанных с транспортом антигенов через эпителиальный барьер; их главным компонентом являются эпителиальные М-клетки. Лимфоидные образования слизистых оболочек (миндалины, одиночные фолликулы, аппендикс) соответствуют отдельным структурным элементам лимфоидных органов, чаще всего лимфоидным фолликулам. Комплекс этих образований вместе с диффузно распределенными лимфоцитами, пейеровыми бляшками и региональными лимфатическими узлами формирует **лимфоидную ткань, связанную со слизистыми оболочками** (*Mucosa-associated lymphoid tissue* — **MALT**). Стромальные клетки лимфоидных органов и MALT способны привлекать клетки соответствующих типов и поддерживать их жизнеспособность, т.е. формируют для них нишу.

Завершив развитие в костном мозгу, миелоидные клетки поступают в кровь и некоторое время (обычно короткое) циркулируют в кровотоке. Из кровотока они мигрируют в ткани, в которых живут от нескольких суток до месяцев или лет. Кроме такого конститутивного пути миграции, существует экстренная миграция клеток (в основном миелоидных) из кровотока в места контакта с патогеном и очаг воспаления. Миелоидные клетки, участвую-

щие в иммунных процессах, представлены **моноцитами, нейтрофильными, эозинофильными и базофильными гранулоцитами**. Некоторые разновидности миелоидных клеток практически не выявляются в кровотоке (хотя они тоже проходят стадию циркуляции), но присутствуют в тканях: тучные клетки и 2 типа тканевых клеток, образующихся из моноцитов, — **макрофаги и дендритные клетки**. Последние играют роль посредника между врожденным и адаптивным иммунитетом. Миелоидные клетки экспрессируют комплекс рецепторов, распознающих РАР.

Как уже было упомянуто, выделяют 3 основных типа лимфоцитов — Т-, В- и естественные киллеры. НК-клетки относят к клеткам врожденного иммунитета. Естественные киллеры распознают молекулы (стрессорные молекулы), отличные от распознаваемых миелоидными клетками (РАР). Как отмечалось, В- и Т-лимфоциты распознают антигены, однако это распознавание происходит по-разному. Иммуноглобулиновый рецептор В-клеток (BCR) дает им возможность распознавать нативный антиген как в свободной, так и в связанной с мембранами формах. Рецептор Т-клеток (TCR) распознает только фрагменты антигена, связанные с молекулами **МНС**. В процессе дифференцировки в Т- и В-лимфоцитах происходит перестройка генов, кодирующих рецепторы для антигенов. В результате каждая клетка экспрессирует рецептор, уникальный по специфичности. Рецепторы такой же специфичности имеют все потомки этой клетки (клон). В процессе селекции погибает большинство опасных аутоспецифических клонов как Т-, так и В-клеток. Популяции Т- и В-лимфоцитов участвуют в иммунных реакциях клонального типа, при которых в ответ вовлекаются только клетки клонов, экспрессирующих рецепторы нужной специфичности (в отличие от естественных киллеров, не отличающихся друг от друга по специфичности).

Популяции лимфоцитов гетерогенны не только по структуре антигенраспознающего рецептора. К естественным (т.е. формирующимся в процессе нормальной дифференцировки, не связанной с действием чужеродных антигенов) относят 3 субпопуляции В-клеток. **В1-клетки** локализованы в серозных полостях и барьерных тканях, несут рецептор с низкой специфичностью к антигену, спонтанно вырабатывают низкоаффинные антитела преимущественно IgM-изотипа, в том числе к аутоантигенам. **В-клетки маргинальной зоны** — клетки, сходные с В1, но локализующиеся в маргинальной зоне селезенки. **В2-клетки**, которые мы привыкли называть обычными В-клетками, локализованы в селезенке и лимфатических узлах (в том числе в фолликулах), костном мозгу, лимфоидных тканях кишечника; эти клетки отвечают за образование высокоспецифичных и высокоаффинных антител разных изотипов.

Число естественных субпопуляций Т-лимфоцитов значительно больше. Прежде всего это —  $\gamma\delta$ Т и  $\alpha\beta$ Т-клетки, отличающиеся типом TCR, а следовательно специфичностью распознавания и спектром функций. Среди  $\alpha\beta$ Т-клеток выделяют НКТ-лимфоциты, совмещающие большинство функций НК клеток и некоторые функции Т-лимфоцитов. От обычных  $\alpha\beta$ Т-клеток они отличаются ограниченностью репертуара специфичностей TCR и преимущественным участием в распознавании липидных (а не пептидных) эпитопов. Среди «классических»  $\alpha\beta$ Т-клеток выделя-

ют субпопуляции  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток, отличающиеся двумя основными особенностями — распознаванием антигенных пептидов в составе разных молекул МНС (соответственно классов II и I) и функцией: после стимуляции антигеном  **$CD4^+$  Т-клетки** выступают в качестве **хелперов**, а  **$CD8^+$  Т-клетки** — в качестве **цитотоксических Т-лимфоцитов**. Если  $CD8^+$  Т-клетки в процессе иммунного ответа функционируют как единая субпопуляция, то среди  $CD4^+$  клеток выделяют несколько «адаптивных» субпопуляций, о которых будет сказано ниже. Однако существует одна естественная субпопуляция  $CD4^+$  Т-клеток, существенно отличающаяся от остальных Т-хелперов — **естественные регуляторные Т-клетки**. Их функция состоит в контроле активности аутоспецифических клонов Т-лимфоцитов, не удаленных в процессе отрицательной селекции, мигрировавших в периферический отдел иммунной системы и создающих опасность аутоагрессии.

Лимфоциты, особенно Т-клетки, постоянно **рециркулируют** — выходят из лимфоидных органов в лимфу, мигрируют с ней в кровотоки и возвращаются через посткапиллярные вены обратно в орган. При этом благодаря экспрессии молекул адгезии и рецепторов для хемокинов (хемотаксических факторов, определяющих направление миграции клеток) рециркулирующие клетки при каждом «витке» рециркуляции с высокой избирательностью попадают в участки лимфоидных органов, специализированные для этого типа клеток. Некоторые миелоидные и лимфоидные клетки (в особенности ранее контактировавшие с антигеном) диффузно распределяются в барьерных и в меньшей степени — в других нелимфоидных тканях.

Клетки иммунной системы существенно различаются по сроку жизни. В соответствии с этим варьирует скорость их обновления. Численность клеток каждого типа строго контролируется **гомеостатическими механизмами**.

### 1.3.3. Первая линия иммунной защиты

Проникновение патогенов во внутреннюю среду организма приводит к мобилизации иммунной системы. Ключевое событие при этом — контакт патогена с клетками иммунной системы, присутствующими почти во всех тканях (прежде всего в барьерных). Эти клетки формируют первую линию защиты (рис. 1.4). Наиболее важную роль в запуске иммунных процессов играют макрофаги благодаря наличию на поверхности и в цитоплазматических гранулах рецепторов, распознающих РAMP. Распознав патоген, макрофаги активируются и начинают выделять активные белковые вещества — провоспалительные **цитокины**, способствующие дальнейшей активации клеток врожденного иммунитета. Таким образом, активация макрофагов, приводящая к секреции цитокинов, — это первая реакция системы врожденного иммунитета на проникновение во внутреннюю среду организма патогенов.

При этом цитокины выполняют 2 основные функции:

- 1) вовлечение в защитную реакцию других клеток (например, эпителиальных, эндотелиальных, дендритных) без обязательного их контакта с патогеном (хотя эти клетки также могут распознавать патоген и реагировать на него непосредственно);
- 2) «организация» **эмиграции лейкоцитов** из кровотока в очаг воспаления. Это событие особенно важно, поскольку, как правило, содержание

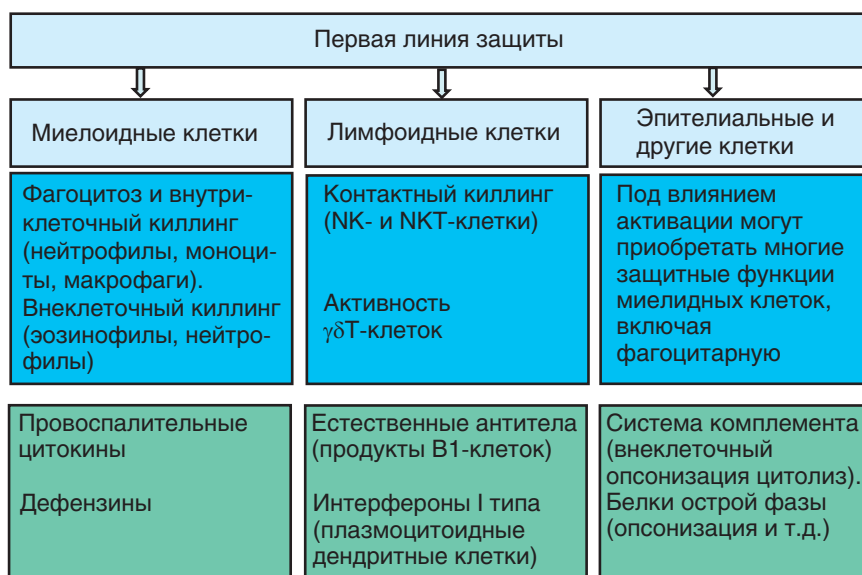


Рис. 1.4. Первая линия иммунной защиты. Клеточные и гуморальные факторы

макрофагов и других эффекторных клеток в месте проникновения патогена невелико и достаточно только для запуска реакции.

Приток лейкоцитов из крови способствует реализации полноценной местной защитной реакции с участием факторов врожденного иммунитета. Сначала в очаг воспаления поступают наиболее мобильные лейкоциты — нейтрофилы, обладающие высоким защитным потенциалом, реализуемым главным образом в виде **фагоцитоза**. Затем мигрируют моноциты, дифференцирующиеся в макрофаги, которые, помимо фагоцитоза, выполняют регуляторные функции, стимулируют пролиферацию клеток и вызывают другие проявления репаративных процессов. Одновременно вовлекаются вспомогательные гуморальные факторы: происходит активация системы комплемента, синтезируются белки острой фазы, выделяются бактерицидные вещества. При вирусной инфекции патоген распознают в основном плазматоцитоподобные дендритные клетки и естественные киллеры (при этом происходит их активация).

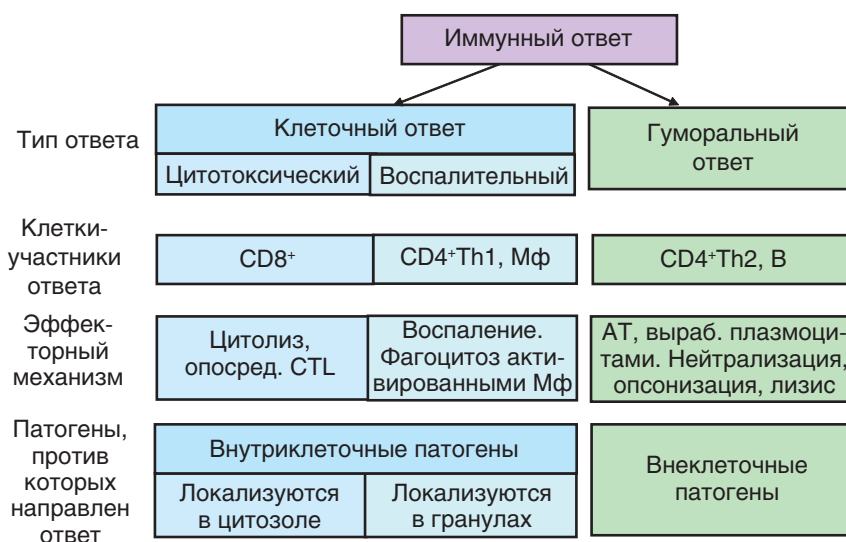
Помимо классических факторов врожденного иммунитета, в ответ на проникновение патогена активируются другие факторы первой линии защиты. К ним относят лимфоидные клетки — NKT,  $\gamma\delta$ T-клетки, B1-лимфоциты. B1-лимфоциты продуцируют полиспецифические антитела с низким сродством к антигену. Однако, взаимодействуя с патогеном, эти антитела активируют каскад комплемента. Посредством комплемента антитела могут вовлекать в иммунные реакции фагоциты. NKT-клетки — ранний источник интерферона  $\gamma$ , усиливающего активацию макрофагов.

#### 1.3.4. Адаптивный иммунный ответ

Первая линия защиты должна обеспечивать элиминацию патогена. Однако это происходит не всегда. В таких случаях запускается вторая

линия защиты, связанная с развитием адаптивного иммунного ответа, основные типы которого представлены на рис. 1.5, а стадии развития — на рис. 1.6. Развитие иммунного ответа включает индуктивную и продуктивную (эффекторную) фазы. Индуктивная фаза состоит в формировании исполнительных механизмов адаптивного иммунитета и реализуется в первые 7 сут после появления патогена в организме. В этот период основную роль в иммунной защите играет врожденный иммунитет. По мере развития эффекторных механизмов адаптивного иммунитета они берут на себя основную нагрузку в защите организма.

Одновременно с активацией факторов врожденного иммунитета происходит событие, иллюстрирующее связь между врожденным и адаптивным иммунитетом. **Дендритные клетки**, как и макрофаги, присутствующие в барьерных тканях, поглощают патогены или их фрагменты и транспортируют их в региональный лимфатический узел. В процессе перемещения в гранулах этих клеток происходит расщепление поглощенных антигенов на фрагменты, взаимодействующие с молекулами МНС-II, и транспорт образовавшихся комплексов на клеточную поверхность. Это необходимо для запуска адаптивного иммунитета, поскольку Т-лимфоциты способны распознавать антиген только в комплексе с молекулой МНС. Таким образом, дендритная клетка вовлекает в реакцию Т-лимфоциты, ответственные за запуск других клеток адаптивного иммунитета. В лимфатических узлах происходит взаимодействие дендритных клеток с Т-лимфоцитами, распознающими антигенные пептиды в составе молекул МНС на мембране дендритной клетки. Это взаимодействие облегчается локализацией дендритных клеток и Т-лимфоцитов в одной и той же зоне лимфатического узла (Т-зоне), обусловленной влиянием одних и тех же хемотаксических



**Рис. 1.5.** Типы иммунного ответа, развивающегося в ответ на действие патогенов с различной локализацией (участвующие клетки и механизмы)

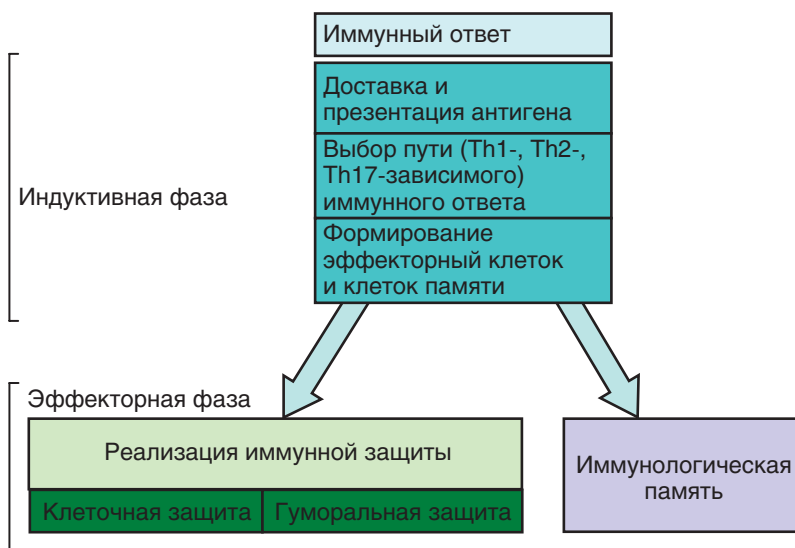


Рис. 1.6. Основные события иммунного ответа

сигналов. Дендритные клетки проникают в Т-зоны лимфогенным, а рециркулирующие Т-лимфоциты — гематогенным путем.

TCR распознает антигенный пептид в составе молекул МНС с участием корецепторов CD4 (Т-хелперы) и CD8 (цитотоксические Т-клетки или Т-киллеры). Этому способствует сродство корецепторов к молекулам МНС (CD4 — к МНС-II, CD8 — к МНС-I). Процесс представления антигенного пептида Т-клеткам в составе молекул МНС называют **презентацией антигена**. Таким образом, Т-хелперы распознают комплекс МНС-II-антигенный пептид. Это служит необходимым, но недостаточным условием для активации Т-клеток. Дополнительные активационные стимулы клетки получают через **костимулирующие молекулы**. В их роли на дендритных клетках выступают молекулы B7 (CD80 и CD86), а на Т-клетках — CD28. Сигнал, поступающий в Т-клетку через молекулу CD28, дополняет сигнал от TCR, что обеспечивает активацию клетки. Если CD28 исходно присутствует на большинстве Т-клеток, то молекула CD80 на дендритных клетках барьерных тканей почти отсутствует, а CD86 представлена на них в количествах, недостаточных для костимуляции. Усиление экспрессии молекул B7 на дендритных клетках (а также макрофагах и других клетках, способных презентировать антиген) происходит при распознавании PAMP и тесно связано с другими проявлениями врожденного иммунитета. Таким образом, для запуска адаптивного иммунитета необходима предварительная активация клеток врожденного иммунитета.

При активации Т-клетки начинают экспрессировать гены своего ростового фактора — IL-2 и его рецептора. В результате аутокринного действия IL-2 Т-клетки активированных клонов пролиферируют. Пролиферации, индуцированной антигеном, подвергаются также Т-киллеры и В-лимфоциты. Поскольку исходно число клеток каждого клона невелико, пролиферация имеет большое значение для обеспечения эффективной иммунной

защиты (7–8 делений обеспечивают увеличение числа клеток в 250–500 раз). На следующем этапе  $CD4^+$  Т-клетки дифференцируются на основные разновидности Т-хелперов, из которых упоминаются наиболее изученные — Th1- и Th2-клетки. Эти клетки различаются, главным образом, спектром продуцируемых цитокинов, отвечающих за развитие двух важных ветвей иммунного ответа — клеточного, направленного на элиминацию внутриклеточных патогенов, и гуморального, играющего основную роль в борьбе с внеклеточными патогенами и макропаразитами.

Окончательная дифференцировка Т-хелперов происходит в Т-зонах вторичных лимфоидных органов. Th1-клетки мигрируют из Т-зон в очаги воспаления, в том числе в места проникновения патогенов, вызывающих иммунный ответ. Распределение активированных и эффекторных Т-лимфоцитов отличается от такового наивных Т-клеток, что обусловлено изменением набора экспрессируемых молекул адгезии («рецепторов хоминга») и хемокиновых рецепторов. Эффекторные Т-лимфоциты мигрируют преимущественно в те отделы иммунной системы, из которых дендритные клетки доставили антиген в лимфатический узел. Th1-клетки реализуют свою активность, кооперируясь с макрофагами, а Th2-клетки — с В-лимфоцитами.

Запуск Th1-зависимого иммунного ответа происходит, если клетка фагоцитировала микроорганизм, но не смогла его убить и расщепить. В этом случае фагоцит (макрофаг) получает стимулирующие сигналы со стороны Т-хелперов типа Th1. Взаимодействие между клетками осуществляется в форме повторной презентации антигенного пептида Т-клетке — на этот раз макрофагом. В виде ответной реакции Th1-клетка активирует макрофаг, передавая костимулирующий сигнал через мембранную молекулу CD40 и секретируемый цитокин — интерферон (IFN)  $\gamma$ .

В-клетка распознает антиген в его нативном состоянии без участия дендритной клетки. Более того, она сама выступает в роли АПК: поглотив комплекс антигена с рецептором, В-лимфоцит обрабатывает его, встраивая антигенный пептид в состав молекулы МНС-II. В-клетка презентует пептид Th2-клетке, получая при этом от нее активационные сигналы через ту же костимулирующую молекулу CD40 (как и макрофаги) и цитокин IL-4 (фактор роста В-клеток). Это вызывает сначала пролиферацию клонов активированных В-лимфоцитов (в реакцию вовлекаются клоны, распознавшие антиген), а затем их дифференцировку в антителообразующие клетки — плазмочиты. Эти процессы проходят наиболее эффективно в зародышевых центрах, формирующихся при иммунном ответе в лимфоидных фолликулах (при этом происходит превращение первичных фолликулов во вторичные).

В зародышевых центрах В-клетки интенсивно пролиферируют, при этом происходит резкое (на 4–6 порядков) повышение частоты соматических мутаций в гипервариабельных зонах вариабельных генов иммуноглобулинов. В клетках ослабляется экспрессия факторов, предотвращающих развитие **апоптоза** (программированной гибели клеток), что приводит к быстрой гибели В-лимфоцитов при отсутствии дополнительных сигналов к выживанию. Таким сигналами служит распознавание рецепторами BCR антигенов в составе **иммунных комплексов**, которые локализуются на поверхности фолликулярных дендритных клеток. Ограниченное содержание антигена в зародышевых центрах вызывает конкуренцию за его

связывание между антигенспецифичными В-клетками, в которой побеждают В-клетки, несущие BCR, обладающие наибольшим сродством к антигену. Этот процесс называют **созреванием аффинитета** антигенраспознающих рецепторов (или антител, поскольку мембранные рецепторы на следующих этапах дифференцировки В-клеток будут секретироваться в виде растворимых иммуноглобулинов — антител). Параллельно происходит переключение изотипа секретируемых иммуноглобулинов с IgM на IgG, IgA и IgE. Процесс завершается в апикальной части зародышевых центров превращением активированных В-клеток (В-лимфобластов) в **плазматические клетки**, непосредственно секретирующие антитела. Одновременно с образованием плазматических клеток В-лимфоциты дифференцируются в **В-клетки памяти**. Плазматические клетки мигрируют в другие отделы иммунной системы (маргинальную зону селезенки, мозговые шнуры лимфатических узлов и т.д.). Большинство их попадает в костный мозг. Микроокружение этого органа обеспечивает длительное существование плазмочитов.

Особую роль играет третий вариант реакции адаптивного иммунитета — ответ цитотоксических Т-лимфоцитов. Презентацию антигенного пептида этим Т-клеткам тоже осуществляют дендритные клетки, но с участием молекул МНС-I. Цитотоксические клетки, предназначенные для защиты от вирусов и других внутриклеточных патогенов (присутствуют в цитозоле), в меньшей степени зависят от Т-хелперов. Контактные взаимодействия цитотоксических Т-клеток с Т-хелперами не играют такой важной роли, как для эффекторных клеток при развитии двух других рассмотренных выше форм ответа. Аксессуарная функция Th1-клеток в реакциях цитотоксичности состоит, главным образом, в снабжении Т-киллеров необходимым для экспансии их клонов ростовым цитокином IL-2. Цитотоксические Т-лимфоциты развиваются в Т-зонах лимфоидных органов, а затем расселяются по организму, в основном мигрируя в очаги воспаления и барьерные ткани.

В результате описанных выше процессов происходит активация клеток сначала врожденного, а затем адаптивного иммунитета, причем связующим звеном между ними служат дендритные клетки. При этом происходит активация всех клеток врожденного иммунитета в очаге проникновения патогена и развития воспаления, тогда как в системе адаптивного иммунитета в активацию вовлекаются только специфичные к распознаваемым антигенам клоны лимфоцитов. При этом существует определенная избирательность в вовлечении различных факторов врожденного и адаптивного иммунитета в зависимости от природы возбудителя (бактерии или вирусы, внеклеточные или внутриклеточные патогены и т.д.).

Таким образом, запуск адаптивного иммунного ответа невозможен без участия факторов врожденного иммунитета, прежде всего активированных дендритных клеток, презентующих антиген Т-клеткам и экспрессирующих костимулирующие молекулы. Антиген только отбирает клоны лимфоцитов, которые будут активированы. Для активации клеток, распознавших антиген, они должны получить дополнительные сигналы через костимулирующие молекулы. При этом активационную «эстафету» от дендритных клеток принимают  $CD4^+$  Т-хелперы, которые расширяют спектр вовлекаемых в иммунный ответ клеток, оказывая костимулирующее действие на В-лимфоциты, макрофаги и снабжая ростовым фактором цитотоксические

Т-лимфоциты. Подобная схема развития иммунного ответа соответствует ситуации, когда антиген действует совместно с РАР, что имеет место при инфицировании — попадании в организм потенциально патогенных микроорганизмов.

Однако часто антиген действует на лимфоциты, в том числе Т-клетки, изолированно от РАР. Это бывает при приеме пищи, росте иммунной опухоли, при пересадке чужеродных органов, действии аллергенов. В отношении пищевых антигенов развивается анаergia, т.е. активная форма «неотвечаемости», распространяющаяся только на данный антиген. Вероятно, развитие анаергии происходит и при росте опухоли, однако при этом действует другой сигнал опасности — экспрессия стрессорных молекул, активирующих НК-клетки. Природа дополнительного сигнала, участвующего в развитии аллергического ответа в отсутствие РАР, не ясна. Вероятно, именно особенности этого сигнала определяют выбор Th2-типа иммунного ответа на аллергены. Как отмечалось выше, в норме иммунная система не реагирует на собственные антигены организма (аутоантигены). Однако при локальном воспалении, сопровождающемся экспрессией костимулирующих молекул на соматических клетках (не дендритных), а также в некоторых других ситуациях может развиваться аутоиммунная патология.

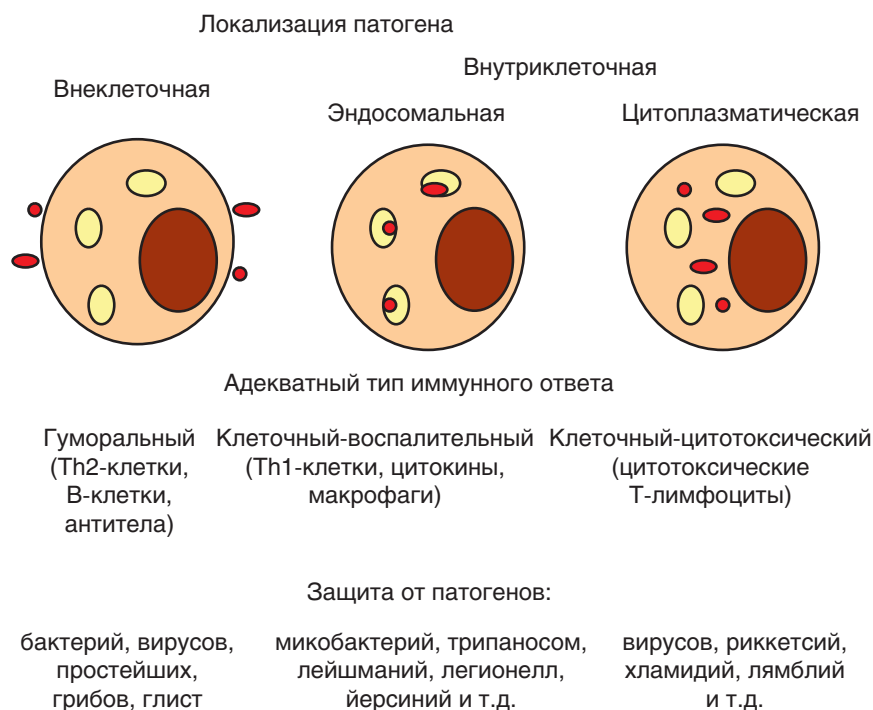
### 1.3.5. Эффекторный механизм иммунного ответа.

#### **Взаимосвязь факторов врожденного и адаптивного иммунитета**

Особенности развития иммунного ответа определяются природой и локализацией патогенов. Существует 3 главные стратегии адаптивного иммунитета в отношении внутриклеточных и внеклеточных патогенов (рис. 1.7). Наиболее разнообразные эффекторный механизмы задействованы в защите от внеклеточных патогенов, при которой преобладает гуморальный иммунный ответ. Основные эффекторные молекулы при этом — антитела, секретируемые плазматическими клетками, дифференцирующимися из В-лимфоцитов при участии Th2-клеток.

Антитела способны связываться с антигенами, представленными как на клеточной мембране, так и в свободной растворимой форме. Прямое защитное действие антител в отношении свободных антигенов проявляется в нейтрализации их биологической активности (наиболее характерный пример — нейтрализация токсинов). В отношении антигенов, связанных с мембраной патогена, нейтрализующее действие антител проявляется в изменении биологической активности микроорганизма, например, в подавлении его подвижности или способности к адгезии на клетках хозяина, в предотвращении инфицирования вирусом клетки и т.д.

Более универсальны защитные механизмы, реализуемые антителами с участием других факторов или клеток. Главный из них — **опсонизация** — покрытие клеток молекулами иммуноглобулинов, облегчающими их распознавание и поглощение фагоцитами, которые имеют на мембране рецепторы для «хвостовой» части антител (Fc-рецепторы). Опсонизация значительно ускоряет фагоцитоз патогенов. Другой механизм защитного действия антител состоит в активации комплемента по классическому пути. Комплекс «антиген–антитело» связывает сывороточный фактор C1q, что вызывает каскадную активацию других компонентов комплемента. Этот процесс имеет



**Рис. 1.7.** Стратегия иммунной защиты зависит от локализации патогена

2 основных эффекта. Первый и главный из них — опсонизация клеток, но не антителами, а продуктами расщепления C3-компонента — C3b. Фагоциты имеют рецепторы к фрагментам C3 компонента и легко распознают опсонизированный патоген. Второй результат, опосредующий защитный эффект комплемента, — цитоллиз клетки за счет формирования мембраноатакующего комплекса. Кроме того, имеющие Fc-рецепторы естественные киллеры распознают опсонизированную антителами клетку и вызывают ее лизис по контактному механизму. Наконец, антитела облегчают распознавание патогенов макрофагами, имеющими высокоаффинные Fc-рецепторы, что резко усиливает защитные свойства этих клеток.

Защита от другой разновидности внеклеточных патогенов — макропаразитов (гельминтов) также осуществляется по Th2-зависимому механизму. Однако в этом случае наибольшую роль играют эозинофилы, привлекаемые цитокинами, которые секретируют Th2-лимфоциты и тучные клетки. Эозинофилы располагаются по поверхности паразита и выделяют содержащиеся в их эозинофильных гранулах высокоактивные белки, убивающие паразитов.

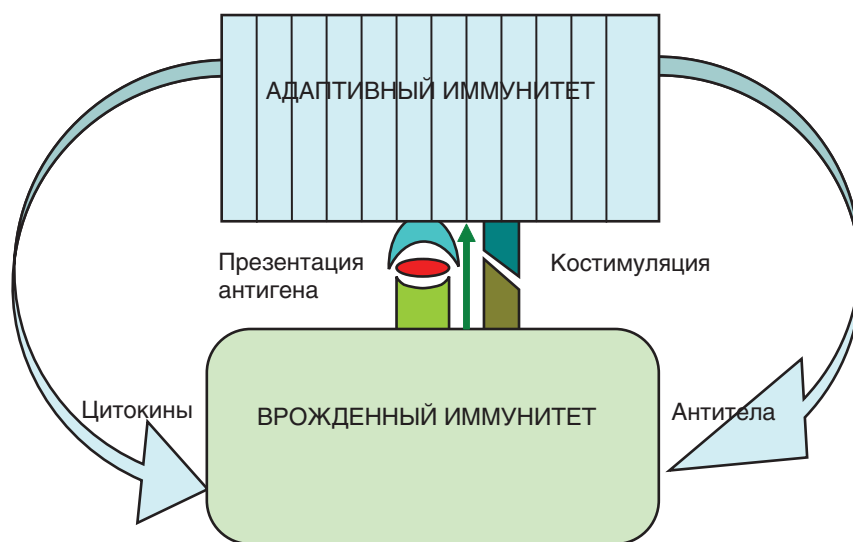
Антитела не способны проникнуть внутрь клеток и фактически бессильны против патогенов, имеющих внутриклеточную локализацию. Для защиты от внутриклеточных патогенов иммунная система имеет 2 стратегии. Как уже упоминалось, Th1-клетки активируют макрофаги. При взаимодействии этих клеток Th1-лимфоцит получает дополнительный стимул через TCR, а макрофаг — через действие  $IFN\gamma$  и коstimулирующую молекулу CD40. Этот

«диалог» приводит к дополнительной активации макрофагов, в частности, к повышению бактерицидной активности этих клеток и формированию нового фактора — оксида азота и его производных (благодаря экспрессии макрофагами индуцибельной NO-синтазы). Это стимулирует разрушение внутриклеточных патогенов, резистентных к действию факторов врожденного иммунитета до подключения Т-хелперов.

Таким образом, в данном случае истинными эффекторами становятся клетки врожденного иммунитета — макрофаги, завершающие элиминацию патогенов, поглощенных ими путем фагоцитоза. Только стимулирующие сигналы, поставляемые Th1-клетками, позволяют реализовать этот способ защиты от внутриклеточных (поглощенных, но не разрушенных) патогенов. В процессе иммунного ответа возникает еще одна разновидность индуцируемых Т-хелперов — Th17 (названы по доминирующему продукту — IL-17). Они привлекают нейтрофилы и реализуют свои эффекты, активируя эти клетки. В то же время их действие часто переходит в область патологии, выражающийся в развитии аутоиммунных процессов.

Другая стратегия борьбы с внутриклеточными патогенами направлена на элиминацию локализующихся в цитозоле патогенов (микоплазмы, лямблии и т.д.) или вирусов, геном которых интегрируется в геном клетки. Если в основе предыдущего механизма лежит усиление активности эффекторных клеток врожденного иммунитета, позволяющее им «излечиться» от патогена, то в данном случае иммунная система выбирает более радикальный путь — убивает инфицированную клетку вместе с патогеном (убитая клетка затем фагоцитируется). Функцию киллеров выполняют цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, отличающиеся от естественных киллеров не столько механизмом цитолиза, сколько специфичностью: прежде чем убить клетку, цитотоксический Т-лимфоцит должен распознать антигенный пептид патогена, выносимый на поверхность клетки-мишени в составе молекул МНС-I. Такой же механизм иммунная система использует при борьбе с опухолевыми клетками и при отторжении чужеродного трансплантата. Он же может участвовать в развитии аутоиммунной патологии (сахарный диабет I типа и др.).

Сопоставляя эффекторные механизмы врожденного (реализуемые на первой линии защиты) и адаптивного иммунитета (формируются в ходе иммунного ответа), следует отметить их сходство; при адаптивном ответе они незначительно модифицируются. Действительно, и во врожденном, и в адаптивном иммунитете используется киллинг патогенов или инфицированных клеток, регулируемый цитокинами или антителами. Таким образом, под влиянием факторов адаптивного иммунитета фагоцитоз интенсифицируется и становится более целенаправленным. Т-киллеры действуют подобно натуральным киллерам, но спектр их мишеней ограничен специфичностью их рецепторов, т.е. Т-киллеры действуют более избирательно. Внеклеточный цитолиз, осуществляемый эозинофилами, при адаптивном ответе проявляется локально благодаря выработке цитокинов, привлекающих эозинофилы к гельминтам. Наконец, реакции комплемента, активируемого через альтернативный и классический пути, приводят к одинаковым результатам, но включаются по антигенспецифическому механизму только во втором случае. Иными словами, адаптивный иммунитет использует

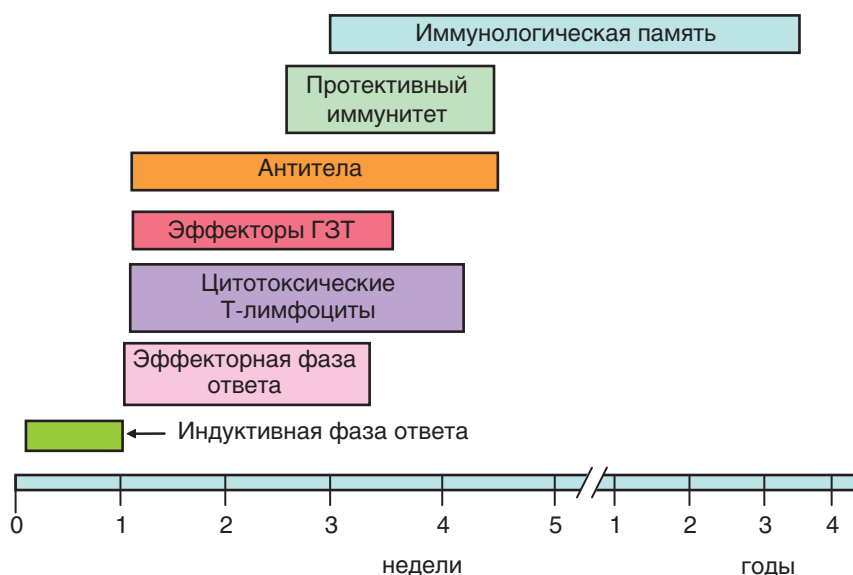


**Рис. 1.8.** Взаимосвязь врожденного и адаптивного иммунитета. Врожденный иммунитет обеспечивает презентацию антигена и костимуляцию, необходимые для запуска адаптивного иммунитета. В свою очередь, адаптивный иммунитет благодаря выработке антител и цитокинов придает реакциям врожденного иммунитета избирательность действия и повышает их эффективность

эффекторные механизмы врожденного иммунитета, придавая им специфичность и усиливая их путем контактных межклеточных взаимодействий и стимулирующего действия цитокинов (рис. 1.8).

### 1.3.6. Иммунологическая память

В процессе иммунного ответа происходит элиминация патогена. Устойчивость к нему, называемая протективным иммунитетом, поддерживается упомянутыми эффекторными факторами (антитела, цитотоксические Т-лимфоциты, другие активированные клетки адаптивного и врожденного иммунитета) (рис. 1.9). Однако срок жизни этих клеток и гуморальных факторов ограничен. После их разрушения организм сохраняет иммунитет к патогену, но он имеет другую основу. Выше отмечалось, что при иммунном ответе одновременно с эффекторными клетками образуются клетки памяти, не вовлекаемые в текущий иммунный ответ, но формирующие пул защитных клеток при повторной встрече с тем же антигеном. Клетки памяти морфологически не отличаются от наивных клеток, но несут ряд характерных мембранных молекул, определяющих пути рециркуляции, отличные от таковых для наивных лимфоцитов. Численность клеток в каждом клоне клеток памяти на 2–3 порядка выше, чем в клонах наивных лимфоцитов. В-клетки памяти уже прошли этап переключения изотипа секретируемых антител и V-гены их иммуноглобулинов содержат соматические мутации, произошедшие в зародышевых центрах.  $CD4^+$  Т-клетки памяти уже дифференцированы на субпопуляции. Все это ускоряет развитие иммунного ответа при повторной встрече с антигеном — вторичного иммунного ответа.



**Рис. 1.9.** Временная динамика проявлений адаптивной иммунной защиты при инфекции. По оси абсцисс отмечены сроки после введения патогена

Однако природа этой повышенной эффективности клеток памяти пока не вполне ясна.

Как известно, основное и наиболее эффективное направление практической иммунологии, с развитием которого связано зарождение этой науки, — вакцинация, т.е. индукция эффективной иммунологической памяти без проявления заболевания. В последние годы сходные принципы стали использовать в лечебных целях: проводят большую работу по созданию онковакцин, аллерговакцин, а также вакцин для лечения аутоиммунных заболеваний. Во всех этих случаях поставленной цели пытаются достигнуть не столько путем формирования клеток памяти (хотя и это имеет место, по крайней мере, при создании онковакцин), сколько путем переориентации иммунного ответа, вызываемого вакцинами, в желаемом направлении. Например, при аллергии пытаются индуцировать Th1-опосредованный иммунный ответ на аллерген вместо уже сформировавшегося Th2-ответа, обуславливающего проявления аллергии. При аутоиммунных процессах пытаются индуцировать анергию к аутоантигенам; при опухолях — наоборот, усиливают иммунный ответ на опухолевые антигены и направляют его по Th1-пути.

**РЕЗЮМЕ**

Система иммунитета имеет две основные ветви, что отражает ее эволюционную историю. Она включает древний компонент — врожденный иммунитет, и более позднее филогенетическое приобретение — адаптивный иммунитет. Функционирование врожденного иммунитета основано на распознавании образов патогенности — чужеродных молекул, экспрессируемых возбудителями инфекций, — и уничтожении их носителей с помощью комплекса реакций, из которых наиболее важен фагоцитоз. В рамках врожденного иммунитета сформировался дополнительный механизм ответа на эндогенные сигналы опасности, служащий основой защиты от трансформированных (опухолевых) клеток. Адаптивный иммунитет основан на индивидуальном распознавании антигенов — макромолекул, обычно чужеродных, но не обязательно связанных с патогенами. Это придает адаптивным иммунным процессам высокую избирательность, но создает риск развития аутоиммунного повреждения. Для запуска адаптивного иммунитета необходима активация врожденного иммунитета. Адаптивный иммунитет практически не располагает собственными эффекторными механизмами, но, используя эффекторные механизмы врожденного иммунитета, придает им большую избирательность и повышает их эффективность. Главное преимущество адаптивного иммунитета перед врожденным — формирование иммунологической памяти, резко повышающей эффективность иммунной защиты при повторной встрече с антигеном и фактически предотвращающей при этом развитие заболевания.

## Глава 2

### Врожденный иммунитет

Из предыдущей главы следует, что врожденные защитные реакции у беспозвоночных — единственное проявление иммунитета, а у позвоночных представляют основу, на которой строится вся иммунная защита и из которой «вырастает» адаптивный иммунитет, в свою очередь влияющий на проявления врожденного иммунитета.

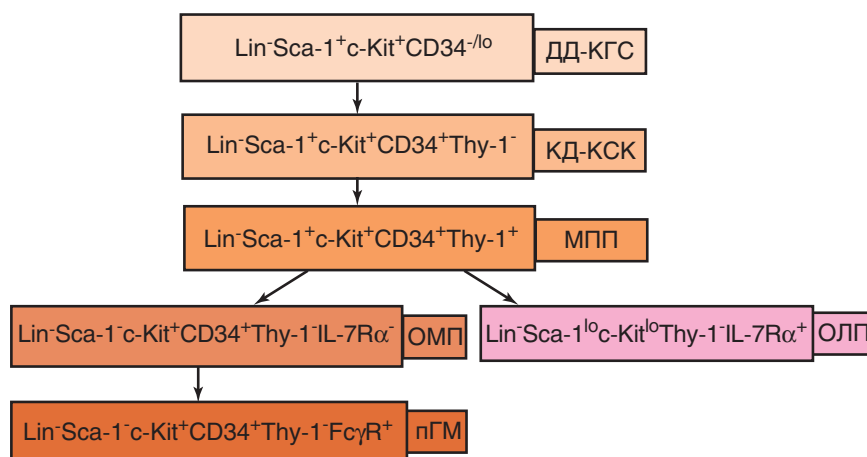
#### 2.1. МИЕЛОИДНЫЕ КЛЕТКИ КАК ОСНОВА ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

Реализация врожденного иммунитета обусловлена деятельностью многих типов клеток. Основную роль при этом играют **клетки миелоидного происхождения**, играющие роль классических эффекторов врожденного иммунитета. К миелоидным клеткам относят, в первую очередь, большинство **лейкоцитов крови** (все лейкоциты, кроме лимфоцитов). Все они развиваются в органах кроветворения (у взрослых млекопитающих, включая человека, — в костном мозгу), все проходят стадию циркуляции в составе лейкоцитов крови. Одни клетки (дендритные, тучные) циркулируют настолько кратковременно и в столь малом количестве, что при обычном определении лейкоцитарной формулы их выявить не удастся. Другие клетки (нейтрофилы, моноциты) представляют основной компонент пула лейкоцитов крови. Все разновидности миелоидных клеток спонтанно мигрируют из крови в ткани, где быстро погибают (нейтрофилы) или длительно функционируют, проникая в качестве **резидентных клеток** практически во все органы и ткани, изменяя при этом под влиянием микроокружения свои морфофункциональные особенности (так, к тканевым формам моноцитов относят макрофаги и миелоидные дендритные клетки). Кроме того, кровотоком служит депо, из которого клетки мигрируют в очаги развивающегося воспаления (например, при проникновении патогенов и т.д.), где преимущественно и реализуется их защитная функция. Таким образом, участие миелоидных клеток в обеспечении врожденного иммунитета складывается из экстренной реакции клеток, мобилизуемых из кровотока в условиях воспаления, и постоянной «фоновой» деятельности резидентных клеток. Дендритным клеткам принадлежит другая важная особенность — они обеспечивают запуск адаптивного иммунитета.

##### 2.1.1. Кроветворные стволовые клетки и миелопоэз

Как уже отмечено, у взрослых млекопитающих, включая человека, миелопоэз происходит в костном мозгу. Все клетки крови происходят от гемопоэтических стволовых клеток. Стволовые кроветворные клетки проходят 3 стадии развития, различающиеся по способности восстанавливать кроветворение при переносе их облученным животным:

- стволовые клетки длительного действия;
- стволовые клетки короткого действия;
- мультипотентные родоначальные клетки (рис. 2.1).



**Рис. 2.1.** Длительность пребывания основных миелоидных клеток в костном мозгу, крови и тканях

Для всех стадий характерен мембранный фенотип  $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+$  [Lin — линейные маркеры; Sca-1 — антиген стволовых клеток (*Stem cell antigen*); c-Kit — лиганд фактора стволовых клеток SCF (*Stem cell factor*)]. Стволовые клетки на 2-й и 3-й стадии развития несут на поверхности молекулу CD34. Этот маркер чаще всего используют в качестве идентификационного для выявления стволовых клеток и их ближайших потомков. Для гемопоэтических стволовых клеток человека характерно отсутствие линейных маркеров, наличие молекулы CD34 и отсутствие молекулы CD38. Последняя появляется на стадии коммитированных предковых клеток — общих лимфоидного (CLP) и миелоидного предшественников. В костном мозгу человека содержится 0,5–5%  $\text{CD34}^+$  клеток, только 1–10% из них лишены CD38, т.е. могут рассматриваться как кандидаты в стволовые клетки. Истинных стволовых клеток, т.е. клеток, способных длительно поддерживать гемопоэз *in vitro* или при пересадке в организм, значительно меньше — 1 на  $10^4$   $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{Thy-1}^-$  клеток.

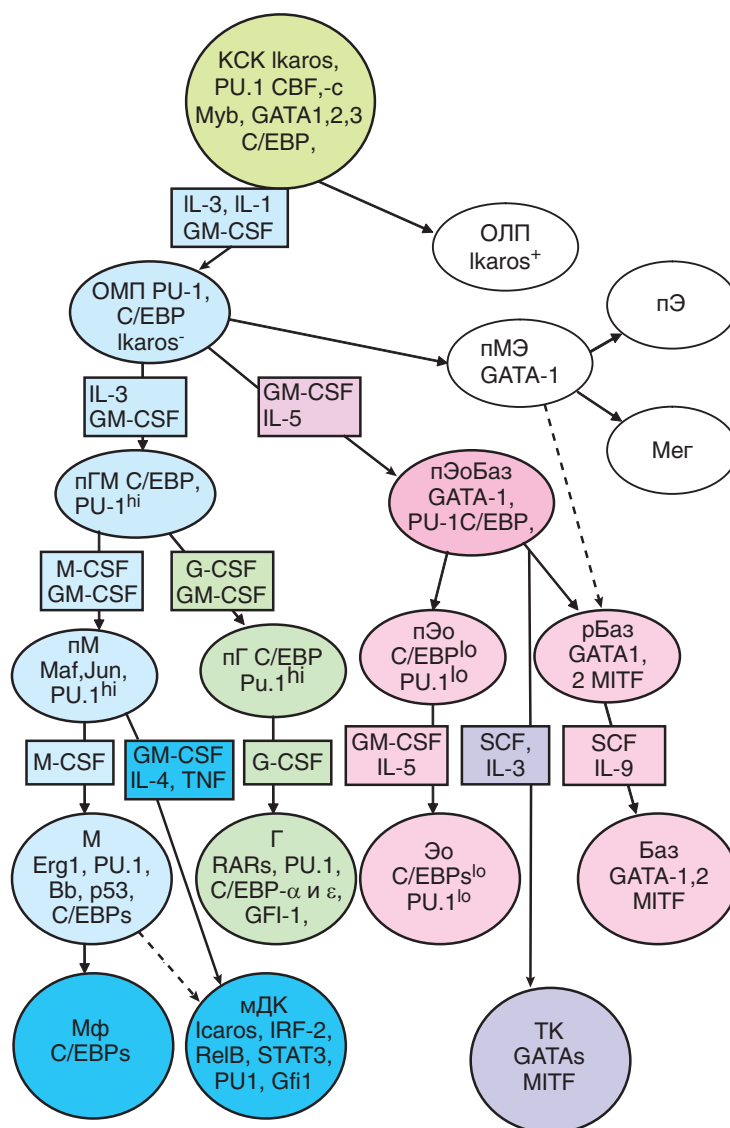
Стволовые клетки делятся медленно (около 5% находятся в S и G2 фазах клеточного цикла; каждая клетка делится 1 раз в 30–60 сут). Жизнеспособность стволовых клеток обеспечивается стромальными клетками костного мозга, формирующими их нишу. Большинство стволовых кроветворных клеток расположено в эндостальной части костного мозга, а также в синусоидах (соответственно — эндостальная и сосудистая ниши). Таких клеток мало в центральной части костного мозга. Основную роль в поддержании жизнеспособности и обеспечении функционирования стволовых клеток играют их контакты со специализированными остеобластами ниш. В зонах контакта происходит взаимодействие многих пар молекул, включая молекулы адгезии (интегрины и их рецепторы), мембранные цитокины (SCF и его лиганд, c-Kit), хемотаксические молекулы (хемокины и их рецепторы) и т.д. Роль растворимых факторов (цитокинов) в регуляции жизнеспособности и активности стволовых клеток невелика. Стволовые клетки входят в клеточный цикл и дифференцируются только при ослаблении связи с нишей и утрате контактов с остеобластами. Важная особен-

ность стволовых клеток — сбалансированность процессов пролиферации и дифференцировки: на уровне популяции одна из дочерних клеток продолжает делиться, тогда как другая подвергается дифференцировке, то есть созревает. В результате пролиферирующие клетки образуют как бы ствол, от которого постоянно отделяются клетки, уходящие в дифференцировку.

Дифференцируясь, стволовые кроветворные клетки дают начало двум основным ветвям клеток крови — миелоидной и лимфоидной. Несколько схематизируя, можно сказать, что эти ветви обеспечивают развитие клеток соответственно врожденного и адаптивного иммунитета. В этой главе рассмотрим только миелоидный путь развития клеток крови, проиллюстрированный на рис. 2.2. Исходные клетки этого пути развития — общие миелоидные предшественники. Они образуются как в эндостальной, так и в сосудистой нишах и отличаются от стволовых клеток отсутствием мембранной молекулы Sca-1, а от CLP — рецептора для IL-7.

Из общего миелоидного предшественника происходят все клетки крови, кроме лимфоцитов. Рассмотрим только развитие клеток врожденного иммунитета по 3 линиям дифференцировки. Наиболее важная из них — гранулоцитарно-макрофагальная, или GM-линия. Она дает начало двум дочерним линиям — моноцитарной (М-линия) и гранулоцитарной (G-линия). Вопрос о развитии эозинофилов и базофилов до конца не решен. Есть данные о наличии у них общего предшественника, дифференцирующегося впоследствии на эозинофильную и базофильную линии. С помощью традиционного морфологического подхода выделяют несколько стадий развития миелоидных клеток: миелобласты, промиелоциты, миелоциты, метамиелоциты, палочкоядерные и сегментоядерные (зрелые) формы. Клетки на 2 последних стадиях в норме присутствуют в кровотоке. Накапливается все больше свидетельств, что традиционное представление гемопоэза в виде «дерева» не точно, поскольку описаны многочисленные отклонения от сложившейся схемы. Так, известны клетки-предшественники, общие для моноцитов и В-лимфоцитов или моноцитов и Т-лимфоцитов. Гемопоэзу свойственна значительная степень пластичности.

Для дифференцировки миелоидных (как и любых других) клеток необходима экспрессия определенного набора факторов транскрипции. Эти ядерные белки обладают сродством к конкретным последовательностям ДНК в промоторных участках генов и, соединяясь с ними, обеспечивают экспрессию этих генов. Обычно с промотором соединяется целый комплекс транскрипционных факторов, среди которых есть постоянно присутствующие (конститутивные) и индуцируемые факторы; некоторые из них характерны для различных стадий развития клеток. Так, при миелопоэзе для большинства линий и стадий развития клеток выявлены относительно специфичные для них транскрипционные факторы (см. рис. 2.2). Например, экспрессия транскрипционного фактора *Ikaros* характерна для лимфоидной, но не миелоидной ветви гемопоэза. При миелопоэзе высокий уровень экспрессии фактора PU.1 необходим для развития клеток GM-линии, низкий уровень выявляют в клетках эозинофильного ряда, а в базофилах этот фактор отсутствует. Моноцитарный и гранулоцитарный ряды различаются скорее комбинацией транскрипционных факторов, чем наличием одного специфичного; нейтрофилы отличаются от моноцитов экспрессией разных



**Рис. 2.2.** Кроветворные стволовые клетки мышей и ранние этапы их дифференцировки. В прямоугольниках отмечены цитокины, ответственные за развитие клеток, в овалах — обозначения клеток и специфичных для них транскрипционных факторов. Обозначения клеток см. в тексте

изоформ фактора C/EBP. Спектры дифференцировочных факторов базофилов и других миелоидных клеток крови не перекрываются.

Незрелые кроветворные клетки легко подвергаются апоптозу. Для сохранения жизнеспособности им необходимо присутствие в микроокружении цитокинов. Основным цитокином, общим практически для всех миелоидных клеток, начиная от общего миелоидного предшественника, считают гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

(GM-CSF). На ранних этапах миелопоэза сходную роль выполняет IL-3, называемый также полипоэтином. При созревании и специализации клеток для сохранения жизнеспособности им необходимы линейно-специфические цитокины: для моноцитарного ряда — моноцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), а для нейтрофильного — гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF). Подобную роль при развитии эозинофилов играет IL-5. Во всех этих случаях наряду с названными цитокинами роль фактора выживания и колониестимулирующего фактора выполняют GM-CSF и, в меньшей степени, IL-3. Базофилам для развития нужен комплекс факторов, в котором главную роль играет CSF.

Между появлением гранулоцитарно-макрофагального предшественника и его дифференцировкой на моноцитарно-макрофагальный и гранулоцитарный предшественники проходит около 5 сут — это один из самых длительных этапов миелопоэза. Следующий этап — созревание — значительно отличается по продолжительности для моноцитов и гранулоцитов: если для созревания моноцита необходимо 2–3 сут, то для созревания нейтрофильного гранулоцита — 10–12 сут. После созревания моноциты находятся в костном мозгу еще сутки и затем покидают его, поступая в кровоток. При этом клетки сохраняют способность к делению и дальнейшей дифференцировке. Нейтрофилы остаются в костном мозгу в течение 1–2 сут и выходят в кровь не просто зрелой, а старой клеткой с ограниченными способностями, неспособной к делению, индуцированной экспрессии генов и синтезу белка. Наиболее короткий промежуток времени требуется для развития в костном мозгу эозинофилов (2–4 сут). Аналогичные данные для базофилов отсутствуют. Продолжительность пребывания различных миелоидных клеток в костном мозгу, кровотоке и тканях сопоставлена на рис. 2.3.

Выход лейкоцитов из костного мозга в кровоток происходит вследствие ослабления взаимодействия хемокинов, выделяемых стромальными клетками костного мозга с рецепторами лейкоцитов. Наиболее важный хемокин, удерживающий созревающие клетки в костном мозгу, — CXCL12 (SDF-1 — *Stroma derived factor 1*, фактор стромальных клеток 1), распознаваемый рецептором CXCR4 (о хемокинах и их рецепторах см. раздел 2.3.2). Под влиянием колониестимулирующих факторов (гемопоэтинов) происходит ослабление выработки хемокинов и экспрессии их рецепторов, что позволяет созревшим клеткам покинуть костный мозг. Сегментоядерные (нейтрофильные и эозинофильные) лейкоциты пребывают в кровотоке менее 12 ч; моноциты

Клетки	Развитие в КМ	Циркуляция в крови	Пребывание в тканях
Моноциты-Мф	8–9 сут	1–2 сут	20–25 сут – месяцы/годы
Нейтрофилы	18–20 сут	7–10 ч	3–5 сут
Эозинофилы	8–10 сут	5–10 ч	10–12 сут

**Рис. 2.3.** Схема миелопоэза с указанием цитокинов, ответственных за выживание и развитие клеток и дифференцировочных факторов

циркулируют в течение нескольких дней. Затем клетки мигрируют из крови в ткани. Этот процесс регулируется хемокиновыми сигналами и происходит с участием молекул адгезии (селектинов, интегринов) и их рецепторов. В норме экстравазация лейкоцитов осуществляется по тем же законам, что и при воспалении, но менее интенсивно в связи с меньшей проницаемостью сосудистой стенки и более слабой хемокиновой стимуляцией.

Длительность пребывания миелоидных клеток в тканях также существенно варьирует: для нейтрофилов и эозинофилов она значительно меньше, чем для моноцитов. Так, в тканях нейтрофилы живут всего 3–5 сут, эозинофилы — 10–12 сут, тогда как моноциты (точнее, макрофаги, в которые они превращаются в тканевом микроокружении) могут находиться в тканях до нескольких лет (для разных субпопуляций макрофагов этот показатель существенно различается). Нейтрофилы, эозинофилы и базофилы мобилизуются из крови в ткани в особых экстренных случаях (острое воспаление, аллергические процессы). Моноциты/макрофаги, наоборот, играют преимущественно роль клеток, длительное время живущих и функционирующих в различных тканях. В связи с этим нужно отметить значительно более высокую производительность гранулоцитопоеза по сравнению с моноцитопоезом. За сутки в организме человека образуется и поступает в кровоток около  $10^{11}$  нейтрофилов, что по массе составляет около 100 г, т.е. примерно 0,1% от массы тела; такое же количество гранулоцитов ежедневно погибает. Производительность моноцитопоеза в 20 раз ниже: за сутки образуется и поступает в кровоток до  $5 \times 10^9$  моноцитов. Это обусловлено значительно большей продолжительностью жизни моноцитов/макрофагов.

Существует еще по крайней мере 2 разновидности миелоидных клеток, происходящих из костного мозга, но использующих кровяное русло только в качестве кратковременного транзитного участка по пути в ткани — дендритные и тучные клетки. Развитие этих клеток будет рассмотрено отдельно при описании их функций (см. разделы 2.1.4 и 2.1.6).

### 2.1.2. Нейтрофилы

Нейтрофильные сегментоядерные лейкоциты (нейтрофильные гранулоциты, или нейтрофилы) — преобладающая популяция белых клеток крови. Развитие нейтрофилов контролируется цитокинами, из которых главную роль играет G-CSF, а вспомогательную — GM-CSF, IL-3 и IL-6. Повышение содержания нейтрофилов в условиях воспаления регулируется цитокинами IL-17 и IL-23. IL-23 индуцирует образование IL-17, а он стимулирует выработку G-CSF.

В крови человека содержится  $2,0\text{--}7,5 \times 10^9/\text{л}$  нейтрофилов, что составляет 50–70% от общего числа лейкоцитов крови; также в крови присутствует некоторое количество ( $0,04\text{--}0,3 \times 10^9/\text{л}$ , т.е. 1–6%) палочкоядерных форм нейтрофилов, не завершивших созревание. Ядро таких клеток не сегментировано, хотя и имеет уплотненную структуру хроматина. В кровотоке присутствует только 1–2% общего числа зрелых нейтрофилов в организме (остальные представлены в тканях, преимущественно в костном мозгу). Срок их пребывания в циркуляции составляет 7–10 ч.

После кратковременной циркуляции нейтрофилы покидают кровоток и мигрируют в ткани. Примерно 30% нейтрофилов, выходящих из кровотока,

мигрируют в печень и костный мозг; около 20% — в легкие (точнее в их микроциркуляторное русло); около 15% — в селезенку. Основными хемотаксическими факторами для нейтрофилов служат лейкотриен В<sub>4</sub> и IL-8, в небольших количествах вырабатываемые в тканях. Миграция происходит с участием молекул адгезии ( $\beta_2$ -интегрины, Р- и Е-селектины), а также фермента эластазы, секретируемого самими нейтрофилами. Через 3–5 сут пребывания в тканях нейтрофилы подвергаются спонтанному апоптозу, т.е. запрограммированной гибели (см. раздел 3.4.1.5), и их фагоцитируют резидентные макрофаги, что предотвращает нанесение ущерба окружающим клеткам. В настоящее время допускается возможность превращения небольшой фракции тканевых нейтрофилов в долгоживущую форму и даже их дифференцировки в макрофаги. В целом функция тканевых нейтрофилов остается невыясненной.

Диаметр нейтрофилов составляет 9–12 мкм. Им свойственна уникальная морфология: ядро сегментированное (обычно состоит из 3 сегментов) с плотно упакованным хроматином (гетерохроматином); цитоплазма содержит нейтральные (по данным окрашивания) гранулы, что и определяет название этих клеток. Особенности хроматиновой структуры ядра (недоступность промоторных участков для дифференцировочных факторов) значительно ограничивает экспрессию генов и синтез макромолекул нейтрофилами *de novo*. Тем не менее, вопреки ранее существовавшему представлению, нейтрофилы сохраняют способность к биосинтезу, хотя и в ограниченном масштабе.

Поскольку нейтрофилы имеют характерную морфологию, потребность в определении их мембранного фенотипа возникает только при специальном цитометрическом анализе (табл. 2.1). Для нейтрофилов характерна экспрессия на поверхности клетки ряда молекул: CD13 (аминопептидаза N, рецептор для ряда вирусов), CD14 — рецептора для липополисахарида (ЛПС) (представлен в меньших количествах, чем на моноцитах),  $\beta_2$ -интегринов (LFA-1, Mac-1 и p155/95); Fc-рецепторов [Fc $\gamma$ RII (CD32) и Fc $\gamma$ RIII (CD16)], рецепторов для компонентов комплемента (CR1, CR3 и CR4), рецепторов для хемотаксических факторов (C3aR, C5aR, рецептор для лейкотриена В<sub>4</sub>). Под влиянием ряда цитокинов (прежде всего GM-CSF) нейтрофилы экспрессируют молекулы МНС класса II (МНС-II); молекулы МНС-I экспрессируются на них конститутивно. Наиболее важные молекулы, определяющие развитие, миграцию и активацию нейтрофилов, — рецепторы для G-CSF (основного фактора, регулирующего их развитие), а также для IL-17 и IL-23, основного хемотаксического фактора — IL-8 (CXCR1, CXCR2) и хемокина, определяющего связь нейтрофилов с тканями — SDF-1 (CXCR4).

**Таблица 2.1.** Мембранные молекулы нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов

Группа молекул	Нейтрофилы	Эозинофилы	Моноциты
Толл-подобные рецепторы	TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8, TLR-9, TLR-10	TLR-1, TLR-4, TLR-7, TLR-10	TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8, TLR-9, TLR-10

Окончание табл. 2.1

Группа молекул	Нейтрофилы	Эозинофилы	Моноциты
Лектиновые рецепторы	Дектин-1		DC-SIGN, дектин-1
Fc-рецепторы	FcγRII, FcγRIII, FcαR; при активации — FcγRI	FcγRII, FcγRIII, FcεRI, FcεRII, FcαR; при активации — FcγRI	FcγRI, FcγRII, FcγRIII; при активации — FcαR
Рецепторы комплемента	CR1, CR3; C3aR, C5aR, C5L2	CR1; C3aR	CR1, CR3, CR4; C3aR, C5aR
Цитокиновые рецепторы	Для G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-17	Для GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13	Для M-CSF, GM-CSF, IFNγ, IFNα/β, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-15, IL-21, TNFα и т.д.
Хемокиновые рецепторы	CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CX <sub>3</sub> CR1
Интегрины	β <sub>2</sub> — LFA-α, Mac-1, α <sub>D</sub> β <sub>2</sub> ; рецептор — ICAM-2	β <sub>1</sub> — VLA-4; β <sub>2</sub> — α <sub>D</sub> β <sub>2</sub>	β <sub>1</sub> — VLA-1, VLA-2, VLA-4, VLA-5, VLA-6; β <sub>2</sub> — LFA-1, Mac-1, p150, p45, α <sub>D</sub> β <sub>2</sub> ; рецепторы — ICAM-2, ICAM-3
Молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС)	МНС-I; при активации — МНС-II	МНС-I; при активации — МНС-II	МНС-I, МНС-II (при активации усиливается)
Костимулирующие молекулы	—	При активации — CD154	CD86 (слабо); при активации — CD80, CD86
Другие молекулы	CD14, CD13	CD9	CD14, CD13

Наибольшее своеобразие свойственно гранулам нейтрофилов (табл. 2.2), представляющим разновидность лизосом. Различают 4 разновидности гранул этих клеток: азурофильные (первичные), специфические (вторичные), желатиновые (третичные) и секреторные везикулы. Специфические гранулы содержат ферменты, проявляющие свою активность при нейтральных и слабощелочных значениях pH: лактоферрин, щелочную фосфатазу, лизоцим, а также белок BPI, связывающий витамин B<sub>12</sub>. Маркерами этой разновидности гранул служат лактоферрин и мембранная молекула CD66. В специфических гранулах содержится большое количество фермента NADPH-оксидазы, катализирующего «кислородный взрыв» и образование активных форм кислорода — главных факторов бактерицидности фагоцитов. Азурофильные гранулы содержат широкий набор гидролаз и других ферментов, активных при кислых значениях pH: миелопероксидазу,

$\alpha$ -фукозидазу, 5'-нуклеотидазу,  $\beta$ -галактозидазу, арилсульфатазу,  $\alpha$ -маннозидазу, N-ацетилглюкозаминидазу,  $\beta$ -глюкуронидазу, кислую глицерофосфатазу, лизоцим (мурамилидазу), нейтральные протеазы (серпроцидины) — катепсин G, эластазу, коллагеназу, азурацидин, а также дефензины, кателицидины, лактоферрин, гранулофизин, кислые глюкозаминогликаны и другие вещества. Маркерами азурофильных гранул служат фермент миелопероксидаза и мембранная молекула CD63. Желатиновые (третичные) гранулы в соответствии с названием содержат желатиназу. Наконец, четвертый тип гранул — секреторные везикулы — содержат щелочную фосфатазу.

**Таблица 2.2.** Свойства гранул клеток врожденного иммунитета

Тип клеток	Разновидность гранул	Состав гранул	Функциональное назначение содержимого
Нейтрофилы	Специфические (вторичные)	NAGPH-оксидаза, лактоферрин, щелочная фосфатаза, лизоцим и т.д.	Быстрая фаза бактериолиза
	Азурофильные (первичные)	Миелопероксидаза, кислые гидролазы, лизоцим, дефензины, нейтральные протеазы (серпроцидины) и т.д.	Медленная фаза бактериолиза
	Желатиновые (третичные)	Желатиназа	Обеспечение миграции
	Секреторные везикулы	Щелочная фосфатаза	Взаимодействие с микроокружением
Эозинофилы	Специфические (крупные, вторичные)	Главный основной белок, катионный белок, пероксидаза, нейротоксин, коллагеназа, миелопероксидаза, цитокины: GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6	Внеклеточный цитолиз
	Мелкие	Арилсульфатаза B, кислая фосфатаза, пероксидаза	Бактерицидность
	Первичные	Лизофосфолипаза (в кристаллах Шарко—Лейдена)	Липидный метаболизм
	Липидные тельца	Арахидоновая кислота, липоксигеназа, циклоксигеназа	Выработка эйкозаноидов
Тучные клетки	Базофильные	Гистамин, протеазы, пептидогликаны, глюкозаминогликаны, протеин Шарко—Лейдена, пероксидаза	Преобразованные факторы немедленной аллергии

Окончание табл. 2.2

Тип клеток	Разновидность гранул	Состав гранул	Функциональное назначение содержимого
Базофилы	Базофильные	Гистамин, протеазы, пептидогликаны, гликозаминогликаны, кислые гидролазы, пероксидаза	Предобразованные факторы немедленной аллергии
НК-клетки	Цитотоксические	Перфорин, гранзим В, гранулизин	Осуществление цитолита

При стимуляции нейтрофилов в первую очередь происходит высвобождение содержимого секреторных пузырьков. Преодолевать базальные мембраны нейтрофилам позволяет секрет желатиназных гранул. Специфические, а затем азурофильные гранулы сливаются с фагосомами в процессе фагоцитоза (через 30 с и 1–3 мин после поглощения частицы соответственно). Комплекс бактерицидных факторов, присутствующих в гранулах, обеспечивает разрушение многих микроорганизмов (см. раздел 2.3.5). Наиболее эффективно содержимое гранул повреждает стрептококки, стафилококки и грибы (включая кандиды). Содержимое гранул, особенно азурофильных, может секретироваться в результате дегрануляции. После дегрануляции восстановления гранул не происходит.

Наряду с моноцитами/макрофагами нейтрофилы рассматривают как основные фагоцитирующие клетки (см. 2.3.4). При этом нейтрофилы мигрируют из крови в очаг воспаления значительно быстрее моноцитов (табл. 2.3). Скорость мобилизации нейтрофилов дополняется их способностью развивать метаболические процессы («кислородный взрыв») в течение секунд. Все это делает нейтрофилы оптимально приспособленными для осуществления ранних этапов иммунной защиты в рамках острой воспалительной реакции.

Таблица 2.3. Функциональные различия нейтрофилов и моноцитов/макрофагов

Свойство	Нейтрофилы	Моноциты/макрофаги
Сроки жизни	Короткий (3–5 сут)	Длительный (недели, месяцы)
Темп мобилизации и активации	Быстрый (минуты)	Более медленный (часы)
Длительность активации	Короткая (минуты)	Длительная (часы)
Способность к пиноцитозу	Умеренная	Высокая
Способность к фагоцитозу	Очень высокая	Высокая
Регенерация мембраны	Отсутствует	Происходит
Реутилизация фагосом	Невозможна	Возможна
Нелизосомная секреция	Отсутствует	Имеется
Fc-рецепторы	FcγII, FcγIII; при активации — FcγI	FcγI (спонтанно), FcγII, FcγIII

### 2.1.3. Эозинофилы

Эозинофилы составляют небольшую часть клеток крови (у человека — 0,5–2% от числа лейкоцитов). В крови они циркулируют меньше суток (по разным данным, от 30 мин до 18 ч), после чего мигрируют в ткани и пребывают там в течение 10–12 сут. Зрелые эозинофилы представляют крупные клетки (18–20 мкм в диаметре) с сегментированным (двудольным) ядром. Они содержат крупные (до 1 мкм) эозинофильные гранулы. Помимо этих крупных гранул, называемых специфическими, или вторичными, в зрелых эозинофилах присутствуют еще три типа гранул — первичные, мелкие гранулы, а также липидные тельца.

На поверхности эозинофилов присутствуют маркерные молекулы CD9 и CD35 (рецептор для комплемента — CR1), что позволяет отличить их от нейтрофилов с помощью проточной цитометрии (см. табл. 2.1). Кроме того, на клеточной мембране эозинофилов содержится ряд функционально важных рецепторов для антител изотипов IgG (FcγRII, FcγRIII — соответственно CD32 и CD16) и IgE (FcεRII, или CD23), цитокинов (для IL-5, GM-CSF, IL-3 и др.) и хемокинов (в особенности рецептор для эотаксина CCR3). На поверхности эозинофилов экспрессированы молекулы МНС, причем не только I, но и II класса, что позволяет эозинофилам в определенных ситуациях выступать в качестве АПК. Наконец, на поверхности эозинофилов представлены разнообразные молекулы адгезии, среди которых преобладают β<sub>2</sub>-, β<sub>1</sub>- и β<sub>7</sub>-интегрины и их рецепторы.

Главный щелочной белок (*MBP* — *major basic protein*), определяющий эозинофильность гранул; эозинофильный катионный белок (*ECP* — *eosinophil cationic protein*); эозинофильная пероксидаза (*EPO* — *eosinophilic peroxydase*) и нейротоксин, происходящий из эозинофилов (*EDN* — *eosinophil-derived neurotoxin*) — основные компоненты крупных (специфических) эозинофильных гранул (см. табл. 2.2). MBP (13,8 кДа) представлен в кристаллической форме и формирует сердцевину гранул. Три других белка содержатся в матриксе гранул. Для MBP и ECP характерна токсичность в отношении гельминтов, обусловленная способностью этих молекул встраиваться в мембрану клеток гельминтов и тем самым нарушать их целостность. ECP и EDN обладают активностью фермента, расщепляющего рибонуклеиновую кислоту (РНКаза), что определяет их участие в противовирусной защите. Все четыре белка могут быть токсичными для собственных тканей организма. В специфических гранулах присутствуют также цитокины и ферменты (коллагеназа, эластаза, β-глюкуронидаза, катепсин, РНКаза, миелопероксидаза). В мелких гранулах, присутствующих только в тканевых формах эозинофилов, содержатся ферменты (кислая фосфатаза, арилсульфатаза, пероксидаза и ряд других), а в первичных гранулах — кристаллы Шарко–Лейдена, основу которых составляет липофосфолипаза. Липидные тельца содержат все необходимое для синтеза эйкозаноидов: арахидоновую кислоту, липоксигеназу и циклоксигеназу. Секретция содержимого гранул осуществляется за счет экзоцитоза и дегрануляции. При секретии кристаллический MBP переходит в растворимую форму.

Роль эозинофилов в иммунной защите в первую очередь состоит в осуществлении внеклеточного цитолиза, которому принадлежит основная роль в защите от многоклеточных паразитов. Большинство белков эозинофилов

повреждают клетки макропаразитов; некоторые (MBP, ECP и EPO) — также нормальные клетки организма; ECP и EDN обладают активностью рибонуклеазы и оказывают противовирусное действие. Основные белки эозинофилов способствуют развитию аллергических реакций (через активацию тучных клеток и базофилов с участием MBP), оказывая регулирующее действие на иммунные процессы (действуя на Т-клетки).

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

Эозинофилы секретируют широкий спектр цитокинов: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ , GM-CSF, а также ряд хемокинов (эотаксин — CCL11, RANTES — CCL5, MIP-1 $\alpha$  — CCL3), эйкозаноиды (лейкотриены, фактор агрегации тромбоцитов — PAF), нейропептиды. Хемотаксическими факторами для эозинофилов служат эотаксины (CCL11, CCL24, CCL26), RANTES, а также IL-5. Основные хемокиновые рецепторы эозинофилов — CCR1, CCR2 и CCR3, взаимодействующие с RANTES и эотаксинами. Именно эотаксины 1, 2 и 3 обуславливают основное направление спонтанной миграции эозинофилов — в пищеварительный тракт (они локализуются в *lamina propria* слизистых оболочек). Во время менструальных циклов и при беременности усиливается миграция эозинофилов в матку и молочные железы, где они принимают участие в морфогенезе. Ограниченные количества эозинофилов мигрируют в тимус. Привлечение эозинофилов в очаг аллергического поражения осуществляется преимущественно провоспалительным хемокином RANTES (CCL5), лейкотриенами, PAF и IL-5. Из молекул адгезии наиболее важны для миграции эозинофилов в ткани интегрины:  $\beta_7$ - ( $\alpha_4\beta_7$ ),  $\beta_1$ - (VLA-4 —  $\alpha_4\beta_1$ ) и все три  $\beta_2$ -интегрина (см. раздел 2.3.1.2), экспрессируемые на поверхности эозинофилов.

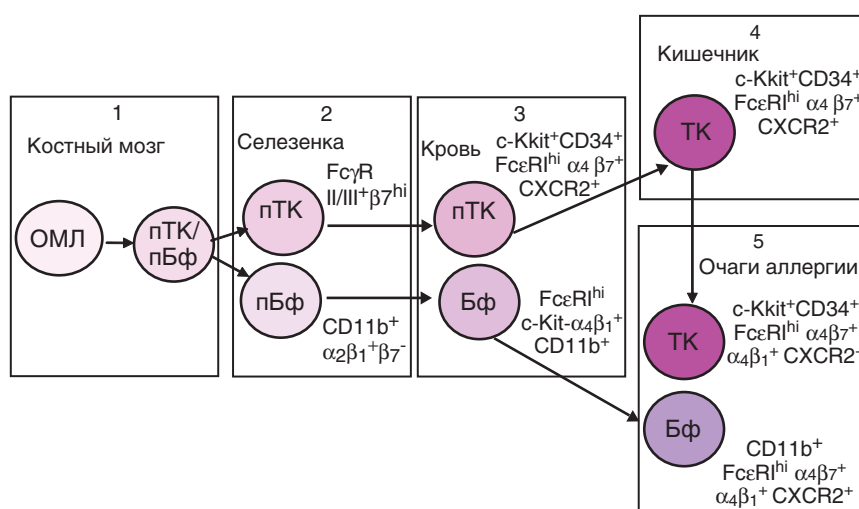
Функция эозинофилов в норме заключается в регуляции развития тучных клеток и морфогенетических процессов, связанных с беременностью и половым циклом у самок. Малоизученным остается участие эозинофилов в положительной селекции Т-клеток в тимусе. Благодаря механизму внеклеточного цитолиза, основными факторами которого служат белки гранул эозинофилов (см. раздел 4.1.1.2), при биологической агрессии эти клетки играют ключевую роль в защите от некоторых гельминтов и других патогенов. Являясь источником ряда цитокинов, эозинофилы участвуют в запуске Th2-зависимых иммунных процессов, в частности аллергических.

#### 2.1.4. Тучные клетки и базофилы

Тучные клетки (мастоциты) и базофилы представляют тканевые клетки, содержащие в цитоплазме базофильные гранулы. Оба типа клеток имеют костномозговое происхождение и принадлежат к миелоидному ряду. Их объединяет ряд других свойств, о которых будет сказано ниже. В отличие от базофилов, относящихся к клеткам крови, тучные клетки не циркулируют в крови и представляют тканевые клетки. Мастоциты реагируют на разного рода повреждающие воздействия, участвуют в развитии воспаления, служат основными эффекторными клетками при гиперчувствительности

немедленного типа и входят в первую линию иммунной защиты, обеспечивая в первую очередь защиту от многоклеточных паразитов. Базофилы также могут выполнять аналогичные функции. Однако если тучные клетки, находясь в очагах повреждения, реагируют на него немедленно, вовлечение базофилов в подобные реакции требует их миграции в ткани, что исключает участие базофилов в инициации и осуществлении ранних этапов реакций врожденного иммунитета.

Предполагают, что у тучных клеток и базофилов есть общий предшественник. Однако неясно, развивается ли он непосредственно из общего миелоидного предшественника или служит ответвлением одного из основных направлений миелоидной дифференцировки (эозинофильно-базофильного). Схема развития тучных клеток и базофилов представлена на рис. 2.4. Согласно этой схеме окончательная дифференциация предшественников этих клеток происходит в селезенке. Базофилы могут созреть как в костном мозгу, так и в селезенке, и мигрируют в кровотоке. Дифференцировка тучных клеток проходит иначе: в кровотоке поступают предшественники тучных клеток (у человека эти клетки в циркуляции имеют фенотип  $CD13^+ CD33^+ CD34^+ CD38^+ CD117^+$ ). Из кровотока предшественники тучных клеток мигрируют в ткани (в наибольшем количестве — в слизистую оболочку кишечника), где и завершается созревание мастоцитов. Основные факторы, определяющие дифференцировку тучных клеток — SCF и IL-3; в качестве кофакторов выступают IL-4, IL-9, IL-10 и фактор роста нервов (NGF). В частности, эти факторы обуславливают формирование гранул и пролиферацию клеток. В слизистых оболочках в роли фактора, необходимого для развития тучных клеток, выступает IL-33. Тучные клетки сохраняют способность к делению и имеют длительный срок жизни — месяцы и даже годы.



**Рис. 2.4.** Схема развития и миграции тучных клеток и базофилов. Рядом с кружками, обозначающими клетки, указаны их маркеры. ОМЛ — общий миелоидный предшественник; пТК — предшественник тучной клетки; ТК — тучная клетка; пБф — предшественник базофилов; Бф — базофил

Диаметр тучных клеток варьирует от 10 до 20 мкм. Они имеют овальную форму с ворсинчатой поверхностью. Мембранный фенотип тучных клеток выражается формулой  $Fc\epsilon RI^+ CD13^+ CD29^+ CD45^+ CD117^+ CD123^+$ . Среди мембранных молекул тучных клеток наиболее важны для реализации их функции высокоаффинные рецепторы IgE —  $Fc\epsilon RI$ .

Как уже было сказано, главная морфологическая особенность этих клеток — наличие в их цитоплазме большого количества базофильных гранул (10–150 на клетку). Гранулы разновидностей тучных клеток варьируют по составу (см. табл. 2.2, 2.4), однако они всегда содержат вазоактивные амины, главный из которых — гистамин — реализует значительную часть эффектов тучных клеток при аллергических реакциях. Кроме того, в гранулах содержатся хондроитинсульфаты А и С и/или гепарин, а у некоторых видов животных (например, у кроликов) — серотонин. В состав гранул входят также ферменты: прежде всего протеазы, а также дегидрогеназа, пероксидаза, РНКаза, гистидинкарбоксилаза и кислые гликозамингликаны. Выделяют 3 группы протеаз тучных клеток: триптазы (ферменты со специфичностью, близкой к трипсину; у мышей — 5 разновидностей), химазы (сходны по специфичности с химотрипсином; у мышей — 4 варианта) и карбокси-пептидазу А (относится к металлопротеиназам). Перечисленные факторы, содержащиеся в гранулах, — предобразованные вещества. Перекрестное связывание рецепторов  $Fc\epsilon RI$  комплексами IgE-антител с аллергенами обуславливает высвобождение содержимого гранул (дегрануляцию) и проявление всех основных реакций гиперчувствительности немедленного типа (см. раздел 4.5.1.3). Дегрануляция может быть вызвана также повышением содержания внутриклеточного цАМФ или концентрацией в цитозоле ионов  $Ca^{2+}$ . Дегрануляция не сопровождается гибелью клеток — гранулы после выброса регенерируют. Тучные клетки несут некоторые патогенраспознающие рецепторы (TLR-2, TLR-3, TLR-4), что позволяет им распознавать патогены и их продукты напрямую.

При стимуляции тучные клетки синтезируют и секретируют эйкозаноиды (см. раздел 2.5.4) и цитокины. Из эйкозаноидов в тучных клетках в наибольшем количестве вырабатываются лейкотриен C<sub>4</sub> и простагландин E<sub>2</sub>. Спектр цитокинов, секретируемых тучными клетками, сходен со спектром цитокинов, продуцируемых Т-хелперами 2-го типа (Th2 — см. раздел 3.5.3.1): IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, GM-CSF. Тучные клетки вырабатывают также провоспалительные (IL-1, IL-8, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, TNF $\alpha$ ) и гомеостатические цитокины (IL-7 и IL-15), а также TGF $\beta$ , некоторые хемокины и интерфероны основных типов. IL-4, TNF и GM-CSF мастоциты вырабатывают спонтанно, образование остальных цитокинов индуцируется стимуляторами. Активированные тучные клетки продуцируют ряд пептидных ростовых факторов (сосудистый — VEGF, фибробластный — FGF, фактор роста нервов — NGF). Спектр секретируемых цитокинов (особенно спонтанная выработка IL-4) определяет иммунорегуляторную функцию тучных клеток, главное проявление которой — участие в индукции дифференцировки Th2-клеток.

Для тучных клеток характерны поверхностные маркеры: CD117 (c-Kit) — рецептор для SCF и CD123 — рецептор для IL-3. SCF и IL-3 (помимо их роли в качестве факторов, определяющих развитие тучных клеток) служат

основными факторами роста зрелых тучных клеток. Тучные клетки несут на своей поверхности также высокоаффинные Fc $\gamma$ 1-рецепторы и рецепторы для компонентов комплемента C3b и C3d (мукозные тучные клетки лишены CR1), что свидетельствует об их участии в реакциях врожденного иммунитета. На поверхности тучных клеток присутствуют молекулы МНС обоих классов; наличие МНС-II, а также костимулирующих молекул CD86 придает мастоцитам способность выполнять функции АПК, особенно при индукции Th2-клеток.

Тучные клетки локализируются в подслизистом слое слизистых оболочек (особенно в кишечнике), соединительнотканном слое кожи (дерме), серозных оболочках, селезенке, периваскулярной соединительной ткани. В 1 г названных тканей содержится  $10^4$ – $10^6$  тучных клеток. Мастоциты легко идентифицировать по окрашиваемости толуидиновым синим или алциановым синим. Выделяют два варианта тучных клеток: слизистые, или мукозные (тип t), и серозные (тип ct) (табл. 2.4). Названия отражают 2 главных отличительных признака этих клеток — преимущественную локализацию и преобладающий тип протеаз (триптазы — t или хемотриптазы — ct). Оба типа тучных клеток происходят из костного мозга, но только клетки t-типа в своем развитии зависят от тимуса и отсутствуют у генетически бестимусных мышей. Продолжительность жизни серозных тучных клеток выше, чем слизистых. Основным ростовым фактором для клеток обоих типов — SCF; в качестве кофактора для слизистых тучных клеток выступают IL-3 и IL-4, для серозных — только IL-3. Преобладающий тип протеогликана в слизистых тучных клетках — хондроитинсульфат, в серозных — гепарин. На поверхности мукозных мастоцитов экспрессировано больше Fc $\epsilon$ RI, они содержат больше IgE в цитоплазме, чем серозные. Тучные клетки разных типов различаются также интенсивностью секреции эйкозаноидов: в слизистых тучных клетках больше лейкотриенов, в серозных — простагландина. Несмотря на существенные различия, до конца не известно, являются ли эти разновидности тучных клеток истинными субпопуляциями или представляют фенотипические варианты единой популяции тучных клеток, дифференцирующиеся под влиянием факторов микроокружения. У разных типов тучных клеток микроокружение различается: мастоциты типа t локализованы главным образом в подслизистом слое мукозы, а тучные клетки типа ct — в серозных полостях, дерме и миндалинах. Участие в защите от паразитов и развитии аллергических реакций доказано только для слизистых тучных клеток (типа t), тогда как серозные мастоциты причастны скорее к развитию склеротических процессов.

**Таблица 2.4.** Разновидности тучных клеток человека

Свойство	Мукозные тучные клетки	Серозные тучные клетки
Локализация	Слизистая оболочка кишечника, <i>lamina propria</i> респираторного тракта	Кожа и подслизистый слой кишечника
Основные протеазы	Триптаза	Триптаза, химаза, катепсин G, карбоксипептидаза

Окончание табл. 2.4

Свойство	Мукозные тучные клетки	Серозные тучные клетки
Активация	IgE-зависимая	IgE-зависимая и IgE-независимая
Протеогликаны	Хондроитинсульфат	Гепарин
Эйкозаноиды	LTC <sub>4</sub> >PGD <sub>2</sub> (↓)	PGD <sub>4</sub> >LTC <sub>4</sub>
Секретируемые цитокины	IL-5 > IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, TNF $\alpha$ , GM-CSF, SCF, TGF $\beta$ ,	IL-3, IL-4 > IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, TNF $\alpha$ , SCF
Число Fc $\epsilon$ RI на клетке	Около 100 000	Около 10 000
Срок жизни	<40 сут	>40 сут
Зависимость от тимуса	Есть	Нет
Функциональная роль, связь с патологией	Участвуют в развитии реакций на инвазию парази- тов и аллергических реакций	Участвуют в развитии процесса склерозирова- ния

В противоположность тучным клеткам базофилы в норме представлены в кровяном русле. Их содержание в крови очень невелико — до 0,5% от числа лейкоцитов. По своей морфологии базофилы сходны как с другими типами гранулоцитов, так и с тучными клетками. Однако от других гранулоцитов базофилы отличаются наличием базофильных гранул, а от мастоцитов — сегментированным ядром, округлой формой и меньшей величиной. Для базофилов миграция в очаг аллергии — основное условие выполнения их функций. Базофилы мигрируют из кровотока в очаг аллергического воспаления наряду с эозинофилами и нейтрофилами. На них больше, чем на тучных клетках, экспрессировано рецепторов для хемотаксических факторов — бактериального формил-метионильного пептида, анафилатоксинов C3a и C5a,  $\alpha$ - и  $\beta$ -хемокинов (CXCR1, CXCR4, CCR1, CCR2, CCR3). Как и тучные клетки, базофилы несут на своей поверхности высокоаффинные (Fc $\epsilon$ RI) и низкоаффинные (Fc $\epsilon$ RII, или CD23) рецепторы для IgE, H<sub>2</sub>-рецепторы для гистамина. Однако, в отличие от мастоцитов, базофилы не экспрессируют Fc $\gamma$ RI. Спектр TLR, экспрессируемых базофилами, значительно беднее, чем у тучных клеток. В отличие от мастоцитов, базофилы не несут на своей поверхности c-Kit. В состав базофильных гранул входят: гистамин, протеазы (химаза и триптаза) и некоторые другие ферменты, пептидогликаны (преимущественно хондроитинсульфаты), гликозаминогликаны. Количество гранул в базофилах меньше, чем в тучных клетках, и они содержат меньше протеаз. Спектр активных веществ, секретируемых базофилами, ограничен; он включает: лейкотриен C<sub>4</sub>, IL-4, IL-13 и ряд других цитокинов (см. табл. 2.2). Функция базофилов в тканях сходна с функцией тучных клеток — они поддерживают аллергический процесс, инициированный тучными клетками, высвобождая содержимое гранул в ответ на перекрестное связывание Fc $\epsilon$ RI. В отличие от тучных клеток, базофилы не способны восстанавливать гранулы.

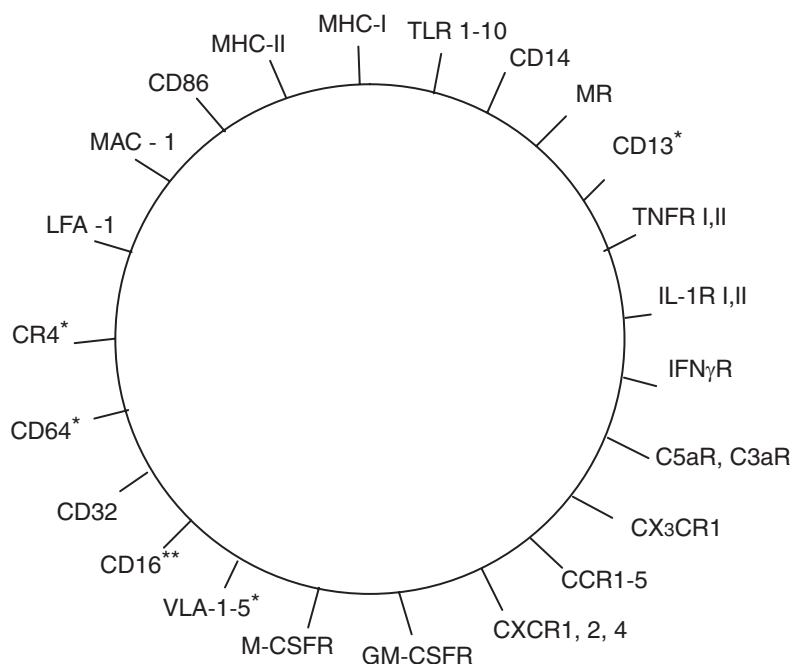
### 2.1.5. Моноциты и макрофаги

Моноциты и макрофаги представляют стадии развития миелоидных клеток. Они образуют мононуклеарную фагоцитирующую систему. Роль макрофагов в качестве одних из основных фагоцитирующих клеток установлена в 1882 г. И.И. Мечниковым, давшим этим клеткам их название. В 20-е гг. XX века Л. Ашоф (L. Aschoff) создал учение о ретикуло-эндотелиальной системе — защитной системе, объединяющей тканевые фагоцитирующие клетки. Позже для обозначения практически той же системы стали использовать термин «мононуклеарная фагоцитирующая система».

Циркулирующий вариант клеток — моноцит, тканевый — макрофаг. Превращение моноцита в макрофаг происходит под влиянием тканевого микроокружения и сопровождается экспрессией новых генов, т.е. может рассматриваться как дифференцировка клеток. Эту дифференцировку регулирует М-CSF. Моноциты представляют довольно крупные клетки (диаметром 9–15 мкм) с ядром бобовидной формы и тонкой структурой хроматина. Макрофаги значительно крупнее моноцитов (диаметр составляет 20–25 мкм) и имеют распластанную форму. В отличие от округлых моноцитов, макрофаги имеют неправильные очертания и морфологически полиморфны.

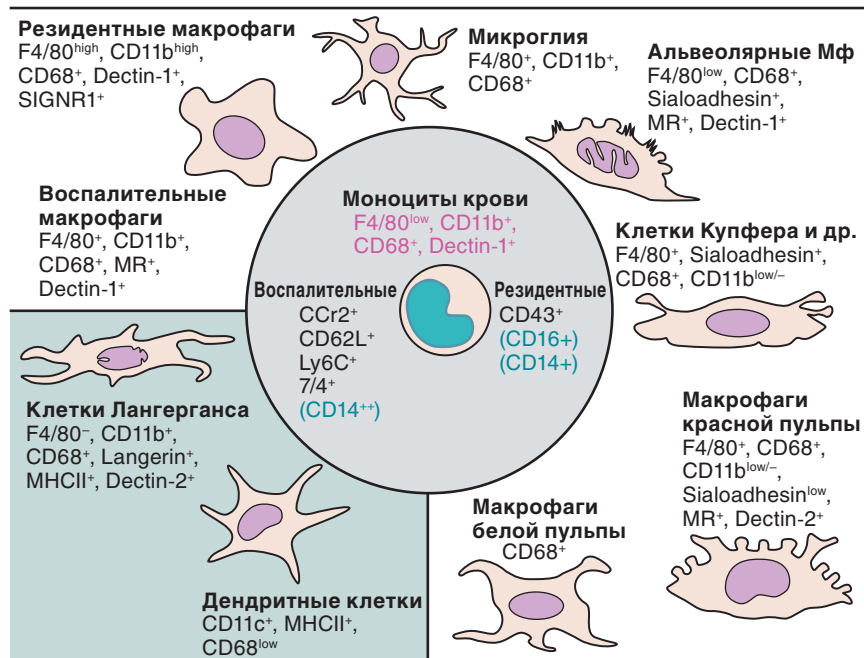
Часто морфологических признаков оказывается недостаточно для дифференциации моноцитов от макрофагов, а также для определения их разновидностей. В этом случае используют дополнительные приемы, такие как определение ферментов или мембранных молекул-маркеров (рис. 2.5, 2.6). Наиболее важные в функциональном отношении мембранные молекулы моноцитов/макрофагов — рецепторы, предназначенные для распознавания РAMP (см. подробнее раздел 2.2), в первую очередь — толл-подобные рецепторы (TLR) (см. табл. 2.1). Ни на каких других клетках эти рецепторы не представлены так разнообразно, как на моноцитах и макрофагах. Это обеспечивает макрофагам и моноцитам возможность распознавать фактически все основные группы паттернов. На этих клетках обнаружены все разновидности TLR, для которых характерна экспрессия на поверхности клеток — TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-11. С мембранным рецептором TLR-4 функционально связан один из основных маркеров моноцитов и макрофагов — молекула CD14. CD14 взаимодействует с комплексом бактериального ЛПС с ЛПС-связывающим белком, что облегчает взаимодействие ЛПС с TLR-4. TLR, распознающие чужеродные нуклеиновые кислоты (TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9), локализованы внутриклеточно — на мембранах цитоплазматических гранул. К группе мембранных молекул, распознающих паттерны, следует отнести молекулу CD13 (аминопептидаза N), характерную для моноцитов, но не макрофагов. Как уже было отмечено, CD13 обладает сродством к антигенам оболочки ряда вирусов.

Для моноцитов/макрофагов свойственна также экспрессия других рецепторов врожденного иммунитета — лектиновых. Лектиновые рецепторы моноцитов и макрофагов распознают свободные D-гликозильные остатки глюкозы, галактозы, маннозы, фукозы, N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина. На собственных клетках организма такие остатки экранированы остатками сиаловой кислоты и экспонируются преимущественно на старых клетках, подлежащих элиминации. Патогены



**Рис. 2.5.** Основные мембранные молекулы макрофагов. \* В основном моноциты.

\*\* В основном макрофаги



**Рис. 2.6.** Фенотипическая гетерогенность моноцитов/макрофагов и дендритных клеток как результат дифференцировки *in vivo*. Внутри круга — моноциты и их разновидности, вне круга — разновидности макрофагов. Указаны мембранные маркеры клеток

(бактерии, грибы, простейшие) несут на поверхности гликоконъюгаты с неэкранированными гликозильными остатками, распознаваемыми лектиновыми рецепторами макрофагов, что облегчает фагоцитоз патогенов. В результате распознавания происходит эндоцитоз (пиноцитоз, фагоцитоз) образующихся комплексов. Наиболее важный рецептор лектиновой группы — маннозный рецептор (MR, CD206), характерный для макрофагов и слабее экспрессированный на моноцитах. И на моноцитах, и на макрофагах присутствуют лектиновые рецепторы DC-SIGN (CD209) и дектин-1. Экспрессия дектина-1 подавляется при активации макрофагов. Сигналом к фагоцитозу является также связывание с лигандами так называемых *scavenger*-рецепторов («мусорщиков»), к которым относят молекулу MSR (*Macrophage scavenger receptor*, CD36), обладающую сродством к коллагену.

Другая группа рецепторов, разнообразно представленных на моноцитах/макрофагах, — Fc-рецепторы (молекулы, распознающие Fc-участок молекул иммуноглобулинов, обычно в связанном с антигеном состоянии). Эти рецепторы обеспечивают распознавание и облегчают фагоцитоз и разрушение моноцитами и макрофагами опсонизированных антителами клеток (в том числе патогенных); параллельно происходит активация фагоцитов. Моноциты экспрессируют полный набор Fc $\gamma$ -рецепторов — Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) и Fc $\gamma$ RIII (CD16). На макрофагах присутствуют только Fc $\gamma$ RII и Fc $\gamma$ RIII. Моноциты — единственный тип клеток, спонтанно экспрессирующих Fc $\gamma$ RI, обладающий наиболее высоким сродством к молекуле IgG и способный связывать его даже в свободном состоянии, а не только в составе иммунного комплекса, как это происходит обычно. На моноцитах и макрофагах представлены также рецепторы для Fc-части IgA (Fc $\alpha$ R) и низкоаффинные рецепторы для IgE — Fc $\epsilon$ RII (CD23). Эти рецепторы участвуют в регуляции синтеза антител соответствующих изотипов.

Благодаря присутствию на поверхности моноцитов и макрофагов рецепторов для комплемента (CR) эти клетки распознают фрагменты факторов комплемента, прикрепленные к поверхности патогенов. Большинство рецепторов распознает фрагменты C3b и C3d — CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18, или Mac-1) и CR4 (CD11c/CD18, или p150,95). Функция этих рецепторов сходна с таковой Fc-рецепторов: они облегчают распознавание клеток-мишеней фагоцитами и поставляют в фагоцитирующие клетки активационные сигналы. Моноциты/макрофаги экспрессируют также рецепторы для фактора C1q и хемотаксических факторов-анафилатоксинов C3a и C5a.

Поскольку для проявления функциональной активности моноцитам/макрофагам важно взаимодействие с межклеточным матриксом (в процессе миграции) и с другими клетками (при участии в реакциях иммунитета), на их поверхности представлено большое число молекул адгезии. Среди них особенно важны интегрины (см. раздел 2.3.1.2), например  $\beta_1$ -интегрины, обеспечивающие связи с молекулами межклеточного матрикса (коллагеном, фибронектином, ламинином). Из  $\beta_1$ -интегринов на моноцитах экспрессированы VLA-4, VLA-2, VLA-5 и VLA-6; 3 последних на макрофагах отсутствуют. VLA-2, VLA-5 и VLA-6 взаимодействуют с названными молекулами матрикса, а VLA-4 — еще и с мембранной молекулой лимфоцитов и самих активированных макрофагов VCAM-1. Все 3  $\beta_2$ -интегрина — LFA-1, Mac-1

(CR3) и p150,95 (CR4) — присутствуют на поверхности как моноцитов, так и макрофагов.  $\beta_2$ -Интегрины взаимодействуют преимущественно с интегриновыми рецепторами ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) и ICAM-3 (CD50), присутствующими как на Т-лимфоцитах, так и на самих макрофагах (особенно после их активации), а также на активированных эндотелиальных и эпителиальных клетках. За адгезию к эндотелиальным клеткам, необходимую при транссудистой миграции, отвечает молекула PECAM (CD31). К молекулам адгезии необходимо отнести также CD15 (Lewis X) — углеводный компонент мембранных гликоконъюгатов (разветвленный трисахарид), служащий рецептором для молекул адгезии селектинов, который распознает углеводы (см. раздел 2.3.1.1).

Функционально важную группу поверхностных молекул моноцитов/макрофагов образуют молекулы МНС (см. раздел 3.2.2.2) и костимулирующие молекулы (см. раздел 3.4.1.4). Роль МНС состоит в представлении (презентации) антигенных пептидов ТCR. Если молекулы МНС-I присутствуют на всех ядросодержащих клетках организма, то молекулы МНС-II экспрессированы только на специализированных АПК, к которым наряду с дендритными клетками и В-лимфоцитами относят макрофаги. Экспрессия молекул МНС-II усиливается при активации клеток. Презентация антигена — узловое событие иммунного ответа, связывающее реакции врожденного и адаптивного иммунитета. В ходе презентации молекула МНС распознается как самим ТCR, так и корецепторами — CD8 и CD4, обладающими сродством к молекулам МНС-I и МНС-II соответственно. Молекула CD4 в небольшом количестве экспрессирована на некоторых макрофагах, что делает их чувствительными к инфицированию вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), для которого молекула CD4 служит основным рецептором (см. раздел 4.7.2). Помимо презентации антигена, для эффективной активации Т-клеток необходима их костимуляция. Она достигается при взаимодействии пар молекул АПК и Т-лимфоцита, называемых костимулирующими. Со стороны АПК (в том числе макрофага) в роли костимулирующих выступают молекулы CD80 и CD86. Первая из них появляется на поверхности клетки только после активации, вторая экспрессируется конститутивно (даже на покоящихся клетках), но при получении активационного сигнала ее экспрессия усиливается.

Важная группа мембранных молекул моноцитов/макрофагов — рецепторы для цитокинов. Из них наиболее специфичен для моноцитов и макрофагов Fms (CD115) — рецептор для их линейного фактора M-CSF. Наличие Fms позволяет дифференцировать моноциты и их предшественники от клеток гранулоцитарного ряда, на которых этот рецептор отсутствует. Для проявления макрофагами их функций, как эффекторных клеток иммунитета, особенно важны рецепторы для интерферона  $\gamma$  (IFN $\gamma$ RI и IFN $\gamma$ RII — CD119); для провоспалительных цитокинов (которые они сами же и секретируют) IL-1 (CD121a, CD121b) и TNF (CD120a, CD120b); а также рецепторы для IL-6, IL-12, IL-18, колониестимулирующего фактора GM-CSF (CD116) и ряда других цитокинов. Высокая подвижность моноцитов и особенно макрофагов требует экспрессии рецепторов для хемотаксических факторов. Некоторые из них (рецепторы для C3a и C5a) уже упоминались. Моноциты и макрофаги располагают широким спектром рецепторов для специали-

зированных хемотаксических цитокинов — хемокинов (см. раздел 2.3.2.2), особенно провоспалительных: CXCR1, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR8, CX<sub>3</sub>CR1.

При гистохимической идентификации моноцитов/макрофагов определяют наличие в клетках неспецифической эстеразы, диффузно распределяющейся в цитоплазме. Выявление ряда ферментов позволяет оценить степень зрелости этих клеток. Так, например, миелопероксидаза содержится в значительном количестве в моноцитах; их превращение в макрофаги сопровождается утратой этого фермента. Экспрессия 5'-нуклеотидазы, β-галактозидазы и аминопептидазы при этом, наоборот, возрастает, а транслугтаминазу удается выявить только в зрелых макрофагах. Помимо названных, в макрофагах присутствуют и другие ферменты — коллагеназа, протеиназы, липазы, нуклеазы, фосфатазы и др. Некоторые ферменты макрофагов участвуют в реализации бактерицидной активности: кислород-зависимой (NADPH-оксидаза, миелопероксидаза, каталаза), не зависящей от кислорода (лизоцим, катепсины, эластаза, аргиназа, протеазы и другие гидролазы), и в генерации оксида азота (индуцибельная NO-синтаза). Процессы, осуществляемые с участием этих ферментов, описаны далее (см. раздел 2.3.5.2).

Моноциты и макрофаги секретируют некоторые из указанных выше ферментов, а также цитокины, гормоны [адренкортикотропный (АКТГ) и соматотропный гормоны, β-эндорфин и др.], катионные белки, протеогликаны, метаболиты арахидоновой кислоты, компоненты комплемента, белки межклеточного матрикса (фибронектин, тромбоспондин). Некоторые из них (три последние группы факторов, некоторые ферменты) моноциты/макрофаги секретируют спонтанно, но активация обычно усиливает их выработку. С секреторной активностью связано выполнение макрофагами других функций: поставки ряда гуморальных факторов врожденного иммунитета, иммунорегуляторной роли, а также участия в обмене липидов и формировании межклеточного матрикса. Особенность моноцитов/макрофагов — быстрая реакция на действие стимулирующих молекул, реализуемая обычно в пределах 1 ч после контакта с молекулой. Однако в этой функции макрофаги значительно уступают нейтрофилам.

В связи со значительными различиями свойств моноцитов/макрофагов и нейтрофилов (см. табл. 2.3) физиологическая роль этих клеток практически не перекрывается, даже несмотря на то, что основная функция тех и других — фагоцитоз. Если нейтрофилы ответственны за самый ранний этап защиты, осуществляемой с помощью фагоцитоза (проходит интенсивно, но кратковременно), то моноциты/макрофаги, помимо фагоцитоза (реализуется менее интенсивно и более продолжительно), выполняют многочисленные другие функции, в том числе опосредованные секретируемыми ими гуморальными продуктами.

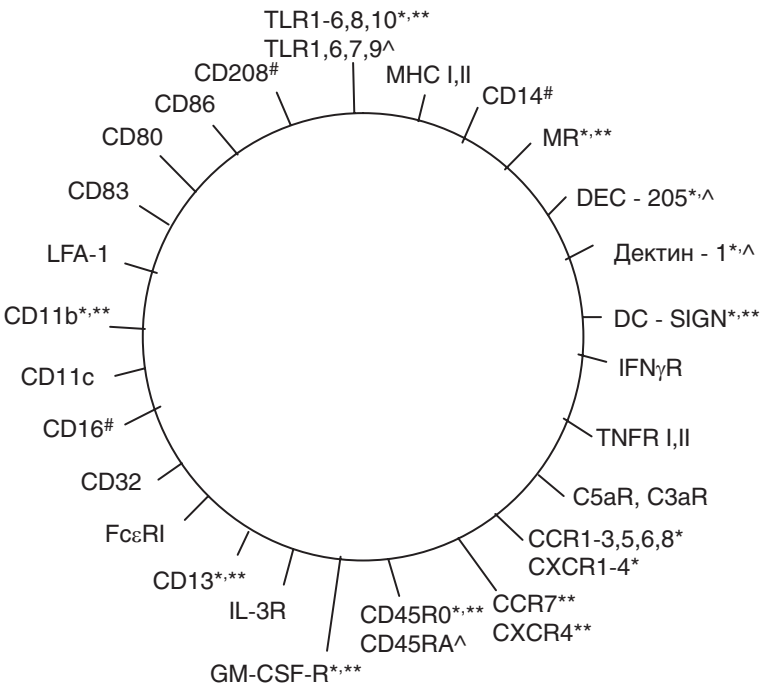
Среди секреторных продуктов макрофагов наиболее важную роль в развитии воспаления и реакций врожденного иммунитета играют цитокины. Их секреция, как правило, происходит при активации клеток. Спектр цитокинов, секретируемых моноцитами и макрофагами, очень широк: цитокины семейства IL-1 (IL-1β, IL-18, в меньшей степени IL-1α, представленный на мембране макрофагов и рецепторный антагонист IL-1) и

другие провоспалительные цитокины —  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-23, IL-27. Макрофаги продуцируют все 3 разновидности колониестимулирующих факторов (GM-CSF, G-CSF и M-CSF), интерфероны (особенно  $\text{IFN}\alpha$ , но также  $\text{IFN}\beta$  и  $\text{IFN}\gamma$ ), гомеостатический цитокин IL-15, супрессорные цитокины (IL-10 и трансформирующий фактор роста  $\beta$  —  $\text{TGF}\beta$ ), ростовые/ангиогенные факторы (фибробластный — FGF, тромбоцитарный — PDGF и сосудистый эндотелиальный — VEGF). Моноциты/макрофаги образуют большую часть провоспалительных хемокинов: CXCL8 (IL-8), CCL5 (RANTES), макрофагальные воспалительные белки (CCL3, CCL4, CCL9, CCL10, CCL15, CCL18, CCL23), макрофагальные хемотаксические белки (CCL2, CCL7, CCL8, CCL12, CCL13) и др.

Секреторная функция моноцитов и макрофагов (в отличие от гранулоцитов) реализуется в основном по классическому механизму, зависящему от аппарата Гольджи, тогда как дегрануляция, т.е. выброс содержимого лизосом и фаголизосом, играет незначительную роль. Эти формы секреторного процесса отличаются в зависимости от наличия интактных микротрубочек — разрушение микротрубочек колхицином нарушает процесс дегрануляции, но может даже усилить аппарат Гольджи-зависимую секрецию. Дегрануляцией осуществляется выброс продуктов окислительного взрыва, производных оксида азота, кислых гидролаз и других лизосомальных ферментов. Эти факторы обуславливают внеклеточный цитолиз и переваривание клеток и их компонентов, т.е. эффекторные функции врожденного иммунитета, тогда как продукты классического секреторного процесса в большей степени участвуют в регуляции воспаления и реакций врожденного иммунитета. Продукты секреции макрофагов, важные для функционирования врожденного иммунитета, рассмотрены в разделе 2.3.6.

Есть свидетельства неоднородности популяции моноцитов. На основе мембранного фенотипа и функциональных особенностей выделяют две основные разновидности этих клеток:  $\text{CD14}^{\text{hi}}\text{CD16}^-$  и  $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$ . Клетки первого типа составляют большинство моноцитов крови. Они имеют более крупные размеры и более высокую плотность, чем вторые клетки. Клеткам с фенотипом  $\text{CD14}^{\text{hi}}\text{CD16}^-$  свойственна высокая фагоцитарная и бактерицидная активность. Они секретируют полный спектр провоспалительных цитокинов.  $\text{CD14}^{\text{hi}}\text{CD16}^-$  клетки экспрессируют в большом количестве  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$  (CD64), рецепторы для хемотаксических факторов и  $\beta_2$ -интегрины, особенно Mac-1 (CD11b/CD18). Таким образом, эти клетки имеют необходимые маркеры для эмиграции в очаги воспаления, осуществления фагоцитарной и цитолитической активности и поэтому рассматриваются как предшественники воспалительных макрофагов. Клетки фенотипа  $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$  экспрессируют большое количество МНС-II и костимулирующих молекул, обладают относительно слабой фагоцитарной активностью, но эффективно презентруют антиген Т-лимфоцитам, и секретируют  $\text{IFN}\alpha$ .  $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$  клетки рассматривают в качестве предшественников резидентных макрофагов.

Миграция моноцитов в ткани сопровождается их превращением в разнообразные формы макрофагов и дендритных клеток (рис. 2.7, табл. 2.5). Дифференцировка моноцитов в дендритные клетки будет рассмотрена в следующей главе. Выделяют две основные разновидности макрофагов — резидентные и воспалительные (табл. 2.6). Резидентные макрофаги возни-



**Рис. 2.7.** Основные мембранные молекулы дендритных клеток. \* Незрелые миелоидные дендритные клетки. \*\* Зрелые миелоидные клетки. ^ Плазмоцитоидные дендритные клетки. # Клетки Лангерганса

**Таблица 2.5.** Маркерные рецепторы и продукты дендритных клеток и моноцитов

Молекулы	Моноциты	Незрелые миелоидные дендритные клетки	Зрелые миелоидные дендритные клетки	Плазмо-цитойдные дендритные клетки	Зрелые лимфоидные дендритные клетки
TLR	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10	1, 6, 7, 9, 10	1, 2, 4, 6, 7, 9, 10
Рецепторы цитокинов	IL-3R <sup>+</sup> GM-CSFR <sup>++</sup>	IL-3R <sup>+</sup> GM-CSFR <sup>++</sup>	GM-CSFR <sup>+</sup>	IL-3R <sup>+++</sup> GM-CSFR <sup>+</sup>	IL-3R <sup>++</sup>
CD45R	RA	R0	R0	RA	RA
CD13/14	CD13 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>	CD13 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup>	CD13 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup>	CD13 <sup>-</sup> CD14 <sup>-</sup>	CD13 <sup>-</sup> CD14 <sup>-</sup>
CD11b/c	CD11b <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup>	CD11b <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup>	CD11b <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup>	CD11b <sup>-</sup> CD11c <sup>-</sup>	CD11b <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup>
Цитокины	IL-12 <sup>++</sup>	IL-12 <sup>++</sup>	IL-12 <sup>-</sup> , IFNα/β <sup>-</sup>	IFNα/β <sup>+++</sup>	IL-12 <sup>++</sup> , IFNα/β <sup>+</sup>
Хемокиновые рецепторы	—	CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4	CCR7, CXCR4	—	—

**Таблица 2.6.** Сравнительная характеристика резидентных и воспалительных макрофагов

Показатель	Резидентные макрофаги	Воспалительные макрофаги
Направление миграции	В нормальные ткани	В воспалительные ткани
Хемокиновые рецепторы	CCR5, CXCR4, CX <sub>3</sub> CR1	CCR1, CCR2, CCR4, CCR7, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CX <sub>3</sub> CR1
Fcγ-рецепторы	CD16 <sup>+</sup> CD32 <sup>+</sup> CD64 <sup>±</sup>	CD16 <sup>-</sup> CD32 <sup>++</sup> CD64 <sup>+</sup>
Экспрессия CD14	CD14 <sup>+</sup>	CD14 <sup>+++</sup>
Экспрессия CD62L	CD62L <sup>-</sup>	CD62L <sup>++</sup>
Срок жизни	Годы	Недели
Функция	Тканевой гомеостаз, клиренс апоптотических клеток	Развитие воспаления, защита от патогенов, заживление ран

Примечание. <sup>-</sup> — нет экспрессии; <sup>+</sup> — слабая экспрессия; <sup>++</sup> — сильная экспрессия; <sup>+++</sup> — очень сильная экспрессия

кают в результате спонтанной («плановой») миграции моноцитов из кровотока в ткани, не связанной с воспалением, тогда как воспалительные макрофаги образуются в процессе экстренной миграции в очаги воспаления. Превращение в макрофаги сопровождается увеличением размера и формы клеток (обусловлены перестройкой цитоскелета), изменением экспрессии некоторых мембранных молекул (ослабевают экспрессия CD13, CD14, CD15, β<sub>1</sub>-интегринов, FcγRI, усиливается экспрессия CD16). Это сказывается на ответе клеток на внешние стимулы. Воспалительные макрофаги обладают высокой фагоцитарной и бактерицидной активностью, выделяют ряд цитокинов и других гуморальных веществ, важных для формирования воспаления и реализации иммунной защиты. Эти свойства позволяют воспалительным макрофагам играть роль эффекторных клеток воспаления и врожденного иммунитета. Резидентные макрофаги выполняют преимущественно гомеостатические и регуляторные функции, участвуя в разрушении старых клеток и регуляции иммунных и воспалительных процессов, а также выступают в роли АПК. Резидентные макрофаги обладают более длительным сроком жизни (годы по сравнению с неделями для воспалительных макрофагов).

Воспалительные и резидентные моноциты мигрируют из кровотока в ткани по-разному, поскольку в первом случае решающая роль принадлежит гуморальным факторам и молекулам адгезии, индуцируемым в процессе воспаления, а во втором — невоспалительным гомеостатическим факторам. В качестве хемокина для резидентных макрофагов выступает фракталкин (CX<sub>3</sub>CL1). Рецепторы для этого хемокина (CX<sub>3</sub>CR1) экспрессированы в большом количестве преимущественно на CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитах, при миграции в ткани становящихся резидентными макрофагами. CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>-</sup> моноциты слабо экспрессируют этот рецептор, но несут рецептор CCR2 для провоспалительных хемокинов преимущественно группы MCP (CCL2, CCL7, CCL8, CCL13, CCL16). В связи с этим CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>-</sup> клетки обладают способностью мигрировать в очаги воспаления и превращаться в воспалительные макрофаги. Наличие рецептора CCR2 — очень важное свойство CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>-</sup> клеток,

поэтому эту субпопуляцию моноцитов иногда обозначают как  $CD14^{hi}CCR2^{+}$ . Эти клетки экспрессируют еще несколько хемокиновых рецепторов, отсутствующих у предшественников резидентных макрофагов: CCR1, CCR4, CCR7, CXCR1, CXCR2. Эти рецепторы распознают практически все провоспалительные и часть гомеостатических цитокинов. В свою очередь, предшественники резидентных макрофагов, помимо рецептора для фракталкина, несут еще несколько хемокиновых рецепторов, отсутствующих или слабо экспрессированных на воспалительных моноцитах — CCR5 и CXCR4 (отметим, что эти рецепторы служат корецепторами для ВИЧ и, следовательно, способствуют инфицированию этим вирусом макрофагов).

Резидентные макрофаги, локализованные в разных органах, могут существенно различаться по морфологии, составу экспрессируемых поверхностных маркеров, спектру секретируемых цитокинов и функциям. Большинство из них имеют собственные названия. Так, макрофаги печени, называемые клетками Купфера, имеют звездчатую форму; они занимают пространство между сосудами печени и гепатоцитами и участвуют в фильтрации продуктов, поступающих из кровотока в паренхиму печени. Численность этих клеток очень велика: на их долю приходится до 50% клеток моноклеарной фагоцитирующей системы. Определенным своеобразием отличаются альвеолярные макрофаги (способны мигрировать в просвет альвеол), перитонеальные макрофаги, макрофаги центральной нервной системы (микроглия), почек (мезангиальные клетки), костей (остеокласты), тимуса (их важнейшая функция состоит в удалении тимоцитов, в массовом порядке погибающих в процессе развития и селекции), макрофаги вторичных лимфоидных органов и т.д. Вариабельность макрофагов проявляется также и на уровне активированных клеток. Однако в этом случае разнообразие обусловлено не только собственными свойствами моноцитов/макрофагов, но и природой стимуляторов.

### 2.1.6. Дендритные клетки

Уже в начале 60-х годов XX века стало понятным, что макрофаги не являются единственным типом «вспомогательных» или, используя современную терминологию, АПК. Было сформулировано представление об А-клетках — малочисленных адгезивных клетках, обладающих очень высокой способностью обрабатывать антиген, делая его пригодным для стимуляции Т-лимфоцитов. В 1973 г. Р. Стейнман и З. Кон (*R.M. Steinman, Z.A. Kohn*) описали древовидные клетки лимфоидных органов и назвали их дендритными клетками. К концу 80-х годов были накоплены данные, позволяющие рассматривать эти клетки как главные «профессиональные» АПК. По эффективности презентации антигена они на 2 порядка превосходят макрофаги, что обусловлено прежде всего более высокой экспрессией на дендритных клетках продуктов генов МНС, особенно МНС-II, а также костимулирующих молекул. В результате только дендритные клетки способны активировать наивные Т-лимфоциты. Презентация антигена, являющаяся основной функцией дендритных клеток, служит сигналом для запуска иммунного ответа и в связи с этим будет рассмотрена в контексте адаптивного иммунитета (см. раздел 3.5.1). В этой главе представлено описание всех разновидностей гетерогенной популяции дендритных клеток, как миелоидных, так и лимфоидных.

Для зрелых дендритных клеток характерны 3 фундаментальных свойства, объединяющие все их разновидности:

- отростчатая, древовидная морфология в тканях и наличие псевдоподий и ворсинок (вуалевые клетки) в циркуляции и культуре клеток;
- высокая экспрессия зрелыми клетками молекул МНС не только I, но и II класса в сочетании с костимулирующими молекулами (CD80, CD86);
- способность захватывать (путем пиноцитоза и, в меньшей степени, фагоцитоза) и обрабатывать антиген с последующим его представлением Т-лимфоцитам, что вызывает активацию последних.

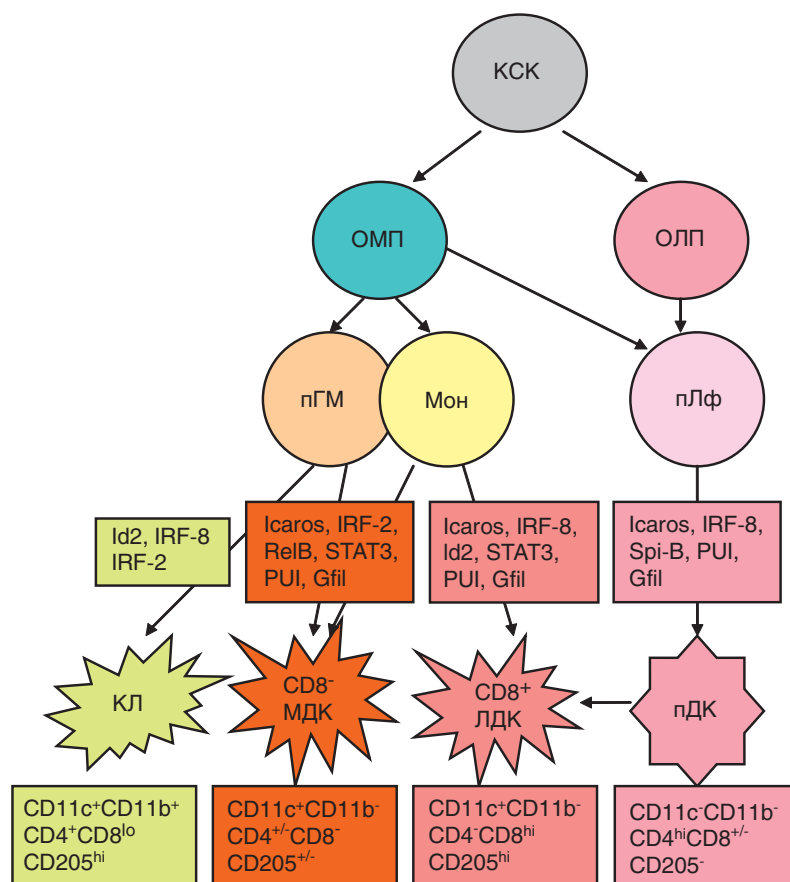
Дендритная морфология не является исключительной особенностью дендритных клеток. Так, в коже мышей присутствуют дендритные Т-лимфоциты, гистогенетически не родственные дендритным клеткам. Только сочетание перечисленных свойств может служить основанием для отнесения клетки к разряду дендритных.

Дендритные клетки происходят от кроветворных стволовых клеток, т.е. имеют костномозговое происхождение. Представления о гистогенезе дендритных клеток объединены на рис. 2.8. Главные особенности развития дендритных клеток:

- дендритные клетки происходят как из миелоидных, так и из лимфоидных предшественников;
- способность к дифференцировке в дендритные клетки присуща представителям этих ростков на разных стадиях их развития. Наряду с этим допускается существование специализированного предшественника дендритных клеток;
- в периферической крови присутствуют дендритные клетки на промежуточных стадиях развития, после чего они мигрируют в ткани;
- по крайней мере для некоторых дендритных клеток характерно перемещение из барьерных тканей в лимфоидные, сопровождающееся их созревaniem.

Большинство дендритных клеток принадлежит миелоидному ряду. В условиях культуры удастся получить миелоидные дендритные клетки двумя способами: путем культивирования клеток костного мозга, обогащенных CD34<sup>+</sup> стволовыми элементами, в присутствии GM-CSF и других цитокинов (чаще всего — TNF $\alpha$ , иногда — IL-3, SCF, FLT3L или TGF $\beta$ ) или при культивировании выделенных из крови моноцитов в присутствии GM-CSF и IL-4. Культивирование моноцитов *in vitro* в присутствии M-CSF приводит к дифференцировке CD14<sup>+</sup> макрофагов, а культивирование в присутствии GM-CSF (для клеток человека — в сочетании с IL-4) — к дифференцировке CD14<sup>+</sup> дендритных клеток. Считают, что и *in vivo* миелоидные дендритные клетки могут развиваться как из гранулоцитарно-моноцитарных предшественников, так и из моноцитов.

Сходным образом происходит развитие лимфоидных дендритных клеток — они дифференцируются из CLP, а также из предшественников В- и Т-лимфоцитов, в частности из тимоцитов на самой ранней стадии их развития в тимусе — DN1 клеток (см. раздел 3.3.2.3). Миелоидные и лимфоидные предшественники дендритных клеток экспрессируют цитокиновый рецептор FLT-3 (*Fms-like tyrosine kinase 3*), что отличает их от предшественников других клеток (в частности моноцитов и лимфоцитов). Таким образом,



**Рис. 2.8.** Схема развития дендритных клеток с указанием мембранного фенотипа (нижние прямоугольники) и дифференцировочных факторов (верхние прямоугольники). КСК — кроветворная стволовая клетка; ОМП — общий миелоидный предшественник; ОЛП — общий лимфоидный предшественник; пГМ — гранулоцитарно-моноцитарный предшественник; пГ — предшественник гранулоцитов; пМ — предшественник моноцитов; пТц — претимоцит; пДК — предшественник дендритных клеток; Мон — моноцит, Мф — макрофаг; КЛ — клетки Лангерганса; МДК — миелоидные дендритные клетки; ЛДК — лимфоидные дендритные клетки

обычная дендритная клетка может дифференцироваться из 6–7 клеточных источников в пределах двух гистогенетических рядов.

Незрелые дендритные клетки обоих рядов циркулируют в крови, составляя в сумме менее 0,5% от общего числа лейкоцитов крови. В кровотоке присутствуют предшественники как миелоидных, так и лимфоидных дендритных клеток, а также клеток Лангерганса. Маркерами миелоидных предшественников служат молекулы CD11c и МНС-II.

Преобладающая разновидность циркулирующих в крови незрелых дендритных клеток — плазматоидные дендритные клетки, относящиеся к лимфоидному ряду. Их название обусловлено внешним сходством с плазматичес-

кими клетками — потомками В-лимфоцитов, секретирующими антитела. Плазмоцитоидные дендритные клетки меньше моноцитов (8–10 мкм), а их ядро имеет менее выраженную выемку. В присутствии IL-3 и бактериальных продуктов они дифференцируются в зрелые лимфоидные дендритные клетки. На плазмоцитоидных клетках человека отсутствуют молекулы, характерные для миелоидных дендритных клеток (CD83, CD11b, CD11c), а также свойственные большинству миелоидных клеток — CD13 и CD14. Однако в них экспрессирован ген **RAG**, ответственный за запуск перестройки генов антигенраспознающих рецепторов (см. раздел 3.1.4.1) и выражены признаки перестройки генов TCR, характерные для Т-клеток (пре-T $\alpha$ ). Если для моноцитов характерна экспрессия CD45RA и рецептора для GM-CSF, то для плазмоцитоидных клеток — CD45R0 и рецептора для IL-3. Молекулы MHC-II на плазмоцитоидных клетках экспрессированы слабее, чем на миелоидных, и локализуются не только на поверхности, но и в цитоплазме. В спектре TLR (см. раздел 2.2.1), экспрессируемых плазмоцитоидными дендритными клетками, преобладают рецепторы, локализующиеся в цитоплазматических гранулах и распознающие нуклеиновые кислоты. Плазмоцитоидные дендритные клетки — главные источники интерферонов типа I ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$  — см. раздел 2.5.6.1) синтез которых запускается в ответ на распознавание TLR специфического паттерна. Это определило их альтернативное название — клетки-продуценты интерферона (IPC — от *Interferone-producing cells*). Они секретируют большие количества этих цитокинов преимущественно в 1-е сутки после стимуляции вирусными нуклеиновыми кислотами.

Не достигнув полной зрелости, миелоидные и лимфоидные дендритные клетки мигрируют в ткани. Этому способствует наличие на поверхности этих клеток хемокиновых рецепторов практически ко всем  $\beta$ -хемокинам. Дендритные клетки широко представлены в различных органах и тканях, однако они присутствуют в них в малом количестве, что и послужило причиной их позднего открытия. По аналогии с макрофагами тканевые дендритные клетки иногда разделяют на резидентные (стационарные) и воспалительные. Резидентные дендритные клетки присутствуют преимущественно в барьерных тканях — коже и слизистых оболочках. Известно несколько разновидностей этих клеток, формирующихся под влиянием микроокружения — дендритные клетки дермы, эпидермиса, слизистой оболочки кишечника, слизистой оболочки легких.

Эпидермальные дендритные клетки обладают наибольшим своеобразием. Большинство из них представлено клетками Лангерганса, относящимися к миелоидному ряду. Эти клетки были описаны гистологами в конце XIX века как отростчатые клетки эпидермиса (по современной гистологической классификации — белые отростчатые эпидермоциты), но их природа и связь с иммунными процессами была установлена только в результате их изучения как дендритных клеток. Клетки Лангерганса имеют ряд существенных особенностей, отличающих их от других дендритных клеток. Прежде всего это присутствие в цитоплазме слоистых включений — гранул Бирбека. На поверхности клеток Лангерганса присутствует лектиновый рецептор лангерин (CD208) и «неклассическая» молекула MHC — CD1a, предназначенная для презентации липидных антигенов. Лангерин присутствует уже на циркулирующих предшественниках этих клеток. Гистогенез клеток Лангерганса до

конца не выяснен. В настоящее время считают, что они развиваются местно из предшественников дендритных клеток, мигрирующих из костного мозга.

В условиях воспаления дендритные клетки барьерных тканей интенсивно поглощают (путем пино- или фагоцитоза) окружающий материал, в том числе чужеродные продукты; активируются патогенами (точнее «образами патогенности» — PAMP, представленными на поверхности патогенов) и подвергаются действию провоспалительных цитокинов. Под влиянием этих стимулов незрелые дендритные клетки покидают ткани и с тканевой жидкостью через лимфатические сосуды поступают в региональные лимфатические узлы. В процессе миграции происходит созревание дендритных клеток: их способность к эндоцитозу значительно ослабевает; они осуществляют переработку поглощенного материала и встраивают пептидные фрагменты белков в молекулы MHC (см. раздел 3.2.2.2); на поверхности клеток усиливается экспрессия молекул MHC-II и костимулирующих молекул CD80 и CD86. Усиленная экспрессия MHC-II, CD80 и CD86 способствует выполнению дендритными клетками их основного назначения — презентации антигенных пептидов Т-лимфоцитам. В ходе миграции изменяется набор экспрессируемых дендритными клетками мембранных рецепторов для хемокинов, что способствует попаданию их в зоны лимфатических узлов, занимаемые Т-лимфоцитами (Т-зоны). Вместо рецепторов для хемокинов, экспрессируемых клетками барьерных тканей, на созревающих дендритных клетках появляются рецепторы CCR7 и CXCR4. Именно эти рецепторы распознают хемокины, выделяемые стромальными клетками Т-зон лимфатических узлов. Рецепторы CCR7 и CXCR4 экспрессируют также наивные Т-лимфоциты, в результате чего они тоже мигрируют в Т-зоны лимфатических узлов. В Т-зонах происходит презентация антигена (см. раздел 3.5.1). Зрелые дендритные клетки, доставившие антиген в лимфатический узел, становятся частью стромы Т-зон и обозначаются как интердигитальные дендритные клетки, поскольку между их отростками-«пальцами» располагаются Т-лимфоциты. Сходное происхождение имеют интердигитальные клетки Т-зон пейеровых бляшек и селезенки, хотя пути миграции клеток в эти структуры иные (не лимфогенные).

Резидентные миелоидные дендритные клетки также заселяют органы на стадии незрелых и даже клеток-предшественников. Завершая свое развитие местно, они уже не покидают орган. Тканевое микроокружение достаточно сильно влияет на их свойства (сходно с резидентными макрофагами и тучными клетками). Многие из них сосредоточены в лимфоидных органах. Различают дендритные клетки тимуса, зародышевых центров, маргинальной зоны селезенки, печени и т.д.

Судьба плазмцитоподобных дендритных клеток в процессе и после их миграции в лимфоидные органы также изучена достаточно подробно. В отличие от предшественников миелоидных дендритных клеток, попадающих в лимфатические узлы с афферентной лимфой, плазмцитоподобные дендритные клетки проникают в лимфатические узлы тем же путем, что и Т-лимфоциты — через высокий эндотелий посткапиллярных венул. При стимуляции (вирусами или IL-3) плазмцитоподобные дендритные клетки в течение первых суток интенсивно секретируют интерфероны I типа, а затем в течение вторых суток дифференцируются в зрелые лимфоидные дендрит-

ные клетки. При этом на них значительно возрастает экспрессия молекул МНС-II, появляются костимулирующие молекулы CD80 и CD86. Клетка продолжает секретировать интерфероны, но в меньшем количестве. При стимуляции вирусами созревающая дендритная клетка способствует дифференцировке Т-клеток-продуцентов  $\text{IFN}\gamma$  (Th1-клеток), а при стимуляции IL-3 — Т-клеток — продуцентов IL-4 (Th2-клеток).

Наибольшие возможности для анализа структуры популяции дендритных клеток дает изучение мембранного фенотипа клеток методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител. Как уже отмечалось, характерная и функционально значимая особенность мембранного фенотипа зрелых дендритных клеток — присутствие на их мембране значительного количества молекул МНС-II (МНС-I присутствуют в более ограниченном количестве), а также костимулирующих молекул CD80 и CD86. Именно этот набор молекул делает дендритные клетки АПК. Во взаимодействии с Т-лимфоцитами (при получении от них стимулирующего сигнала) участвует мембранная молекула дендритных клеток CD40. Общий маркер миелоидных дендритных клеток и у человека, и у мыши — CD11c, т.е.  $\alpha_{\chi}\beta_2$  (CD11c/CD18). Маркер зрелых миелоидных дендритных клеток — CD83. Из данных о центральной роли GM-CSF в качестве фактора роста дендритных клеток следует, что присутствие на их поверхности рецептора этого фактора (CD116) является обязательным. Данные о характерных молекулах и маркерах дендритных клеток и их субпопуляций представлены на рис. 2.6 и 2.9, а также в табл. 2.7 (в сопоставлении с моноцитами).

**Таблица 2.7.** Свойства дендритных клеток типов DC1 и DC2

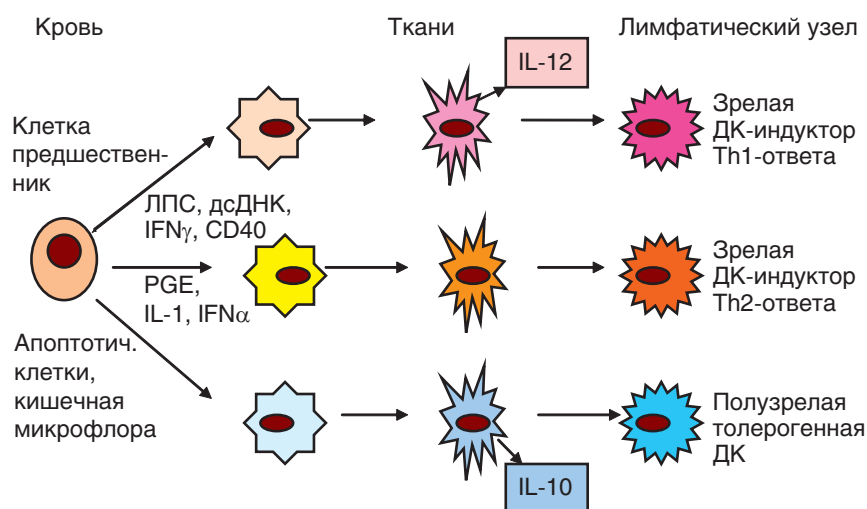
Характеристика	DC1	DC2
Гистогенез	Миелоидные	Лимфоидные
Индукцирующие цитокины	IL-12, $\text{IFN}\gamma$	IL-10
Фенотип	$\text{CD11c}^{\text{hi}} \text{CD123}^{\text{lo}}$	$\text{CD11c}^{-} \text{CD123}^{\text{hi}}$
Продуцируемые цитокины	IL-12	$\text{IFN}\gamma$
Влияние на Т-клетки	Активация	Индукция анергии

У мышей анализ субпопуляций дендритных клеток облегчает определение экспрессии молекул CD8 и CD4 (обычно рассматриваемых как корецепторы Т-клеток), характеризующих их основные субпопуляции. CD8 маркирует значительную часть лимфоидных дендритных клеток мыши. На некоторых  $\text{CD8}^{-}$  клетках экспрессирована молекула CD4. Для различения субпопуляций дендритных клеток используют также определение лектиновых рецепторов — DEC-205 (CD205) и лангерина (CD208), а также молекулы CD11b —  $\alpha_{\text{M}}\beta_3$  (Mac-1). По наличию и степени экспрессии этих маркеров у мышей выделяют 5 субпопуляций дендритных клеток: лимфоидные ( $\text{CD4}^{+} \text{CD8}^{\text{hi}} \text{CD205}^{\text{hi}} \text{CD11b}^{-}$ ); 3 субпопуляции миелоидных дендритных клеток ( $\text{CD4}^{+} \text{CD8}^{-} \text{CD205}^{-} \text{CD11b}^{+}$ ,  $\text{CD4}^{-} \text{CD8}^{-} \text{CD205}^{-} \text{CD11b}^{+}$  и  $\text{CD4}^{-} \text{CD8}^{-} \text{CD205}^{+} \text{CD11b}^{+}$ ) и клетки Лангерганса ( $\text{CD4}^{-} \text{CD8}^{\text{lo}} \text{CD205}^{\text{hi}} \text{CD11b}^{+}$ ). Изучение распределения этих субпопуляций в лимфоидных органах показало, что в тимусе присутствуют преимущественно лимфоидные (но есть и

миелоидные) дендритные клетки. В селезенке и брыжеечных лимфатических узлах преобладают (в разных соотношениях) субпопуляции миелоидных клеток. В лимфатических узлах, дренирующих кожу, наряду с миелоидными дендритными клетками, высоко содержание клеток Лангерганса. Пока не вполне ясно, являются ли зрелые клетки, развивающиеся из плазмоцитоидных дендритных клеток, единственными лимфоидными дендритными клетками вторичных лимфоидных органов или же часть клеток этой популяции может развиваться из других источников.

У человека CD4 присутствует на некоторых дендритных клетках (делая их одной из мишеней ВИЧ), тогда как CD8 на них отсутствует. В связи с отсутствием экспрессии молекулы CD8 для характеристики мембранного фенотипа субпопуляций дендритных клеток человека используют частично другие маркеры. Для миелоидных дендритных клеток человека характерен фенотип —  $CD11c^+ CD11b^+ CD45R0^{hi}$ , для лимфоидных дендритных клеток —  $CD11c^+ CD11b^- CD45R0^{lo}$ , для клеток Лангерганса —  $CD11c^+ CD207^+$ .

В настоящее время в качестве конечных продуктов дифференцировки миелоидных и лимфоидных дендритных клеток (особенно у человека) рассматривают соответственно субпопуляции DC1 и DC2 (табл. 2.7). Наиболее характерные отличительные черты этих клеток — особенности экспрессии молекул CD11c и рецептора для IL-3 — CD123: миелоидные клетки DC1 имеют фенотип  $CD11c^{hi} CD123^{lo}$  (выявлена минорная разновидность миелоидных дендритных клеток с фенотипом  $CD11c^{lo} CD123^+$ ), а лимфоидные DC2 —  $CD11c^- CD123^{hi}$ . В периферической крови содержится по 0,2% клеток DC1 и DC2. Дифференцировка DC1 и DC2 может регулироваться действием на клетки-предшественники различных комбинаций провоспалительных и противовоспалительных факторов (рис. 2.9). DC1-клетки обладают сильной



**Рис. 2.9.** Зависимость функционального потенциала дендритных клеток от условий их дифференцировки *in vitro*. Около стрелок, отходящих от «клетки-предшественницы», указаны факторы, определяющие дифференцировку дендритных клеток в указанных направлениях

способностью активировать Т-лимфоциты при презентации антигена, а также индуцируют дифференцировку Th1-клеток (см. раздел 3.5.3.1). В то же время DC2-клетки при презентации антигена направляют дифференцировку Т-клеток по Th2-пути. И наконец, можно получить дендритные клетки, избирательно индуцирующие регуляторные Т-клетки, т.е. являющиеся толерогенными (см. раздел 4.3.2.2).

### **2.1.7. Клетки, вовлекаемые в иммунные процессы при воспалении**

Важная особенность функционирования системы врожденного иммунитета — способность вовлекать в развитие реакций, помимо «профессиональных» клеток иммунной системы, клетки других типов, прежде всего сосудистого эндотелия, эпителии слизистых оболочек, кожи, печени и т.д. Для вовлечения в реакции эти клетки должны быть активированы под влиянием стимулов двух типов:

- патогенов и выделяемых ими продуктов;
- провоспалительных цитокинов и других продуктов активированных клеток иммунной системы, прежде всего макрофагов.

В распознавании микроорганизмов и их продуктов участвуют специализированные патогенраспознающие рецепторы (в первую очередь TLR), экспрессируемые на покоящихся клетках сосудистого эндотелия. Так, показано присутствие TLR-2, TLR-4 и других рецепторов, распознающих РАР на эпителиальных и эндотелиальных клетках. На эндотелиальных и многих эпителиальных клетках конститутивно (спонтанно) экспрессированы рецепторы для цитокинов, например для IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8 и других.

В ответ на связывание соответствующих цитокинов эндотелиальные и эпителиальные клетки активируются и приобретают некоторые черты клеток врожденного иммунитета, особенно макрофагов: они экспрессируют молекулы адгезии (ICAM-1, ICAM-3, селектины и их рецепторы и другие молекулы); секретируют провоспалительные цитокины (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ); колониестимулирующие факторы и хемокины; приобретают способность к фагоцитозу благодаря экспрессии Fc $\gamma$ -рецепторов и рецепторов для компонента, а также некоторых факторов, обеспечивающих бактерицидность. Наконец, эти клетки экспрессируют молекулы МНС-II и костимулирующие молекулы (CD40, CD80, CD86), что придает им свойства АПК и позволяет «вести диалог» с клетками иммунной системы. Все перечисленные свойства выражены значительно слабее, чем у макрофагов. Тем не менее, они обеспечивают участие этих клеток в защитных реакциях врожденного иммунитета и (пусть и в ограниченном масштабе) позволяют выполнять роль АПК для клеток памяти.

Таким образом, вовлечение различных типов клеток существенно расширяет сферу действия провоспалительных факторов и увеличивает защитный потенциал организма. После завершения воспалительной реакции и прекращения стимуляции со стороны клеток врожденного иммунитета эти «факультативные» иммунocyты утрачивают свои макрофагоподобные свойства и восстанавливают исходный фенотип и свойственные им функции.

## 2.2. РАСПОЗНАВАНИЕ ЧУЖОГО В СИСТЕМЕ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

До конца 80-х годов прошлого столетия предполагали, что узнавание чужого состоит в распознавании индивидуальных молекул (антигенов) рецепторами лимфоцитов. Считалось, что миелоидные клетки не отличают «свое» и «чужое» и уничтожают любые клетки, не обладающие механизмами защиты от фагоцитоза. Новые представления о распознавании в системе врожденного иммунитета были сформированы в рамках концепции Ч. Дженеуэя (*Ch. Janeway*) о взаимодействии врожденного и адаптивного иммунитета. Основой этих представлений, разработанных Ч. Дженеуэем совместно с Р. Меджитовым, стало понятие «распознавания паттернов». Оно означает распознавание не индивидуальных молекул или химических групп, а общих структурных особенностей, свойственных группам молекул. Эти особенности обозначают практически непереводаемым английским словом **pattern (паттерн)**, в качестве эквивалента которого Р. Меджитов предлагает русское слово «образ». При этом имеется в виду, что многоклеточные организмы распознают «образы» во-первых — чужеродных, во-вторых — опасных микроорганизмов-патогенов. Такие структуры можно назвать образами патогенности, или патогенассоциированными молекулярными паттернами (буквальный перевод оригинального словосочетания — *Pathogen-associated molecular pattern* — РАРМ).

Главные особенности РАРМ: чужеродность (не столько для данного организма, сколько для вида, к которому он принадлежит), связь с патогенностью микроорганизмов и консервативность. Эта комбинация свойств создает для иммунной системы возможность, распознавая ограниченное число молекул, выявлять опасность, представляемую организмом-носителем РАРМ, задолго до ее реального проявления.

В главе 1 уже были сопоставлены наиболее фундаментальные свойства рецепторов врожденного и адаптивного иммунитета (см. табл. 1.3). В результате этого сопоставления можно заключить, что распознавание паттернов, сформированное в процессе длительной эволюции, организовано более просто, надежно и менее опасно (не возникают ошибки, приводящие к аутоагрессии), чем распознавание антигенов. Однако распознавание паттернов не приводит к формированию иммунологической памяти. Учение о распознавании паттернов охватывает, наряду с новыми, недавно открытыми сведениями о паттернраспознающих рецепторах, некоторые давно известные данные о рецепторах и гуморальных факторах врожденного иммунитета (например, компонентах комплемента, белках острой фазы и т.д.).

В рамках такого расширенного толкования распознавания паттернов рецепторы врожденного иммунитета разделяют на 3 группы — мембранные, внутриклеточные (цитозольные) и секретируемые (табл. 2.8). Первые — клеточные рецепторы в традиционном понимании, обеспечивающие не только распознавание РАРМ, но и немедленное «оповещение» о произошедшем распознавании (т.е. передачу сигнала внутрь клетки). Внутриклеточные рецепторы — как цитозольные, так и расположенные на мембранах цитоплазматических гранул, выполняют сходную функцию, взаимодействуя не с внеклеточными, а с внутриклеточными патогенами и их РАРМ. Растворимые

рецепторы распознают РАРР, связываясь с ними на поверхности патогенов. Такие комплексы распознаются клетками врожденного иммунитета.

**Таблица 2.8.** Классификация паттернраспознающих рецепторов

Типы и виды рецепторов	Лиганды	Функции
<b>Мембранные</b>		
Толл-подобные рецепторы (TLR 1–11)	Образы патогенности (РАРР)	Активация клеток врожденного иммунитета
С-лектины	Углеводные остатки	Интернализация
<i>Scavenger</i> -рецепторы («мусорщики»)	Липопротеины, липополисахарид, липотейхоевая кислота, апоптотические клетки	Интернализация
Интегрины	Рецепторы из суперсемейства иммуноглобулинов, белки межклеточного матрикса	Адгезия, подвижность
<b>Внутриклеточные</b>		
NOD-подобные (NLR)	Пептидогликаны	Активация клеток врожденного иммунитета
RIG-подобные (RLR)	РНК	То же
DAI	ДНК	То же
<b>Растворимые (секретируемые)</b>		
Пентраксины	РАРР, иммуноглобулины, компонент комплемента C1q, полиэлектrolиты, белки межклеточного матрикса, гепарин, гистоны	Активация комплемента, хемотаксис
Коллектины	Fc-Ig, углеводные остатки	Активация комплемента
Компоненты системы комплемента	Белки и полисахариды	Опсонизация, цитолиз, хемотаксис и т.д.
Фиколины	TGF-β, мембранные белки, полисахариды	Опсонизация

### 2.2.1. Toll-подобные рецепторы

Открытие толл-подобных рецепторов связано с созданием новой концепции врожденного иммунитета и формированием учения о распознавании во врожденном иммунитете. Толл-рецепторы впервые были описаны у дрозофилы как продукты генов, ответственных за формирование дорзо-вентральной ориентации тела (термин «Toll» восходит к соответствующему немецкому междометию). Впоследствии выяснили, что мутации соответствующих генов приводят к утрате устойчивости дрозофил к грибковым заболеваниям. Вскоре Р. Меджитов и соавт. обнаружили у млекопитающих гомологи генов *Toll* и их продукты — рецепторы. Рецепторы были названы толл-подобными (TLR — *Toll-like receptor*). Последующее активное изучение TLR выявило их роль в качестве рецепторов врожденного иммунитета.

TLR — эволюционно консервативные и очень древние молекулярные структуры (модули, составляющие их основу, выявляют у растений и низших многоклеточных животных). Эти рецепторы экспрессированы на поверхности и в цитоплазматических гранулах различных клеток организма. Больше всего TLR различных типов экспрессируют миелоидные клетки, прежде всего моноциты и макрофаги. В настоящее время не известны все лиганды TLR; свойства некоторых TLR изучены не до конца, однако ясно, что суммарная специфичность этих рецепторов охватывает «образы» всех основных групп одноклеточных патогенов и вирусов («образы» многоклеточных паразитов и распостояющиеся их рецепторы пока не найдены). Число вариантов TLR у представителей разных видов невелико — у человека оно составляет 10, у мышей — 11. Различные TLR человека представлены в табл. 2.9.

TLR — трансмембранные гликопротеины I типа (т.е. с NH<sub>2</sub>-концом, направленным наружу клетки). Их молекулярная масса составляет 90–115 кДа. Внеклеточная часть молекул TLR образована доменом, содержащим 19–25 повторяющихся последовательностей — богатых лейцином повторов — LRR (от *Leucine-rich repeats*). Эти последовательности состоят из 24–29 аминокислотных остатков и содержат мотив xxLxLxL (L — лейцин, x — любые другие остатки), а также дополнительные консервативные остатки лейцина (обычно 4–6 остатков в каждой). Этот внеклеточный домен TLR называют LRR-доменом.

**Таблица 2.9.** Характеристика толл-подобных рецепторов человека

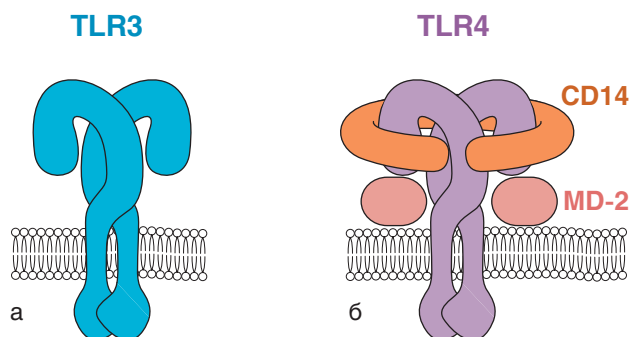
Рецептор	Экзогенные лиганды (патогенассоциированные молекулярные паттерны)	Патогены	Эндогенные лиганды
<b>Мембранные</b>			
TLR-2, TLR-1	Триацил-липopeпептиды, пептидогликан, теиховые кислоты, липотейховые кислоты, зимозан, липоарабиноманнан, порин	Грамположи- тельные бактерии, грибы, микобак- терии, спирохеты, трипаносомы, нейссерии, леп- тоспиры, дрожжи, цитомегаловирус	Белки теплового шока (Hsp70, Hsp96), липопротеины, обра- зы опасности (DAMP)
TLR-1, TLR-6	Диацил-липopeпептиды, пептидогликан, теиховые кислоты, липотейховые кислоты, зимозан, липоарабиноманнан	Грамположи- тельные бактерии, микоплазма	Образы опасности (DAMP)
TLR-4	Липополисахарид, липо- тейховая кислота, таксол, флаволипин, F-белок рес- пираторно-синцитиаль- ного вируса, фимбрии I-го и P-типа	Грамотрицатель- ные бактерии, хламидии, флаво- бактерии, респи- раторно-синцити- альный вирус	Белки теплового шока (Hsp60, Hsp70), β-дефензины, гиалуронан HMGB-1, фибронектин
TLR-5	Флагеллин	Сальмонеллы, жгу- тиковые бактерии	Не описаны
TLR-11	Профилин	Уропатогенная кишечная палочка	Не описаны

Окончание табл. 2.9

Рецептор	Экзогенные лиганды (патогенассоциированные молекулярные паттерны)	Патогены	Эндогенные лиганды
<b>Внутриклеточные</b>			
TLR-3	Двуспиральная РНК, поли(I:C)	Вирусы	Ауто-РНК
TLR-7	Односпиральная РНК вирусов, аналоги нуклеозидов (имидазохинолины), локсорибин, бромиримин	Вирусы	Ауто-РНК, рибонуклеопротеины
TLR-8	Односпиральная РНК вирусов, аналоги нуклеозидов	Вирусы	Ауто-РНК, рибонуклеопротеины, рибонуклеопротеинсодержащие иммунокомплексы
TLR-9	ДНК микроорганизмов и синтетические олигонуклеотиды, содержащие неметилированные CpG-тандемы	Бактерии, вирусы	Ауто-ДНК, хроматин и хроматинсодержащие иммунокомплексы HMGB-1

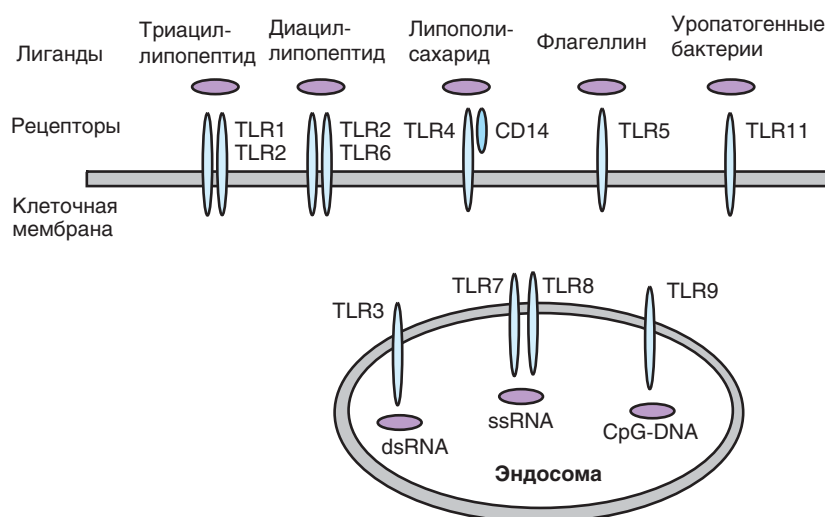
Цитоплазматическая (С-концевая) часть рецептора представлена TIR-доменом (*Toll/IL-1 receptor and resistance domain*), ответственным за взаимодействие с адаптерными молекулами сигнальных путей. TIR-домен состоит из центрального  $\beta$ -слоя (образован 5  $\beta$ -цепями), окруженного 5  $\alpha$ -спиралями. Между LRR- и TIR-доменами расположен короткий трансмембранный участок, отвечающий за выбор типа мембраны (клеточная или лизосомальная) и встраивание в нее. В результате TLR, распознающие паттерны на поверхности бактерий, грибов, простейших, а также продукты жизнедеятельности микроорганизмов (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-11), локализованы на внешней клеточной мембране. Внутри клетки (в эндосомах/лизосомах) расположены TLR, распознающие нуклеиновые кислоты (TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9), при этом их паттернраспознающая часть направлена внутрь гранулы. Важно отметить, что TLR-4 может присутствовать не только на наружной мембране, но и в эндолизосомах.

TLR специфичны к основным группам патогенов, с которыми контактируют многоклеточные организмы — грамположительным (TLR-1, TLR-2, TLR-6, TLR-11) и грамотрицательным бактериям (TLR-4, TLR-5), вирусам (TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9), простейшим и грибам (преимущественно TLR-1, TLR-2, TLR-6). TLR в покоящихся клетках — мономерные молекулы, но при взаимодействии с лигандами они формируют димеры — обычно гомодимеры (рис. 2.10); однако при распознавании грамположительных бактерий и их липидсодержащих компонентов TLR-1, TLR-2 и TLR-6 формируют гетеродимеры состава TLR-2/TLR-1 и TLR-2/TLR-6. Специфичность TLR изучали в опытах с прямым связыванием низкомолекулярных веществ, по структуре аналогичных паттернам патогенов, а также



**Рис. 2.10.** Схема строения Toll-подобных рецепторов: а — гомодимерный вариант без дополнительных полипептидных цепей (TLR-3); б — мультимолекулярный комплекс, включающий, помимо гомодимера, другие сывороточные и мембранные белки (TLR-4)

*in vivo* на нокаутных животных по генам TLR (по исчезновению способности обеспечивать защиту от тех или иных патогенов). Связывающие участки TLR обладают достаточно высоким сродством к лигандам. Эти участки представляют собой подковообразные структуры, наружная часть которых образована  $\alpha$ -спиралями, а внутренняя — связывающая лиганд —  $\beta$ -слоями. Данные о специфичности и локализации TLR человека схематически отражены на рис. 2.11.



**Рис. 2.11.** Схема, отражающая специфичность и локализацию Toll-подобных рецепторов человека. Важно обратить внимание на два типа локализации Толл-рецепторов — на поверхности клетки и в цитоплазматических гранулах (эндосомах); подробности см. в тексте

Чаще всего TLR распознают липидсодержащие структуры, олигонуклеотиды и углеводы; реже всего — белки (например, флагеллин в случае TLR-5). Достаточно сложно происходит образование комплекса при распознавании бактериального ЛПС рецептором TLR-4 (см. рис. 2.10). Для распознавания ЛПС прежде всего требуется его высвобождение из клеточной стенки бактерии, после чего он образует комплекс с сывороточным фактором LBP (*LPS-binding complex* — ЛПС-связывающий комплекс). LBP обладает свойством к мембранной молекуле CD14, что обеспечивает взаимодействие с ней комплекса ЛПС–LBP. Затем этот комплекс (уже прикрепленный к мембране через липид А, входящий в состав ЛПС) связывается с внутренней (гидрофобной) поверхностью молекулы MD2, своей наружной поверхностью взаимодействующей с внутренней поверхностью «подковы» TLR-4 (т.е. фактически TLR-4 распознает не ЛПС, а MD2). Сходная роль корцепторных молекул выявлена при распознавании паттернов TLR-2; в этом случае в качестве корцепторов выступают молекулы CD14, CD36 и интегрин  $\alpha_5\beta_3$  (витронектин). По-видимому, для распознавания паттернов TLR необходимо участие дополнительных молекул.

Некоторые TLR распознают нуклеиновые кислоты и структуры, сходные с нуклеотидами, что важно для распознавания как вирусов, так и бактерий. Так, TLR-3 распознает двуспиральную РНК, характерную для большинства вирусов, а TLR-9 — участки ДНК, обогащенные неметилированными последовательностями CpG (*Cytidine-Phosphate-Guanosine* — цитидин-фосфат гуанозин), характерными для ДНК бактерий. TLR-7 и TLR-8 обладают свойством к имидазолиновым и гуанозиновым производным (например, при взаимодействии с ними TLR-7 мобилизуется противовирусная защита). Учитывая структурное родство этих производных с вирусной ДНК, считают, что TLR-7 и TLR-8 участвуют в распознавании односпиральной вирусной РНК. Все 4 типа TLR, распознающих нуклеиновые кислоты (TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9), локализованы внутри клетки (см. рис. 2.11). В связи с особенностями структуры трансмембранного участка этих TLR они представлены только на мембране эндоплазматического ретикулума, но не на плазмолемме. При эндоцитозе материала, содержащего РАРР, происходит мобилизация TLR из мембраны ретикулума в мембрану фаголизосомы, где они распознают паттерны и передают сигнал внутрь клетки. Локализация TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9 не на поверхности клетки, а в фаголизосоме предохраняет от распознавания собственных нуклеиновых кислот, что чревато развитием аутоиммунной патологии. Собственные ДНК или РНК попадают в фаголизосомы только при усиленном апоптозе. Кроме того, нуклеиновые кислоты, расположенные внутри вирусов и бактерий, становятся доступными для рецепторов только в фаголизосомах, где происходит разрушение патогенов. Экспрессия TLR на клетках врожденного иммунитета описана в табл. 2.10.

В результате распознавания лигандов TLR генерируется активационный сигнал. Решающую роль при этом играет внутриклеточный TIR-домен, а также связанные с ним адапторные молекулы. Процесс передачи сигнала от TLR будет рассмотрен в контексте активации клеток врожденного иммунитета (см. раздел 2.2.4).

Таблица 2.10. Экспрессия Толл-подобных рецепторов на клетках иммунной системы

Рецептор	Типы клеток									Влияние активации на экспрессию
	Моноциты и макрофаги	Нейтрофилы	Эозинофилы	Тучные клетки	Дендритные клетки	Естественные киллеры	В-клетки	Т-клетки	Естественные регуляторные Т-клетки	
TLR-1	+	+	+	+	+(М, П)	+	+	+	+	Конститутивная экспрессия на всех клетках
TLR-2	++	++	—	+	++(М)	—	—	—	+	Усиление под влиянием патогенассоциированных молекулярных паттернов и цитокинов
TLR-3	++/+*	—	—	—	++(М)	++	—	+	—	Нет усиления
TLR-4	++	++	+	+	++(М)	+	—	—	+	Усиление под влиянием патогенассоциированных молекулярных паттернов и цитокинов
TLR-5	++	+	—	—	+(М)	+	+	—	+	Нет усиления
TLR-6	++	+	—	+	+(М, П)	+	+	++	+	То же
TLR-7	+	+	+	—	+(П)	—	—	+	+	Усиление под влиянием цитокинов
TLR-8	++	+	—	—	+(М)	+	+	—	+	Усиление под влиянием IFN $\gamma$
TLR-9	+	+	+	—	+(П)	+	—	+	—	То же
TLR-10	+	+	+	—	+	—	—	+	—	Нет усиления

М — миелоидные;

П — плазмцитотидные;

\* — сильная экспрессия на моноцитах, более слабая на макрофагах.

### 2.2.2. Лектиновые и другие мембранные паттернраспознающие рецепторы

Выделяют еще 3 группы мембранных рецепторов, участвующих в распознавании РAMP — *scavenger*-рецепторы (рецепторы-мусорщики), интегрины и С-лектиновые рецепторы. Много разновидностей этих рецепторов представлено на миелоидных клетках (особенно на макрофагах), а на дендритных клетках, помимо *scavenger*-, экспрессированы также С-лектиновые рецепторы.

*Scavenger*-рецепторы SR-I и SR-II открыли при изучении атерогенеза как рецепторы, распознающие модифицированные липопротеины низкой плотности. Затем стала известна их роль в элиминации видоизмененных аутологичных субстанций и апоптотических клеток. *Scavenger*-рецепторы — трансмембранные молекулы, в состав которых входят богатые цистеином домены, коллагеновые домены и домен, состоящий из  $\alpha$ -спиралей. Эти рецепторы экспрессированы на макрофагах и некоторых дендритных клетках. Лигандами для *scavenger*-рецепторов служат компоненты некоторых микроорганизмов: стафилококков,

нейссерий, листерий (при «выключении» генов рецепторов-мусорщиков нарушается защита организма от этих патогенов). Со *scavenger*-рецепторами сходны паттернраспознающие молекулы: адгезивная молекула MARCO, маркер моноцитов/макрофагов CD14, присоединенный к мембране через гликозилфосфатидилинозитол (о нем уже упоминалось выше в связи с распознаванием TLR ЛПС и других липидсодержащих веществ), а также CD36 — молекула, участвующая в фагоцитозе клеток, погибших по механизму апоптоза.

Интегрины — классические молекулами адгезии, они более детально будут рассмотрены в разделе 2.3.1.2). Интегрины включают в группу рецепторов врожденного иммунитета, поскольку некоторые из них проявляют активность рецепторов комплемента. Так, например,  $\beta_2$ -интегрины CD11b/CD18 ( $\alpha_M\beta_2$ ) и CD11c/CD18 ( $\alpha_X\beta_2$ ) являются рецепторами для C3b (соответственно CR3 и CR4).

Лектиновые рецепторы (табл. 2.11) широко представлены на поверхности миелоидных клеток, особенно с хорошо выраженной способностью к пино- и фагоцитозу. Эти рецепторы имеют два функционально важных свойства:

- обладают сродством к сахаридным остаткам (распознавание паттерна);
- участвуют в интернализации (поглощении) распознанной молекулы (реакция клетки на распознавание паттерна).

**Таблица 2.11.** Характеристика лектиновых рецепторов миелоидных клеток

Название	Структурные особенности	Зависимость от $\text{Ca}^{2+}$	Специфичность	Клеточная локализация
Маннозный рецептор (CD206)	Тип I, 8 CTLD	+	Манноза, глюкоза, N-ацетилглюкозамин	Незрелые миелоидные дендритные клетки, моноциты, макрофаги
DEC-205 (CD205)	Тип I, 10 CTLD, кластер интернализации	+	?	Незрелые миелоидные дендритные клетки, плазматоидные дендритные клетки, клетки Лангерганса
DC-SIGN (CD209)	Тип II, 1 CTLD, кластер интернализации	+	Манноза, фукоза	Незрелые миелоидные дендритные клетки, зрелые миелоидные дендритные клетки, моноциты, макрофаги, Т-клетки
Лангерин (CD207)	Тип II, CTLD	+	Манноза	Клетки Лангерганса
Дектин-1	Тип II, 1 CTLD, ITAM, кластер интернализации	—	$\beta$ -глюкан	Незрелые миелоидные дендритные клетки, плазматоидные дендритные клетки, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, Т-клетки
Дектин-2	Тип II, 1 CTLD	+	Манноза	Дендритные клетки, клетки Лангерганса

CTLD — С-лектиноподобный домен (*C-type lectin-like domain*);

ITAM — последовательность, ответственная за активацию клетки (*Immunoreceptor tyrosine-related activation motif*).

Этими свойствами С-лектиновых рецепторов (CL-рецепторов) объясняют особенности их клеточного распределения: их экспрессируют преимущественно активно пиноцитирующие (незрелые миелоидные дендритные клетки) и фагоцитирующие (моноциты и макрофаги) миелоидные клетки. Созревание миелоидных дендритных клеток сопровождается потерей большей части С-лектиновых рецепторов с одновременным ослаблением интенсивности эндоцитоза.

Из 17 групп С-лектинов роль паттернраспознающих рецепторов играют лектины 4 групп:

- дектин-2, лангерин, DC-SIGN (группа II);
- коллектин — маннозосвязывающий белок, сурфактантные белки А и D (группа III);
- дектин-1 (группа V);
- макрофагальный маннозный рецептор, DEC-205 (группа VI).

В табл. 2.11 отражены свойства наиболее важных представителей этой группы рецепторов. Все они содержат С-лектиноподобный домен — CTLD (*C-type lectin-like domain*). Большинство этих рецепторов относят к С-лектинам (они связывают углеводы в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ ); однако некоторые являются Са-независимыми лектинами, несмотря на наличие С-лектиноподобного (например, дектин-1, относящийся к NK-подобным рецепторам). Число С-лектиноподобных доменов варьирует от 1 до 10. Присутствие в молекуле таких доменов не гарантирует их способность распознавать углеводы (например, для рецептора дендритных клеток DEC-205 способность узнавать углеводные остатки не доказана). Иногда рецепторы при распознавании углеводных остатков ди- и олигомеризируются. Чаще всего С-лектиновые рецепторы распознают остатки маннозы, реже — фукозы, N-ацетилглюкозамина и глюкозы. Молекулы, содержащие перечисленные остатки, выступают в данном случае в роли PAMP. Специфичность рецепторов обусловлена их способностью распознавать различные участки разветвленных углеводных структур. Сиалированные остатки сахаров рассматриваемые рецепторы не распознают. Это очень важно, поскольку большинство мембранных гликоконъюгатов у позвоночных сиалировано. Таким образом, С-лектиновые рецепторы миелоидных клеток распознают преимущественно полисахариды и гликоконъюгаты микроорганизмов, что обеспечивает их поглощение.

Основная роль С-лектиновых рецепторов — участие в интернализации (поглощении) и расщеплении молекул. Для выполнения этой функции важны «мотивы интернализации», т.е. последовательности, облегчающие эндоцитоз комплексов, формирующихся при связывании молекул С-лектиновыми рецепторами. В большинстве С-лектиновых рецепторов (DEC-205, DC-SIGN, дектин-1 и др.) эту функцию выполняют дилейциновый мотив и триацидный кластер. Эти мотивы обеспечивают интернализацию до поздних эндосом и МНС-II-содержащих эндосом. Рецепторы, имеющие тирозинсодержащий мотив, например MR, обеспечивают интернализацию только до стадии ранних эндосом и быстро рециклируют. Передача в клетку активационных сигналов не входит в обязательные функции С-лектиновых рецепторов: только один из углеводраспознающих рецепторов — дектин-1 — содержит активационный мотив ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) и способен участвовать в активации клетки.

### 2.2.3. Цитоплазматические паттернраспознающие рецепторы

Паттернраспознающие рецепторы присутствуют не только на мембранах клетки и внутриклеточных гранул, но и в цитозоле. Такая локализация характерна для рецепторов группы NLR (*NOD-like receptor*; *NOD* — *Nucleotide-oligomerizing domain*), в которую входят белки NOD1, NOD2, NALP1, NALP3, IPAF. Эти белки относят к большому семейству CLR (*CARD, leucine-rich*; *CARD* — *Caspase recruitment domain*), или CATERPILLER, к которому принадлежат также защитные R-белки растений. Белки этого семейства имеют сходную структуру. N-концевую позицию в них занимает один или несколько доменов семейства CARD (оно имеет отношение к активации каспазы 1, участвующей в процессинге провоспалительных цитокинов семейства IL-1 — см. раздел 2.5.5.5). Затем следует домен NOD, ответственный за олигомеризацию молекулы. С-концевая часть молекулы образована доменом LRR (богатый лейциновыми повторами), уже упоминавшимся при описании TLR.

Способность NLR распознавать лиганды связывают с доменом LRR. Рецепторы этой группы обладают родством к пептидогликанам клеточной стенки микроорганизмов. Минимальная распознаваемая структура для рецептора NOD2 — мурамилдипептид MurNAc—L-Ala— $\gamma$ -D-Glu, входящий в состав клеточной стенки как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. NOD1 распознает мурамилпептиды с концевой мезодиаминопимелиновой кислотой (meso-DAP), представленной только в пептидогликанах грамотрицательных бактерий. Считают, что NLR распознают пептидогликаны, поступившие в цитозоль после фагоцитоза и расщепления микроорганизмов. Передача сигнала о связывании пептидогликана происходит через CARD-домен, однако для этого требуется его предварительная олигомеризация с участием домена NOD. Рецепторы NALP и IPAF участвуют в формировании инфламмосомы, в которой активируется каспаза 1.

В цитозоле присутствуют также рецепторы, распознающие чужеродную РНК, — RLR (*RIG-like receptors*). В RLR семейство входят молекулы RIG-I и MDA5. Их функция состоит в индукции синтеза интерферонов I типа в ответ на распознавание вирусной РНК (двуспиральной РНК, а рецептором RIG-I — также и односпиральной РНК, несущей 5'-трифосфатную группу). В распознавании участвует С-концевой РНК-хеликазный домен рецептора, а N-концевой домен CARD задействован в выработке сигнала. RLR присутствуют в разных типах клеток за исключением плазмоцитоподобных дендритных клеток, распознающих вирусную РНК исключительно с помощью TLR. Описан также цитозольный рецептор, распознающий чужеродную ДНК — DAI (*DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors* — ДНК-зависимый активатор регуляторных факторов интерферона).

Растворимые внеклеточные патогенраспознающие молекулы (коллектины, пентраксины, фиколины) будут рассмотрены при описании гуморальных факторов врожденного иммунитета (см. раздел 2.5).

### 2.2.4. Активация клеток врожденного иммунитета

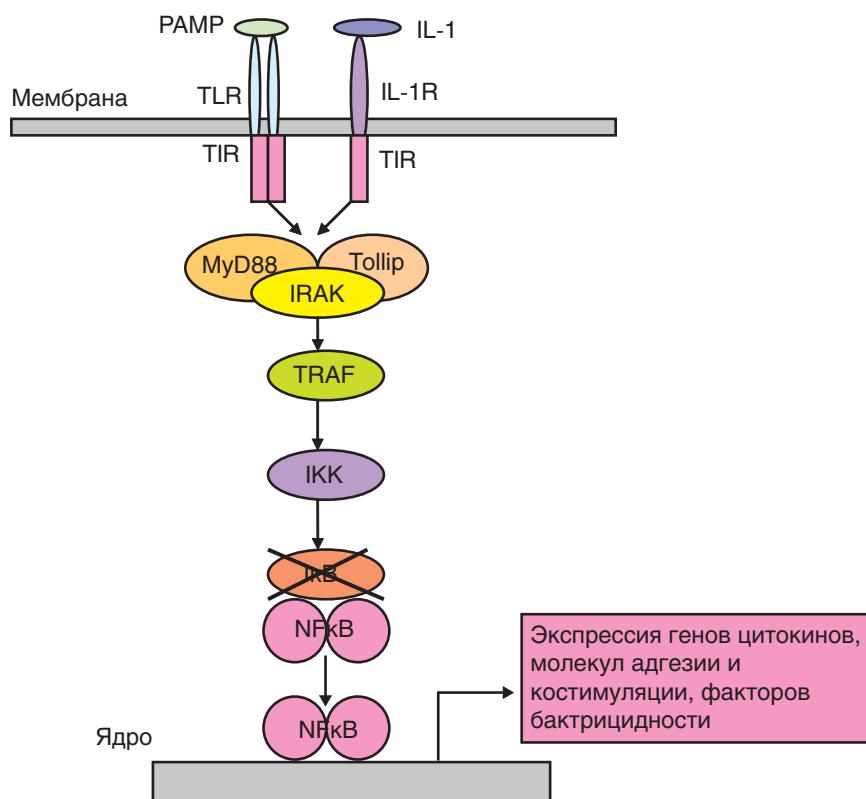
Распознавание PAMP подготавливает клетки врожденного иммунитета к выполнению их основной функции — удалению чужеродных агентов из внутренней среды организма. При этом происходит экспрессия ряда генов,

появляются отсутствовавшие на покоящихся клетках молекулы, участвующие в выполнении клетками своих эффекторных функций. Переход клетки в состояние, обеспечивающее выполнение ею своих функций, обозначают термином «**активация**».

При активации происходит экспрессия определенных наборов индуцибельных генов. Различия эффекторных функций разных типов клеток обусловлены экспрессией различных наборов генов. При активации для большинства клеток врожденного иммунитета характерны: появление новых молекул на поверхности клеток (в частности молекул адгезии и разнообразных рецепторов), секреция цитокинов и других гуморальных продуктов, усиление метаболизма.

Источник активации клеток врожденного иммунитета — связывание рецепторами своих лигандов с последующей передачей в клетку активационного сигнала, трансформируемого в сигнал, индуцирующий экспрессию генов. Для индукции генов необходимо образование в клетке ядерных (транскрипционных) факторов, обладающих сродством к определенным последовательностям ДНК и связывающихся с регуляторным (промоторным) участком соответствующих генов. В покоящихся клетках наборы транскрипционных факторов, необходимых для индукции этих генов, отсутствуют. Появление факторов транскрипции достигается разными путями: активацией предсуществующих неактивных факторов с их перемещением в ядро, синтезом этих факторов *de novo* или разрушением их инактиваторов. Факторы, необходимые для реализации этих процессов, должны быть в свою очередь индуцированы при активации клеток. Именно поэтому между мембранным рецептором, поставляющим активационный сигнал, и генами с их регуляторными участками расположена цепь передаточных (сигнальных) молекул. В процесс активации вовлечено несколько сигнальных путей, приводящих к образованию разных транскрипционных факторов. В состав внутриклеточных сигнальных путей входят ферменты — киназы (фосфорилируют белки или липиды, переводя их в активное состояние) и адапторные белки (передают промежуточные продукты активации между звеньями сигнальной цепи).

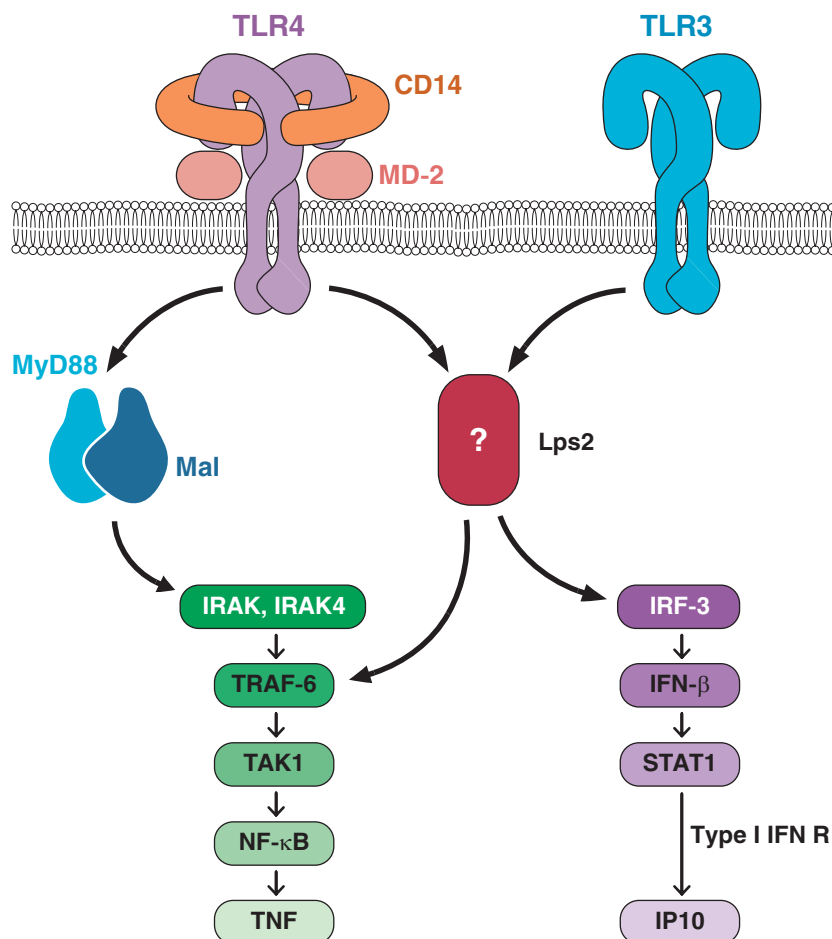
Основные факторы, вызывающие активацию клеток врожденного иммунитета — PAMP, узнаваемые патогенраспознающими рецепторами (в первую очередь — TLR). Передача сигнала по сигнальным путям проиллюстрирована на рис. 2.12 и 2.13. При связывании PAMP с мембранным TLR возникают конформационные изменения внеклеточной части рецептора, передающиеся на внутриклеточный домен TIR. В передаче активационного сигнала от TIR-домена TLR участвует несколько адапторных белков (MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM), активирующих 2 основных сигнальных пути — MyD88-зависимый и TRIF-зависимый. MyD88-зависимый путь участвует в передаче сигнала от всех TLR, кроме TLR-3, использующего TRIF-зависимый путь. Передача сигнала от TLR-4 происходит с участием обоих сигнальных путей. MyD88 (при участии TIRAP) играет роль «мостика» между активным димером TLR и первой сигнальной киназой — серинтреониновой киназой IRAK-4. Активированная IRAK-4 запускает каскад реакций активации сигнальных ферментов: киназы IRAK-1, убиквитинлигазы TRAF6 и киназы TAK1.



**Рис. 2.12.** Основной сигнальный путь, активируемый при связывании лигандов Toll-подобными рецепторами и приводящий к экспрессии транскрипционного фактора NF-κB и активации провоспалительных генов

На этом этапе передача сигнала может идти по двум путям. Один из них — активация тирозинфосфатазы IKK. Активация IKK происходит также при поступлении сигналов от эндолизосомального TLR-3 при посредстве адапторного белка TRIF и киназы RIP1. Основная мишень IKK — IκB (ингибирующая цепь неактивного комплекса, содержащего транскрипционный фактор NF-κB). Фосфорилирование IκB вызывает ее связывание с убиквитином, после чего она подвергается расщеплению в протеасоме. Освобожденный от IκB комплекс содержит активный димер NF-κB, мигрирующий в ядро и связывающийся с промоторными участками многих провоспалительных генов (цитокинов, молекул адгезии, бактерицидных пептидов, ферментов и т.д.). Таким образом достигается главная цель активации — превращение клеток в эффекторы, обеспечивающие развитие воспалительной реакции и реализацию защитных функций врожденного иммунитета.

Второй путь передачи сигнала, раздваивающийся на уровне киназы TAK1, состоит в активации MAP-каскада (MAP — от *mitogen-activated protein kinase*) — серии последовательных активаций серинтреониновых



**Рис. 2.13.** Взаимодействие сигнальных путей, запускаемых при связывании лигандов Toll-подобными рецепторами

протеинкиназ от MAP-киназ 3-го (TAK1) до 1-го уровня (JNK и p38). MAP-киназы 1-го уровня обеспечивают образование транскрипционного фактора AP-1 (*Activation protein 1*). AP-1 участвует в активации многочисленных генов, имеющих отношение к развитию не только воспаления, но и адаптивного иммунного ответа (см. раздел 3.5.2.1).

Передача сигнала от TLR, локализованных в эндолизосомах, происходит другим способом. От TLR-7, TLR-8, TLR-9 сигнал передается с участием адапторного белка MyD88 путем последовательной активации IRAK4, IRAK1, TRAF6 и TAK1. Следующие за этим пути передачи сигнала также расходятся (рассмотрены выше). Они приводят к образованию транскрипционных факторов NF-κB и AP-1. Однако, в отличие от мембранных TLR, при передаче сигнала от эндолизосомальных TLR формируется дополнительная сигнальная ветвь. При формировании околорецепторного мультимолекулярного комплекса, включающего MyD88, IRAK4, IRAK1, TRAF3,

TRAF6, неактивный IRF7 (IRF — *Interferone-responding factor*) и некоторые другие факторы, происходит активация IRF7. Активированный IRF7 мигрирует в ядро и, соединяясь с последовательностью ISRE (*Interferon-stimulated response element*), играет роль транскрипционного фактора, ответственного за «включение» гена интерферона  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) (см. рис. 2.13).

Передача сигнала от рецепторов TLR-3 и TLR-4 (при его экспрессии в эндолизосомах) происходит иным путем, но приводит к тем же результатам. Прежде всего в сигнальной цепи отсутствует MyD88. Роль первого адапторного белка при этом играет TRIF (для TLR-4 — также TRAM). TRIF имеет участки связывания с белками RIP1 и TRAF3, инициирующими 2 пути передачи сигнала. Один из них состоит в активации киназы RIP1, активации IKK и формированию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B. Активация убиквитин-лигазы TRAF3 приводит (через промежуточную стадию с участием факторов TBK1 и IKK $\epsilon$ ) к активации фактора IRF3. Этот транскрипционный фактор индуцирует экспрессию генов интерферонов, причем в большей степени IFN $\beta$ , чем IFN $\alpha$ .

Суммируя рассмотренные выше данные о сигнальных путях (см. рис. 2.13), можно констатировать образование 4 транскрипционных факторов, участвующих в развитии воспаления и проявлений врожденного иммунитета: NF $\kappa$ B (ключевой транскрипционный фактор провоспалительных генов), AP-1 (транскрипционный фактор для включения различных иммунологически значимых генов), IRF7 и IRF3 (транскрипционные факторы, ответственные за включение генов интерферонов — соответственно IFN $\alpha$  и IFN $\beta$ ). При этом мембранные TLR (TLR-5 и функциональный комплекс TLR-1/TLR-2/TLR-6) участвуют в активации NF- $\kappa$ B и AP-1, эндолизосомальные TLR (TLR-7, TLR-8 и TLR-9) ответственны за включение этих факторов и дополнительно IRF7, а мембранные рецепторы (TLR-3 и TLR-4) — за включение NF- $\kappa$ B и AP-1 и дополнительно IRF3. Таким образом, TLR, распознающие внеклеточные патогены, передают сигналы, приводящие к экспрессии провоспалительных генов, а TLR, распознающие внутриклеточные патогены (в частности вирусы), помимо провоспалительных, индуцируют гены интерферонов, обеспечивающих противовирусную защиту.

После взаимодействия мембранных TLR с лигандом происходит их интернализация и отделение от фактора MyD88. Это служит одним из факторов, обуславливающих временную «неотвечаемость» на повторное действие того же агента — толерантность, проходящую только через 2–3 сут. Реакция, развивающаяся при связывании TLR-4 с лигандом, отличается от описанной выше: TLR-4 интернализуется и теряет связь с MyD88, но сохраняет связь с фактором TRIF, что обуславливает его функционирование в составе эндолизомы, о чем говорилось выше.

Изучение передачи сигнала от цитозольных паттернраспознающих рецепторов семейства NLR—NOD1/2 показало, что по результатам она сходна с передачей сигнала от мембранных TLR. Связывание с NLR их лигандов (мурамилпептидов) приводит к активации (при участии фактора RICK) комплекса IKK с последующим формированием фактора NF- $\kappa$ B и активацией каскада MAP-киназ с образованием транскрипционного фактора AP-1. При этом активации генов интерферонов не происходит.

Как уже сказано, к основным генам, активируемым под влиянием NF- $\kappa$ B, относят гены провоспалительных цитокинов. При экспрессии генов семейства IL-1 для синтеза функционально активного продукта (прежде всего IL-1 $\beta$ ) необходим процессинг синтезированной молекулы-предшественницы, состоящий в ее расщеплении каспазой 1. В процессинге задействованы рецепторы NALP (цитозольные рецепторы семейства NLR), формирующие вместе с другими факторами и прокаспазой (все они содержат домен CARD) надмолекулярный комплекс **инфламмосому**, в которой и происходит активация каспазы 1.

Из приведенных выше данных следует, что PAMP-распознающие рецепторы, относящиеся к TLR и NLR, — главные факторы активации миелоидных клеток, задействованных в реакциях врожденного иммунитета. Другие паттернраспознающие рецепторы ответственны за выполнение функций, не требующих активации клеток, однако они могут участвовать в этом процессе в качестве корецепторов. Пример таких рецепторов — молекулы адгезии интегрины. Они связаны с тирозинкиназами и молекулами, имеющими активационные мотивы ITAM. Таким образом, интегрины способны активировать факторы, общие для нескольких путей активации (см. 2.3.1.2), что способствует образованию транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B и AP-1. Один из C-лектиновых рецепторов — дектин-1 имеет в своей цитоплазматической части последовательность ITAM, участвующую в передаче активационных сигналов. Связывание дектина-1 с  $\beta$ -глюканами дрожжевых форм грибов приводит к индукции провоспалительных генов, в том числе циклооксигеназы-2 и цитокинов, в частности TNF $\alpha$ , IL-6, IL-23, что определяет роль дектина-1 в защите от грибковой инфекции. Другие лектиновые рецепторы самостоятельно не участвуют в активации клеток, хотя и могут способствовать TLR-зависимой активации клеток.

Анализ сигнальных путей, активируемых при связывании провоспалительных цитокинов, выявляет очень высокую степень их сходства с MyD88-зависимой передачей сигнала (см. раздел 2.5.5.3). Для IL-1 эти пути идентичны сигнальным путям, запускаемым при связывании TLR, поскольку внутриклеточная часть рецептора для IL-1 представляет TIR-домен (что отражено в названии этого домена — *Toll/IL-1 receptor and resistance domain*). При образовании TNF $\alpha$  в передачу сигнала вовлечены факторы TRAF2 и TRAF3, что обуславливает наличие перекрестов с сигнальными путями TLR и TNFR. Результат сходства этих путей передачи сигнала — явление, называемое амплификацией ответа на PAMP. Оно заключается в том, что эффект, достигаемый при прямом действии патогенов и их продуктов в очаге инфицирования, дистантно воспроизводится полностью и даже в значительно большем масштабе за счет действия провоспалительных цитокинов на клетки врожденного иммунитета. Таким образом, амплифицирующие факторы — продукты PAMP-индуцированной активации.

Выше детально рассмотрен классический путь активации клеток врожденного иммунитета (прежде всего макрофагов), на котором основано вовлечение этих клеток в иммунную защиту и воспалительные реакции. Однако резидентным макрофагам и дендритным клеткам свойственны и другие формы ответа, направленные на осуществление гомеостатических функций, регенерацию тканей, а также ограничение воспалительных

процессов. В их основе лежат иные пусковые факторы и сигнальные механизмы. Альтернативные пути активации миелоидных клеток на примере макрофагов представлены в табл. 2.12.

**Таблица 2.12.** Варианты активации макрофагов под влиянием различных сигналов

Показатель	Варианты активации		
	Классический	Альтернативный	Активация II типа
Активирующий сигнал	INF $\gamma$ + TNF (TLR)	IL-4, IL-13	IgG-комплексы + TLR, CD40 или CD44
Секреторные продукты	$\uparrow$ TNF, $\uparrow$ IL-12, IL-1, IL-6	$\uparrow$ IL-1RA IL-10	$\uparrow$ IL-10, $\downarrow$ IL-12, TNF, IL-1, IL-6
Поверхностные маркеры	$\uparrow$ МНС-II, $\uparrow$ CD86, $\downarrow$ Маннозо-связывающий рецептор, $\downarrow$ Fc $\gamma$ -RII	$\uparrow$ Маннозосвязывающий рецептор, $\uparrow$ Рецепторы-мусорщики, $\uparrow$ CD23, $\downarrow$ CD14	$\uparrow$ МНС II класса, $\uparrow$ CD86
Ферменты	$\uparrow$ NO-синтаза, $\downarrow$ Аргиназа	$\uparrow$ Аргиназа, $\downarrow$ NO-синтаза	$\downarrow$ NO-синтаза
Секретируемые хемокины	IP-10 (CXCL10), MIP-1 $\alpha$ (CCL3), MCP-1 (CCL2),	PARC-1 (CCL18), MDC (CCL22), TARC (CCL17)	Неизвестно
Биологические эффекты	Повышение бактерицидной и опухолюцидной активности, презентация антигена	Ускорение регенерации, подавление пролиферации Т-клеток, уменьшение бактерицидности	Противовоспалительная активность, усиление антилеопродукции

Таким образом, при действии разнообразных чужеродных (патогены) и эндогенных (цитокины) лигандов на рецепторы клеток врожденного иммунитета запускается весь комплекс процессов, необходимых для осуществления защиты — эндоцитоз (поглощение) чужеродных агентов и активация, приводящая к мобилизации защитных механизмов и секреции активных факторов защиты.

### 2.2.5. Биологическая опасность, ее маркеры и реакция на них организма

В последние годы начало формироваться расширенное представление о сигналах биологической опасности и реакции на них организма. Его основой стало учение о системе эндогенных сигналов опасности, запускаемых особой группой веществ, называемых аларминами. Эти вещества широко представлены в клетках, и усиленно экспрессируются при некротическом (но не апоптотическом) повреждении клеток и клеточном стрессе. Алармины воздействуют на иммунную систему (обычно активируя дендритные клетки), через рецепторы, иногда общие с рецепторами для PAMP. Иногда молекулы, воспринимаемые организмом как сигналы опасности, называют (по аналогии с PAMP) образами опасности, или DAMP — *Danger-associated molecular patterns*.

Наиболее известные алармины — белки теплового шока (HSP). У млекопитающих они представлены несколькими вариантами — HSP20, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90. В норме белки теплового шока выполняют функцию шаперонов, т.е. они удерживают синтезируемые белки в оптимальной конформации, формируемой после завершения сборки субъединиц и процессинга. В условиях клеточного стресса, возникающего под действием температуры, радиации, при инфицировании и других воздействиях экспрессия белков теплового шока усиливается и они секретируются клеткой. Белки теплового шока способны взаимодействовать с различными рецепторами, в том числе с TLR (TLR-2, TLR-4), передавая в клетки иммунной системы сигнал опасности.

К аларминам относят белок HMGB1 (*High mobility group bpx1*) — широко распространенный белок, выделяемый при некротической гибели клеток. HMGB1 секретируется в условиях клеточного стресса. К его мишеням относят клетки иммунной системы: он обладает хемотаксической активностью, активирует макрофаги, ускоряет созревание дендритных клеток. Другой представитель аларминов — мочевая кислота, выделяемая при повреждении клеток и образующая кристаллы моноводной соли урата. Мочевая кислота стимулирует выработку цитокинов, участвует в функционировании инфламмосом и т.д. Большую группу аларминов образуют белки S100 (семейство калгранулинов). К аларминам относят также бактерицидные белки дефензины и кателицидины, галектины, тимозины, аннексины, из цитокинов — цитоплазматический и мембранный IL-1 $\alpha$ .

В целом функционирование системы передачи сигналов опасности происходит путем восприятия этих сигналов как от экзогенных факторов патогенраспознающими рецепторами (прежде всего TLR), так и от эндогенных факторов (аларминов) через собственные рецепторы или паттернраспознающие рецепторы (TLR, NOD и т.д.). Так, массовая гибель клеток, вызванная действием неблагоприятных факторов (но не являющаяся результатом апоптоза), вызывает защитную реакцию за счет выброса большого количества аларминов в среду и их восприятия рецепторами клеток. Аналогично действуют стрессорные белки (особенно белки теплового шока), при попадании в межклеточное пространство подающие сигнал опасности окружающим клеткам. На восприятии как экзогенных, так и эндогенных сигналов опасности специализируются миелоидные клетки (например, макрофаги, дендритные клетки), реагирующие развитием реакций врожденного иммунитета и формированием воспаления, а несколько позже — усилением реакций адаптивного иммунитета (иммунного ответа).

## 2.3. КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

Реализация защитных функций врожденного иммунитета происходит в рамках воспалительной реакции, развивающейся в ответ на локальное повреждение и проникновение чужеродных агентов, обычно — патогенных бактерий. Как известно, воспалительная реакция инициируется местными клетками (тучными клетками, макрофагами), причем развивающиеся

процессы в первую очередь направлены на изменение местного кровотока и привлечение лейкоцитов из крови в очаг воспаления. Миграция миелоидных клеток в очаг решает проблему локального дефицита эффекторных клеток врожденного иммунитета. Таким образом, миграция клеток из кровяного русла в поврежденные ткани составляет обязательный компонент ответа врожденного иммунного ответа на биологическую агрессию. В процессе миграции клетка должна преодолеть барьер в виде сосудистой стенки и переместиться на определенное расстояние, непрерывно взаимодействуя с окружающими клетками и межклеточным матриксом. При этом должно быть четко определено направление движения клетки. Эти сложные процессы осуществляются благодаря взаимодействию мигрирующей клетки с окружающими структурами посредством молекул адгезии, хемокинов и их рецепторов.

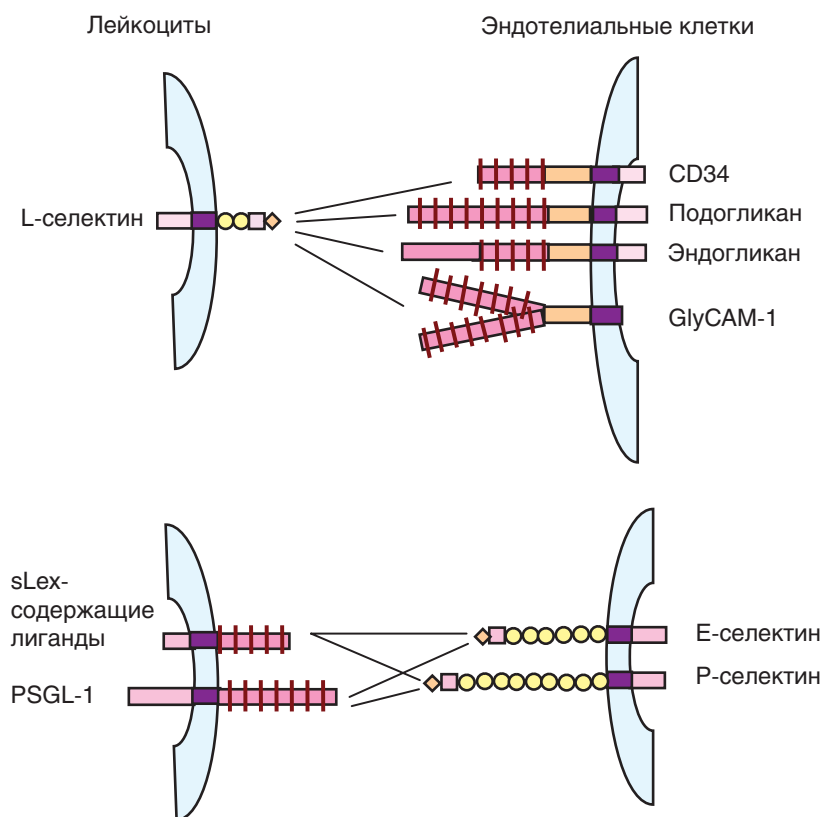
### 2.3.1. Молекулы адгезии

Молекулам адгезии принадлежит основополагающая роль в формировании многоклеточного организма, поскольку они служат главными факторами контакта между клетками, а также участвуют в их перемещении. При этом важно, чтобы степень сродства между молекулами адгезии подавалась регуляции для обеспечения обратимости адгезивных взаимодействий. Молекулы адгезии формируют несколько достаточно консервативных семейств. У млекопитающих известно 4 группы молекул адгезии — селектины, интегрины, молекулы суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) и кадхерины. Для осуществления миграции и взаимодействия миелоидных клеток важны представители трех первых групп.

#### 2.3.1.1. Селектины и их рецепторы

Селектины — тканевые лектины, обладающие сродством к концевым остаткам маннозы и фукозы. Для связывания селектинов с лигандами необходимо присутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (свойство группы С-лектинов). Известно три варианта селектинов: Р (от *Platelet* — тромбоцитарный), Е (от *Endothelial* — эндотелиальный) и L (от *Lymphocyte* — лимфоцитарный) (рис. 2.14). Они имеют однотипное строение. В их состав входит 3 домена: наружный — собственно лектиновый, промежуточный — подобный эпидермальному фактору роста, и несколько коротких согласительных (*consensus*) повторов, прилегающих к мембране, — доменов контроля комплемента. Число согласительных повторов варьирует в разных видах селектинов и составляет основу их структурных различий: L — 2, Е — 6, Р — 9. Селектины — трансмембранные белки с коротким цитоплазматическим участком, связанным с молекулами кальмодулина, актина и белка ERM. Кальмодулин предотвращает «смыывание» (шединг) молекул селектина. Под влиянием цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-1) кальмодулин отсоединяется от внутриклеточной части селектина L, в результате чего происходит отделение внеклеточной части молекулы и ее смыывание в окружающую среду.

Р-селектин содержится в секреторных гранулах эндотелиальных клеток и тромбоцитов. При активации эндотелиальных клеток он быстро мобилизуется на поверхность клетки и может быть смыт с нее во внеклеточную среду. Р-селектин участвует в активации тромбоцитов и ранних этапах



**Рис. 2.14.** Взаимодействие селектинов и их рецепторов — адрессинов. Линии, соединяющие символы в правой и левой половинах рисунка, отражают способность молекул к взаимодействию

миграции лейкоцитов в очаг воспаления. Е-селектин — основной селектин клеток эндотелия сосудов. Под влиянием активирующих воздействий (особенно провоспалительных цитокинов) Е-селектин экспрессируется на поверхности клеток и играет ведущую роль на ранних этапах эмиграции лейкоцитов из сосудистого русла. В отличие от двух вышеназванных, L-селектин присутствует не на эндотелиальных клетках, а на лейкоцитах. Он спонтанно экспрессируется на поверхности нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов и обеспечивает осуществление начального этапа миграции этих клеток — этапа перекачивания (см. раздел 2.3.3).

Селектины распознают концевые остатки маннозы и фукозы, входящие в состав полисахаридов и гликоконъюгатов (см. рис. 2.14). Рецепторами L-селектинов служат вещества, называемые адрессинами — PNAd (*Peripheral lymph node addressin*). Название связано с тем, что L-селектины и их лиганды были описаны при изучении миграции (хоминга) лимфоцитов в лимфоидные органы; адрессины служат тем «адресом», по которому направляются лимфоциты. По химической природе адрессины относят к муцинам — гликопротеинам, содержащим множественные О-гликановые группы

(т.е. углеводные группы, присоединенные к белку через остатки серина и треонина). Основные рецепторы L-селектина: молекула CD34, подокаликсин, эндогликан и GlyCAM-1 (экспрессированы на поверхности эндотелиальных клеток). Все перечисленные рецепторы — трансмембранные белки, имеющие в составе внеклеточной части цистеинсодержащий участок, и собственно муциновый домен различной величины; эндогликан содержит также N-концевой кислый участок. CD34 и подогликан присутствуют в неактивной форме на любых эндотелиоцитах. После активации этих клеток цитокинами CD34 и подогликан приобретают способность связываться с L-селектином. CD34 экспрессируют и кроветворные клетки-предшественники, в том числе стволовые, а также стромальные клетки лимфоидных органов. Молекула GlyCAM-1 существует в мембранной и растворимой формах. Этот муцин имеет разветвленную (2 ветви) структуру углеводного компонента. L-селектин распознает углеводную составляющую адрессинов. Чаще всего это — сиалированные детерминанты группового вещества Льюиса-sLex (CD15). Состав этой детерминанты: Sia  $\alpha 2 \rightarrow 3$  Gal  $\beta 1 \rightarrow 4$  Fuc  $\alpha 1 \rightarrow$  GlcNAc. Связывание усиливается после сульфатирования детерминанты (SO<sub>3</sub>-группа присоединяется к остатку N-ацетилглюкозамина или галактозы).

L-селектин формирует слабую связь с адрессинами; к тому же его молекула, как упомянуто выше, легко смывается с поверхности клеток (шединг), в связи с чем опосредованный L-селектином контакт между лейкоцитом и эндотелиальной клеткой неустойчив. Это проявляется в перекатывании лейкоцитов вдоль сосудистой стенки — качение, или роллинг (*rolling*). Именно с качения начинается процесс эмиграции лейкоцитов из сосудистого русла.

На этом этапе определенный вклад вносит взаимодействие лейкоцитов с эндотелиальными клетками, обусловленное участием двух других селектинов. Однако E- и P-селектины экспрессируются (под действием провоспалительных цитокинов) не на лейкоцитах, а на эндотелиальных клетках. Лейкоциты же несут на своей поверхности их рецепторы (см. рис. 2.14): PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1* — CD162) и его фукозилированное производное — антиген кожных лимфоцитов CLA (*Cutaneous lymphocyte antigen*), а также муцины, содержащие sLex (CD66, CD24 и др.), и некоторые интегрины (например,  $\alpha_4\beta_7$ ). PSGL-1 представляет собой сиаломуцин с участками O- и N-гликозилирования (через остатки тирозина). PSGL-1 представлен на нейтрофилах, моноцитах, большинстве лимфоцитов. Для взаимодействия PSGL-1 с селектинами необходимо присоединение сульфогруппы к тирозину в его N-концевой части. PSGL-1 имеет довольно протяженный цитоплазматический участок, связанный с тирозинкиназой Syk, что определяет способность этого рецептора передавать в клетку активационный сигнал. Фукозилированная форма PSGL-1 — CLA, формирующаяся с участием фермента  $\alpha 1,3$ -фукозилтрансферазы VII на некоторых Т-клетках, определяет их миграцию в эпидермис за счет специфического сродства CLA к E-селектину сосудистого эндотелия.

### 2.3.1.2. Интегрины и их рецепторы

Интегрины — наиболее важные и полифункциональные молекулы адгезии (табл. 2.13). Интегрины соединяют внутреннюю и внешнюю среду клетки, проводя сигналы как изнутри клетки наружу, так и наоборот — из внекле-

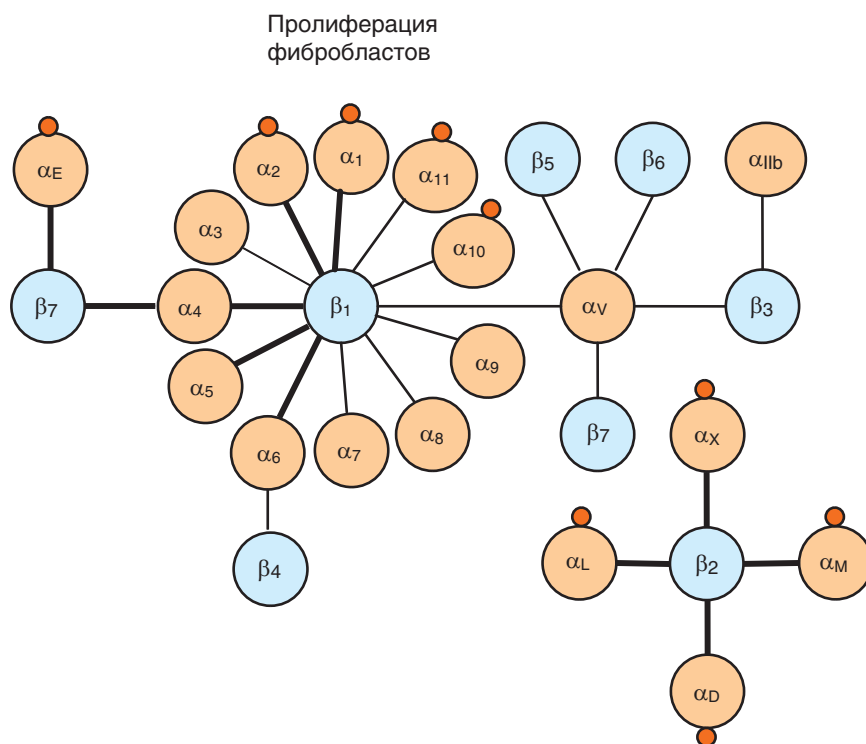
точной среды внутрь клетки. Внутриклеточная часть интегринов связана с компонентами цитоскелета, что определяет многие функции этих молекул.

**Таблица 2.13.** Интегрины и их рецепторы, экспрессируемые лейкоцитами

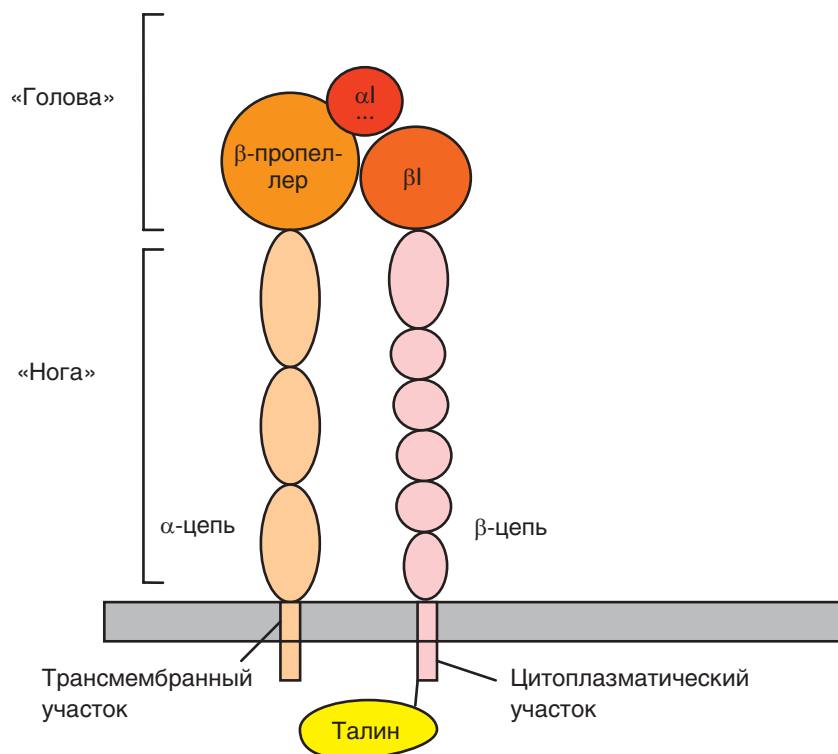
Название, синонимы	Молекулярная масса	Распределение	Лиганды
<b>Интегрины</b>			
LFA-1, $\alpha_L\beta_2$ , CD11a/CD18	180/95	Лимфоциты, НК-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, ICAM-5
Mac-1, $\alpha_M\beta_2$ , CD11b/CD18, CR3	170/95	Моноциты, макрофаги, нейтрофилы, НК-клетки, дендритные клетки	iC3b, фибриноген, гепарин и др.
p150,95, $\alpha_X\beta_2$ , CD11c/CD18, CR4	150/95	Моноциты, макрофаги, НК-клетки, дендритные клетки	iC3b, фибриноген, гепарин и др.
$\alpha_D\beta_2$	X/95	Моноциты, макрофаги, эозинофилы, нейтрофилы	ICAM-3, ICAM-1
VLA-1, $\alpha_1\beta_1$ , CD49a/CD29	210/130	В-лимфоциты, моноциты, активированные Т-лимфоциты	Коллаген
VLA-2, $\alpha_2\beta_1$ , CD49b/CD29, GPIa	160/130	Активированные Т-лимфоциты, В-лимфоциты, моноциты	Коллаген
VLA-4, $\alpha_4\beta_1$ , CD49d/CD29	150/130	Лимфоциты, моноциты, макрофаги, эозинофилы	VCAM-1, Фибронектин
VLA-5, $\alpha_5\beta_1$ , CD49e/CD29	132/130	Т-лимфоциты, моноциты	Фибронектин
VLA-6, $\alpha_6\beta_1$ , CD49f/CD29, GPIc	125/130	Т-лимфоциты, моноциты	Ламинин
LPAM-1, $\alpha_4\beta_7$ , CD49d/X,	180/120	Лимфоциты, моноциты, НК-клетки	MadCAM-1, фибронектин
HML-1, $\alpha_E\beta_7$ , CD103/X,	150/120	Внутриэпителиальные Т-лимфоциты	Е-кадгерин
<b>Рецепторы интегринов</b>			
ICAM-1 (CD54)	94	Активированные эндотелиоциты, активированные лимфоциты	LFA-1, $\alpha_D\beta_2$
ICAM-2 (CD102)	60	Эндотелиоциты, активированные лимфоциты, активированные моноциты	LFA-1
ICAM-3 (CD50)	124	Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы	LFA-1, $\alpha_D\beta_2$
ICAM-5	97,3	Головной мозг	LFA-1
VCAM-1 (CD106)	100–110	Активированные эндотелиоциты	VLA-4
MadCAM-1	42,7	Кишечные эндотелиальные клетки	$\alpha_4\beta_7$

Интегрины — трансмембранные гетеродимеры. Полипептидные цепи интегринов ( $\alpha$  и  $\beta$ ) соединены нековалентно. К настоящему времени известно 24 варианта интегринов, представляющих собой комбинации из 18 вариантов  $\alpha$ - и 8 вариантов  $\beta$ -цепей. Только 3 типа  $\beta$ -цепей ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  и  $\beta_7$ ) способны связывать различные  $\alpha$ -цепи (рис. 2.15). Существует 3 варианта номенклатуры интегринов: используют традиционные обозначения, обычно связанные с обстоятельствами открытия данного интегрин; формулу, содержащую греческие обозначения полипептидных цепей, образующих данную молекулу; CD-номенклатуру. Например, LFA-1 (*Lymphocyte function antigen 1*; название связано с открытием этой молекулы в качестве участника реализации цитотоксической функции Т-лимфоцитов) обозначается также как  $\alpha_4\beta_2$ -интегрин, или CD11a/CD18. Название молекулы VLA-4 (VLA — *Very late activation antigen*) имеет синонимы:  $\alpha_4\beta_1$ -интегрин и CD49d/CD29.

Полипептидные цепи, образующие интегрины, содержат несколько доменов, группируемых в 2 отдела цепи — «голову», направленную наружу, и «ногу», прилежащую к мембране (рис. 2.16). «Нога» соединена с трансмембранным участком. Домены «головы» в  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепях имеют глобулярную структуру и отвечают за связывание лиганда. В  $\alpha$ -цепи «голова» представлена  $\beta$ -пропеллерным доменом, названным так потому, что он сформирован семью  $\beta$ -слоями, свернутыми таким образом, что на модели они



**Рис. 2.15.** Способность полипептидных  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей интегринов формировать гетеродимеры (см. текст)



**Рис. 2.16.** Схематичное изображение структуры интегринов

напоминают пропеллер. Из известных  $\alpha$ -цепей интегринов 50% содержат дополнительный домен из 190 остатков (на рис. 2.15 отмечены малыми кружками), называемый  $\alpha A$ ,  $\alpha I$  (*inserted*), или домен фон Виллебранда. Он подсоединен к пропеллерному домену. Головной домен  $\beta$ -цепи структурно сходен с  $\alpha I$ -доменом (его называют также  $\beta I$ -доменом). Он взаимодействует с  $\beta$ -пропеллерным доменом  $\alpha$ -цепи. Участки «ноги» интегринов, примыкающие к мембране, образованы доменами эпидермального фактора роста. Длина цитоплазматического участка варьирует (обычно он короткий). Он взаимодействует с белком цитоскелета талином.

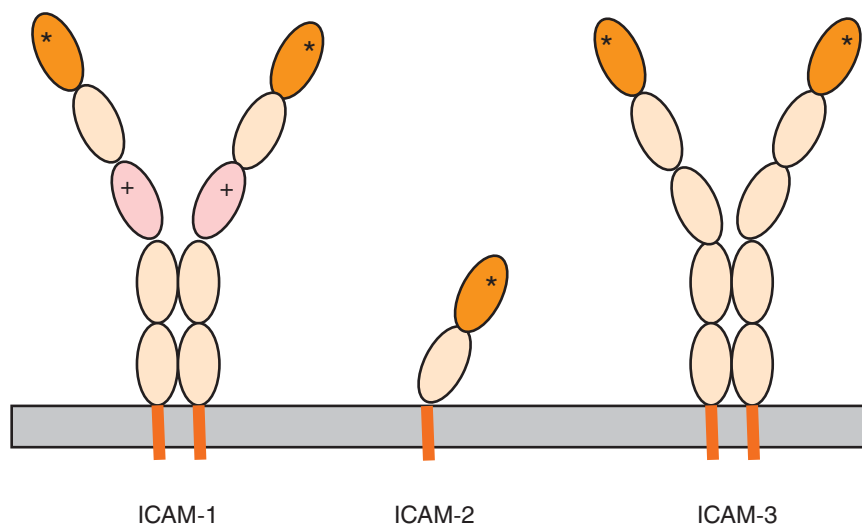
В молекулах, содержащих  $\alpha I$ -цепь, именно она отвечает за связывание лиганда.  $\alpha I$ -Цепь представляет  $\beta$ -слой, окруженный несколькими  $\alpha$ -спиралями.  $\alpha I$ -Домен содержит центр адгезии, зависимый от ионов двухвалентных металлов — MIDAS (*Metal ion-dependent adhesion site*). В физиологических условиях центр содержит ион  $Mg^{2+}$ , скрепленный 5 связями с 3 петлями полипептидной цепи домена. При связывании лигандов их боковые цепи также взаимодействуют с  $Mg^{2+}$ . В молекулах, не имеющих  $\alpha I$ -домена, активный центр образован головными доменами  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей, причем главная роль принадлежит  $\alpha I$ -подобному домену  $\beta$ -цепи, содержащему центр MIDAS. В головной части молекул интегринов есть также «карманы» для связывания  $Ca^{2+}$ . Двухвалентные ионы, особенно  $Mg^{2+}$ , имеют очень важное значение для функционирования активного центра и связывания лигандов.

Интегрины представлены на поверхности разных типов клеток, включая эпителиальные и нервные, но особенно важную роль интегрины и их рецепторы играют в функционировании клеток мезенхимального происхождения: лейкоцитов, тромбоцитов, клеток стромы и сосудистого эндотелия. На рис. 2.15 жирными линиями выделены интегрины, выявляемые на лейкоцитах. Наибольший интерес для иммунологии представляют интегрины семейств  $\beta_1$  и  $\beta_2$ , присутствующие на поверхности иммуноцитов. Интегрины задействованы в различных реакциях, связанных с участием этих клеток в иммунных процессах: эмиграции лейкоцитов из кровотока и поступлении их в очаг воспаления, взаимодействии с клетками-мишенями, формировании иммунного синапса и т.д.

$\beta_1$ -Интегрины (молекулы группы VLA) взаимодействуют с компонентами межклеточного матрикса (фибронектином, ламинином, коллагеном, фибриногеном) и мембранным рецептором VCAM-1 (CD106). Эта молекула содержит 7 внеклеточных доменов, относящихся к суперсемейству иммуноглобулинов. VCAM-1 экспрессируется активированными клетками эндотелия. Из 11 вариантов  $\beta_1$ -интегринов широко представлено 6 (VLA-1 — VLA-6), из которых 5 (все, кроме VLA-3) характерны для лейкоцитов. Наиболее важную роль в физиологии нейтрофилов играет интегрин VLA-5, для моноцитов/макрофагов и лимфоцитов наиболее важен интегрин VLA-4, отсутствующий на нейтрофилах.

$\beta_2$ -Интегрины (иногда называемые LeuCAM) представлены на поверхности лейкоцитов. Основным интегрин лимфоцитов LFA-1, присутствующий на всех разновидностях этих клеток, представлен и на поверхности моноцитов и макрофагов. Интегрин Mac-1 наиболее характерен для макрофагов (что отражено в его названии), но его выявляют и на других миелоидных и НК-клетках, а также перитонеальных В-лимфоцитах. Третий интегрин этой группы — p150/p95 — маркер дендритных клеток, но также представлен на других клетках миелоидного ряда. Mac-1 и p150/p95 служат рецепторами для комплемента (CR3 и CR4). В качестве рецепторов для  $\beta_2$ -интегринов выступают мембранные молекулы, образующие группу ICAM (*Intercellular adhesion molecules*) (рис. 2.17), содержащую 5 членов — ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), ICAM-3 (CD50), ICAM-4 (вещество эритроцитов Ландштейнера—Винера) и ICAM-5 (телеэнцефалин). Структурная основа этих молекул — домены, принадлежащие к суперсемейству иммуноглобулинов, число которых варьирует от 2 (для ICAM-2) до 9 (для ICAM-5). Молекулы ICAM (кроме ICAM-2) представлены на мембране в форме димера. На покоящихся эндотелиальных клетках представлен только ICAM-2, экспрессия остальных индуцируется под влиянием цитокинов (IL-1, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) или при действии других провоспалительных стимулов. Все разновидности ICAM могут секретироваться клетками и конкурентно тормозить процессы межклеточных взаимодействий. LFA-1 взаимодействуют со всеми молекулами семейства ICAM. Интегрины Mac-1 и p150/p95 распознают фрагмент компонента C3 комплемента — iC3b, а также фибриноген и гепарин.

Интегрины группы  $\beta_7$  экспрессированы в основном на Т-лимфоцитах и играют важную роль в выборе направления миграции этих клеток. Интегрин  $\alpha_E\beta_7$  служит «проводником» Т-лимфоцитов в слизистые оболочки; его рецептором служит Е-селектин. Т-лимфоциты мигрируют в слизис-



**Рис. 2.17.** Доменная структура трех главных представителей рецепторов  $\beta_2$ -интегрино: \* — рецепция LFA-1; + — рецепция Mac-1

тую оболочку кишечника, только если на их поверхности экспрессируется  $\alpha_4\beta_7$ -интегрин, распознающий гликозилированный адрессин MadCAM (уникальность экспрессии этого адрессина на эндотелии сосудов кишечника и определяет избирательность миграции  $\alpha_4\beta_7^+$  клеток в кишечнике), а также L-селектин. Особенность структуры молекулы MadCAM состоит в чередовании доменов суперсемейства иммуноглобулинов и муцинов.

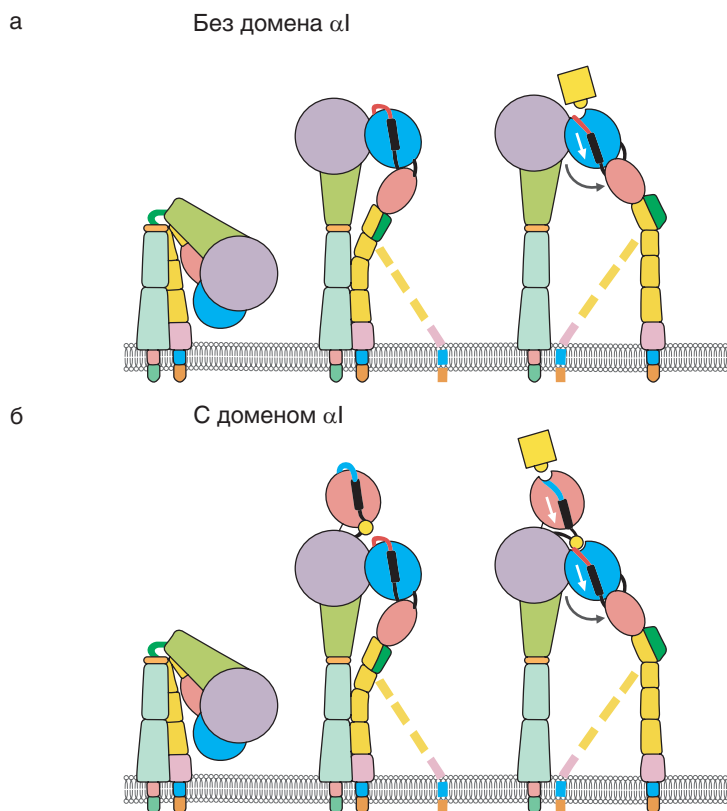
Еще один вариант иммуноглобулинподобных молекул, связанных с системой интегринов, — PeCAM (*Platelet-endothelial cell adhesion molecule*; CD31). PeCAM участвует в гомотипическом взаимодействии (т.е. связывается с PeCAM на поверхности другой клетки), но может распознаваться и другими молекулами, например, витронектином (интегрин  $\alpha_v\beta_3$ ).

Некоторые интегрины (в частности,  $\beta_1$  и  $\beta_2$ ) распознают в молекуле рецепторов последовательность RGD (Arg–Gly–Asp), присутствующую в составе молекул межклеточного матрикса и белков системы комплемента. Однако связывание интегринов с молекулами ICAM и VCAM от RGD не зависит. RGD часто применяют в исследованиях в качестве «суррогатного» лиганда интегринов.

Интегрины существуют в клетке в неактивной и активной формах (для некоторых интегринов описано промежуточное состояние). В покоящихся клетках (например, циркулирующих лейкоцитах) связывающая способность молекулы низка, но достаточна, чтобы обеспечить взаимодействие со своими рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток. В результате формируется кластер из нескольких молекул интегрин и генерируется сигнал, направленный снаружи внутрь клетки. Через цитоплазматический домен сигнал достигает талина — молекулы цитоскелета, связанной одним концом с интегрином, а другим — с актином. В результате происходит реорганизация цитоскелета, что индуцирует сигналы, направленные изнутри наружу, при-

водящие к повышению сродства рецептора к лиганду. Аналогичные процессы развиваются также при действии цитокинов, особенно хемокинов. С молекулой интегрина при этом происходят конформационные изменения.

Рентгеноструктурный анализ показал, что при неактивном состоянии молекулы «нога» интегрина «согнута» таким образом, что «голова» располагается близко к мембране (рис. 2.18). Под влиянием эндогенных активационных сигналов происходит «разгибание» «ноги» и молекула переходит из согнутой конфигурации в развернутую. Однако при этом активный центр малодоступен для лиганда — головная часть молекулы остается закрытой. Следующий этап активации состоит в переходе к открытой конфигурации связывающих центров интегрина. Условие его осуществления — пространственное «расхождение» «ног»  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей интегрина. В молекулах, лишенных  $\alpha$ I-домена, следующее за этим конформационное изменение затрагивает преимущественно  $\beta$ -цепь, в результате чего активный центр MIDAS становится доступным для лиганда (открытым). В молекулах, имеющих  $\alpha$ I-домен, активность этого домена регулируется MIDAS-центром  $\beta$ -цепи с участием эндогенного лиганда — инвариантного остатка глутаминовой кислоты  $\alpha_7$ -спирали  $\alpha$ I-домена. Связывание этого лиганда с MIDAS  $\beta$ -цепи вызывает



**Рис. 2.18.** Структурные основы активации молекул интегринов. Разъяснения см. в тексте

последовательную активацию MIDAS сначала в  $\beta$ -, затем в  $\alpha$ -цепи. Эти процессы обуславливают переход закрытой конфигурации «головы» интегрина в открытую, что сопровождается значительным повышением его сродства к лигандам (см. рис. 2.18). Описанная активация интегринов обратима: при повышении внутриклеточного содержания цАМФ интегрин переходит в неактивную форму, что способствует ослаблению контакта между клетками и прекращению их взаимодействия.

При активации сродство интегринов к лигандам может повышаться на несколько порядков; при этом скорость диссоциации уменьшается в 30–100 раз. Это способствует установлению прочного контакта интегрин с рецептором. Такой контакт не только обеспечивает надежную адгезию взаимодействующих клеток, но и служит источником вспомогательных сигналов, поступающих внутрь клетки и способствующих ее активации. Для генерации таких сигналов необходимо установление контактов активированного интегрин с мембранными молекулами, содержащими в своей цитоплазматической части активационный мотив (участок) ITAM, поскольку сами интегрины не имеют аналогичных мотивов для передачи сигнала. Однако к цитоплазматической части интегринов примыкают тирозинкиназы — ферменты, обуславливающие фосфорилирование белков и тем самым переводящие их в активное состояние (подробнее о киназах см. раздел 3.4.2.1). С интегрин связаны киназы семейства Src. При активации Src-киназы вызывают фосфорилирование упомянутого мотива ITAM, взаимодействующего с киназами семейства Syk, передающими сигнал далее. Последующие механизмы передачи сигнала аналогичны таковым при активации любых клеток.

Конечная реакция в миелоидных клетках определяется набором экспрессируемых генов и активируемых молекул. Она заключается в прочной адгезии, дегрануляции клеток, развитии окислительного взрыва и других проявлениях реакций миелоидных клеток, вовлеченных в воспалительный процесс, которые будут рассмотрены ниже. Как правило, активация клеток, обусловленная передачей сигнала через интегрины «извне внутрь», составляет компонент более сложного комплекса активирующих воздействий, включающих распознавание PAMP, действие хемокинов и провоспалительных цитокинов.

### 2.3.2. Хемотаксические факторы. Хемокины

Важнейшее условие участия миелоидных клеток в реакциях врожденного иммунитета — **хемотаксис** — направленное движение клеток, определяемое градиентом химических факторов (хемоаттрактантов). Хемотаксис следует отличать от хемотаксиса — ненаправленного усиления подвижности клеток под влиянием химических агентов. При реализации врожденного иммунитета в виде воспалительной реакции хемотаксис определяет миграцию лейкоцитов из кровяного русла в очаг воспаления.

#### 2.3.2.1. Основные группы хемоаттрактантов

При воспалении и реакциях врожденного иммунитета в качестве хемоаттрактантов выступают разные вещества, образующиеся в очаге воспаления. Прежде всего это продукты, выделяемые самими микроорганизмами. Наиболее известен пептид **N-формил-метионил-лейцил-фенилаланил (fMLP)** и его аналоги, обладающие очень сильным хемотаксическим действием. Этот

пептид участвует в инициации синтеза белка у бактерий. Он отсутствует в эукариотических клетках и его появление служит сигналом бактериальной инфекции, фактически выступая в качестве РАР. Миелоидные клетки (нейтрофилы, моноциты, макрофаги) имеют мембранные рецепторы для этого пептида — FPR (*Formyl-peptide receptor*) и FPLR (*Formyl peptide-like receptor*). Синтетический пептид fMLP широко применяют для моделирования хемотаксиса, обусловленного бактериальными продуктами. FPR и FPLR относятся к семейству родопсिनоподобных рецепторов, 7 раз пронизывающих мембрану (см. рис. 2.20). Со всеми рецепторами этого семейства взаимодействует белок G, участвующий в обмене гуанозиндифосфата (ГДФ). Связывание N-формил-метионил-лейцил-фенилаланила с этими рецепторами вызывает активацию клетки, сопровождающуюся перестройкой цитоскелета, что вызывает не только функциональную активацию клетки, но и стимулирует ее к миграции по градиенту пептида. Активация клеток через рецепторы хемотаксических факторов будет рассмотрена далее при описании хемокинов. Таким образом, хемотаксис, обусловленный fMLP, — прямая реакция лейкоцитов на попадание в организм бактерий.

Другую группу хемотаксических факторов формируют разнообразные провоспалительные факторы пептидной, белковой и липидной природы, образующиеся в очаге воспаления. Среди них наиболее изучены малые фрагменты компонентов комплемента (C3a и C5a), лейкотриены и цитокины. Образование фрагментов **C3a** и **C5a**, называемых анафилатоксинами, будет рассмотрено при описании системы комплемента (см. раздел 2.5.1). Специализированные рецепторы для C3a и C5a тоже относят к родопсिनоподобным. Они экспрессированы на поверхности тучных клеток, базофилов, эозинофилов, нейтрофилов и моноцитов.

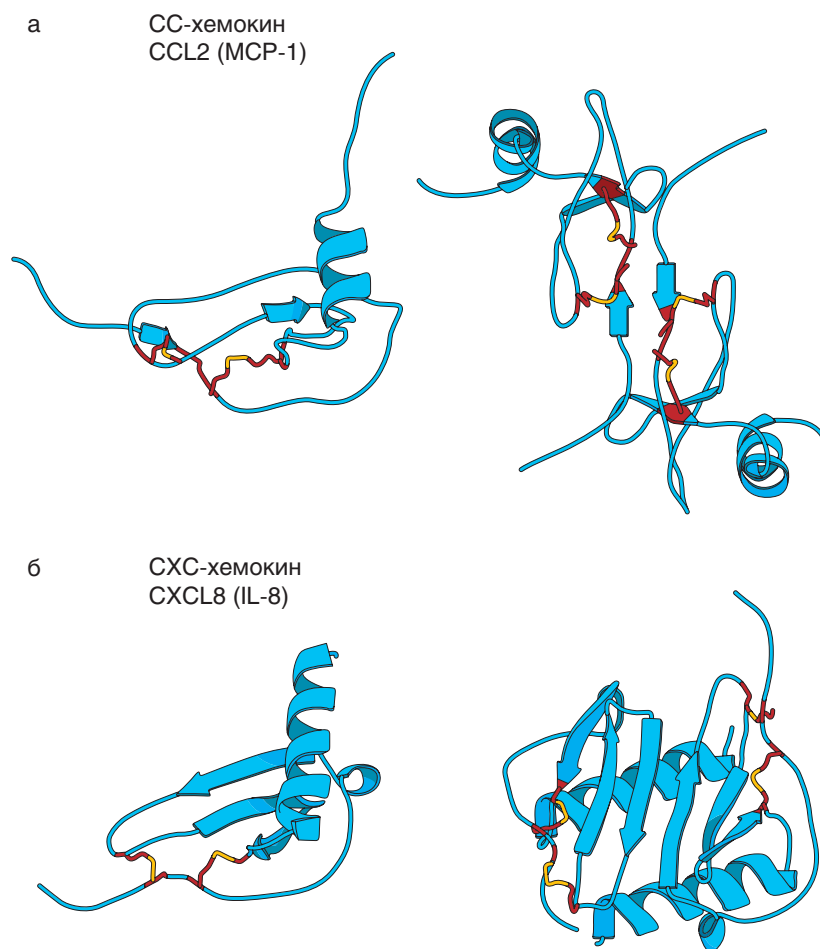
**Лейкотриены** принадлежат к группе **эйкозаноидов** (липидных метаболитов арахидоновой кислоты) и синтезируются преимущественно тучными клетками и базофилами, а также моноцитами и макрофагами. Лейкотриенам принадлежит важная роль в развитии воспаления и аллергических процессов, в связи с чем они будут рассмотрены при описании гуморальных факторов воспаления (см. раздел 2.5.4). Рецепторы лейкотриенов относят к семейству родопсिनоподобных рецепторов.

Хемотаксическим действием обладают многие другие молекулы, образующиеся в очаге воспаления, а также продукты расщепления факторов свертывания крови и фибринолиза (тромбин, фибрин), нейропептиды, фрагменты иммуноглобулинов, пентраксины (С-реактивный белок, сывороточный амилоид), фактор агрегации тромбоцитов — PAF (*Platelet aggregation factor*) и т.д. Ряд цитокинов (особенно провоспалительных) также оказывает на лейкоциты хемотаксическое действие. Так, IL-1 $\beta$  способен привлекать нейтрофилы, моноциты, лимфоциты. Однако к «профессиональным» хемоаттрактантам относят цитокины, выделяемые в особую группу — хемокины.

### 2.3.2.2. Хемокины и их рецепторы

Хемокины (от *Chemotactic cytokines*) были открыты в конце 80-х годов прошлого столетия. Они составляют обширную группу цитокинов, объединенную сходным строением и способностью распознавать родопсिनоподобные рецепторы.

Хемокины — полипептиды молекулярной массой 8–12 кДа. Мономерные хемокины имеют сходную третичную структуру и состоят из индивидуального N-концевого участка, содержащего уникальную для данного хемокина последовательность, N-петли и сердцевинного домена, включающего  $\beta$ -складчатый участок (в  $\alpha$ -хемокинах — 3 антипараллельные  $\beta$ -слоя), над которым расположена С-концевая  $\alpha$ -спираль (рис. 2.19). Помимо секретируемых, выделяют мембранные формы молекул хемокинов (например, фракталкин), выступающие также в роли молекул адгезии. Обычно хемокины присутствуют в биологических жидкостях в форме димеров, реже — тетрамеров. Четвертичная структура димеров существенно различается для хемокинов двух основных групп. Так, в  $\alpha$ -хемокинах благодаря димеризации формируется большая плоскость, состоящая из  $\beta$ -слоев и «обрамленная» двумя  $\alpha$ -спиралями (внешне напоминает поверхность для связывания пептидов в молекулах МНС). Хемокины способны формировать не только



**Рис. 2.19.** Пространственные модели строения хемокинов: а — СС-хемокин; б — СХС-хемокин. Вид сбоку и сверху

гомо-, но и гетеродимеры. Функционально важное свойство хемокинов — их способность взаимодействовать с глюкозаминогликанами (гепарин, хондроитинсульфат и др.) на поверхности клеток или в межклеточном матриксе. Иммобилизация хемокинов в тканях важна для создания их градиента, необходимого для направленного движения клеток. Индивидуальная N-концевая часть хемокинов может отщепляться металлопротеиназами. Видоизмененная таким образом молекула приобретает свойства ингибитора.

Выделяют 4 группы хемокинов. В основе разделения лежит взаимное расположение остатков цистеина (табл. 2.14). Всего в молекуле хемокинов имеется 4 остатка цистеина, образующих 2 дисульфидные связи. Два остатка цистеина, участвующие в формировании этих связей, расположены вблизи N-конца молекулы. В хемокинах одной группы, обозначаемой как  $\alpha$ - или СХС-хемокины, упомянутые остатки цистеина (С) разделены любым аминокислотным остатком (Х). В хемокинах другой большей группы, обозначаемой как  $\beta$ - или СС-хемокины, остатки цистеина следуют друг за другом. Существует еще две минорные группы:  $\gamma$ - или С-хемокины и  $\delta$ - или СХ<sub>3</sub>С-хемокины. С-хемокины имеют всего 2 остатка цистеина, один из которых расположен вблизи N-конца. В единственном представителе СХ<sub>3</sub>С-хемокинов (фракталин) N-концевые остатки цистеина разделены 3 любыми остатками. Всего к настоящему времени описано 16 хемокинов группы СХС, 28 — группы СС, 2 — группы С и 1 — группы СХ<sub>3</sub>С. Разделение на группы отнюдь не формально. Внутри групп гомология первичной структуры значительно выше (достигает 70–90%), чем между группами (не превышает 40%). Рецепторы хемокинов в пределах группы сходны между собой и отличаются от рецепторов хемокинов другой группы. Хемокины разных групп различаются спектром мишеней: СС-хемокины привлекают моноциты и лимфоциты, но не нейтрофилы, а СХС-хемокины — нейтрофилы, реже лимфоциты, но не моноциты. Наконец, гены хемокинов у человека расположены в разных хромосомах: гены СХС-хемокинов — в 4q, СХ — в 1q, СХ<sub>3</sub>С — в 16q, гены большинства СС-хемокинов — в 17q.

Среди СХС-хемокинов дополнительно выделяют 2 подгруппы, в зависимости от наличия в их молекуле перед первым остатком цистеина трипептидной последовательности Glu–Leu–Arg (в однобуквенном коде — ELR). Эта последовательность характерна для восьми СХС-хемокинов (СХС1–СХС8) и отсутствует у остальных (СХС9–СХС18). Наличие последовательности ELR обуславливает способность  $\alpha$ -хемокинов стимулировать ангиогенез (новообразование сосудов), воздействуя на эндотелиальные клетки.

В табл. 2.14 охарактеризованы представители основных групп хемокинов, а в табл. 2.15 — их рецепторы. Номенклатура хемокинов вначале создавалась стихийно, что вызывало большие трудности в связи с наличием у многих хемокинов синонимов. Именно поэтому недавно была введена единая классификация, основанная на обозначении групп (СС, СХС и т.д.), буквы L (лиганд, *Ligand*) и номера. Классификация хемокиновых рецепторов с самого начала была упорядочена; она включает обозначение группы, букву R (рецептор, *Receptor*) и номер. Выделяют 10 рецепторов СС-хемокинов, 7 рецепторов СХС-хемокинов и по 1 рецептору для хемокинов двух других групп.

Таблица 2.14. Характеристика хемокинов

Название	Синонимы	Молекулярная масса	Рецепторы	Клетки-мишени	Функция
<b>СХС-хемокины</b>					
CXCL1	GRO $\alpha$ ; MIP-2 $\alpha$	7,9	CXCR2; CXCR1	Н	Воспаление
CXCL2	GRO $\beta$ ; MIP-2 $\beta$	7,9	CXCR2	Н	Воспаление
CXCL3	GRO $\gamma$	7,9	CXCR2	Н	Воспаление
CXCL4	PF-4	7,8	Нет данных	Ф	?
CXCL5	ENA-78	8,4	CXCR2	Н	Воспаление
CXCL6	GCP2	8,3	CXCR1; CXCR2	Н	Воспаление
CXCL7	NAP-2	7,6	CXCR1; CXCR2	Н	Воспаление
CXCL8	IL-8	8,4–8,9	CXCR1, CXCR2	Н	Воспаление
CXCL9	MIG	11,7	CXCR3	Т-акт (Th1), НК, М, ЭК	Гомеостаз, ангиогенез
CXCL10	IP-10	8,6	CXCR3	Т-акт (Th1), НК, М, ЭК	Гомеостаз, ангиогенез
CXCL11	I-TAC	8,3	CXCR3	Т-акт (Th1), НК, М, ЭК	Гомеостаз, ангиогенез
CXCL12	SDF-1	8,0;8,5	CXCR4	ЭК, все лейкоциты	Гомеостаз, ангиогенез
CXCL13	BCA, BLC	10,3	CXCR5	В, ЭК	Гомеостаз, ангиогенез
CXCL14	BRAK	9,4	Нет данных	М, ЭК	Воспаление, ангиогенез
CXCL15*	<i>Lungkine</i>	Нет данных	Нет данных	Н, ЭК	Воспаление, ангиогенез
CXCL16	SIC	10,2	CXCR6	Т-акт, ЭК	Гомеостаз, ангиогенез
<b>СС-хемокины</b>					
CCL1	I-309	8,5	CCR8	ДК, Т-акт (Th2)	Воспаление
CCL2	MCP-1	8,7	CCR2	В, М, Т-акт (Th1), НК, ДК	Воспаление
CCL3	MIP-1 $\alpha$	7,7	CCR1, CCR2	Эо, Т-акт (Th1), М, НК, ДК	Воспаление
CCL4	MIP-1 $\beta$	7,8	CCR5	М, Т-акт (Th1), НК, ДК	Воспаление
CCL5	RANTES	7,9	CCR1, CCR3, CCR5	Эо, В, Т-акт (Th1), М, НК, ДК	Воспаление
CCL6*	C-10		CCR1, CCR2, CCR3	М, Т-акт (Th1)	Воспаление
CCL7	MCP-3	9,0	CCR1, CCR2, CCR3	Эо, В, Т-акт (Th1), М, НК, ДК	Воспаление

Окончание табл. 2.14

Название	Синонимы	Молекулярная масса	Рецепторы	Клетки-мишени	Функция
CCL8	MCP-2	8,9	CCR1, CCR3, CCR5	В, М, Т-акт (Th1), НК, ДК	Воспаление
CCL9/10*	MIP-1 $\gamma$		CCR1	Н, Т-акт	Воспаление
CCL11	Eotaxin	8,4	CCR3	Эо, В, Т-акт (Th2), ДК	Воспаление
CCL12*	MCP-5		CCR2	В, М, Т-акт, НК, ДК	Воспаление
CCL13	MCP-4	8,6	CCR1, CCR2, CCR3	Эо, В, Т-акт (Th1), М, НК, ДК	Воспаление
CCL14	HCC-1	8,7	CCR1	Эо, М	Воспаление
CCL15	HCC-2, MIP-1 $\delta$	9,2	CCR1, CCR3	Н, М, Эо,	Воспаление
CCL16	HCC-4, LEC	11,2	CCR1	М, Т-акт,	Воспаление
CCL17	TARC	8,1	CCR4	Т-акт (Th2)	Воспаление, гомеостаз
CCL18	PARC, MIP-4	7,9	CCR3	Т, ДК	Гомеостаз
CCL19	ELC	8,8	CCR7	Т, ДК	Гомеостаз
CCL20	LARC	8,0	CCR6	Т, В, ДК	Гомеостаз
CCL21	SLC	12,3	CCR7	Т, ДК	Гомеостаз
CCL22	MDC	8,1	CCR4	Т-акт (Th2), ДК	Гомеостаз
CCL23	MIP-3	11,4	CCR1	Н, М, Т	Воспаление
CCL24	Eotaxin-2	10,5	CCR3	Эо, В, Т-акт (Th2), ДК	Воспаление
CCL25	TECK	14,2	CCR9	Т, тимоциты	Гомеостаз
CCL26	Eotaxin-3	8,4	CCR3	Эо, В, Т-акт (Th2), ДК	Воспаление
CCL27	CTACK	10,2	CCR3, CCR2, CCR10	Т-акт	Гомеостаз
CCL28	MEC	12,4	CCR10	Т-акт	Гомеостаз
<b>С-хемокины</b>					
XCL1	<i>Lymphotactin</i>	10,3	XCR1	Т	Гомеостаз
XCL2	SCM-1 $\beta$	10,3	XCR2	Т	Гомеостаз
<b>CX<sub>3</sub>С-хемокины</b>					
CX3CL1	<i>Fractalkine</i>	8,6	CX <sub>3</sub> CR1	Т-акт, НК, М	Гомеостаз

\* — у человека не обнаружен; Н — нейтрофилы; Эо — эозинофилы; М — моноциты; ДК — дендритные клетки; ЭК — эндотелиальные клетки; Т — Т-лимфоциты; Т-акт — активированные Т-лимфоциты (субклассов Th1 или Th2); В — В-лимфоциты; НК — NK-клетки; Ф — фибробласты.

Таблица 2.15. Рецепторы хемокинов

Рецептор	Лиганды	Распределение
CXCR1	CXCL6, CXCL7, CXCL8	Нейтрофилы
CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8	Нейтрофилы
CXCR3	CXCL9, CXCL10, CXCL11	Нейтрофилы, Th1-клетки
CXCR4	CXCL12	Все лейкоциты
CXCR5	CXCL13	В-лимфоциты
CXCR6	CXCL16	Активированные Т-клетки
CXCR7	CXCL12	Все лейкоциты
CCR1	CCL3, CCL5, CCL7, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL23	Моноциты, эозинофилы, дендритные клетки, NK-клетки, активированные Т-клетки
CCR2	CCL2, CCL7, CCL8, CCL13, CCL16	Моноциты, эозинофилы, дендритные клетки, NK-клетки, активированные Т-клетки (Th1)
CCR3	CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL16, CCL24, CCL26, CCL28	Моноциты, эозинофилы, дендритные клетки, NK-клетки, активированные Т-клетки (Th2)
CCR4	CCL17, CCL22	Th2-клетки
CCR5	CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL11, CCL14, CCL16	Моноциты, эозинофилы, дендритные клетки, NK-клетки, активированные Т-клетки (Th1)
CCR6	CCL20	Дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты
CCR7	CCL19, CCL21	Дендритные клетки (зрелые), наивные Т-клетки
CCR8	CCL1	Дендритные клетки, Th2-клетки
CCR9	CCL25	Тимоциты, Т-клетки
CCR10	CCL27, CCL28	Активированные Т-клетки
XCR1	XCL1, XCL2	Т-клетки
CX <sub>3</sub> CR1	CX <sub>3</sub> CL1	Моноциты, активированные Т-клетки, NK-клетки

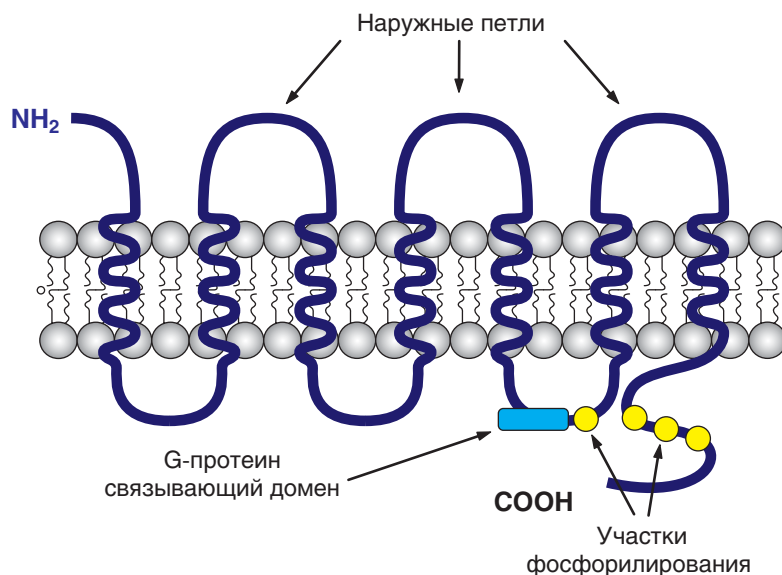
По функциональной роли выделяют:

- гомеостатические хемокины;
- провоспалительные хемокины.

Гомеостатические хемокины отвечают за распределение клеток (прежде всего лимфоцитов) по лимфоидным органам. К этим цитокинам относят CXCL12, CXCL13, CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL25, CCL27, CCL28, а также CX<sub>3</sub>CL, XCL1 и XCL2. Остальные хемокины (подавляющее большинство) относят к группе провоспалительных, поскольку они отвечают за активацию клеток и привлечение их в очаг воспаления. Хемокины этих групп различаются условиями синтеза и секреции: гомеостатические цитокины секретируются постоянно, обычно стромальными и эндотели-

альными, иногда дендритными клетками, реже — самими лимфоцитами. Хемокины определяют миграцию клеток иммунной системы в процессе их созревания. Так, хемокины обуславливают «заселение» тимуса лимфоидными клетками-предшественниками, направление миграции тимоцитов в процессе созревания внутри тимуса и последующую эмиграцию Т-клеток в периферические отделы иммунной системы. Аналогично хемокины определяют направление миграции дендритных клеток на разных этапах их созревания: сначала — движение клеток из кровотока в барьерные ткани, а затем перемещение в Т-зоны региональных лимфатических узлов. В лимфоидных органах разные участки стромы секретируют различные гомеостатические хемокины, что определяет их заселение разными типами лимфоцитов (Т-зоны — Т-клетками, а В-зоны — В-клетками). Это обеспечивает стабильность состава лимфоидных органов при непрерывной рециркуляции лимфоцитов.

Хемокиновые рецепторы, как и рецепторы других «профессиональных» хемотаксических агентов, относят к семейству родопсिनотипических рецепторов. Они 7-кратно пронизывают мембрану  $\alpha$ -спирализованными участками (7-трансмембранные рецепторы) (см. рис. 2.20). N-конец молекулы рецептора и 3 петли обращены наружу и участвуют (особенно N-конец) в распознавании и связывании хемокина-лиганда. С-конец и 3 петли обращены внутрь клетки. С внутриклеточными петлями рецептора связаны G-белки (белки, связывающие гуаниннуклеотиды), что определяет обозначение этих рецепторов как GPCR (*G protein-coupled receptor*). Роль G-белков в передаче хемокиновых сигналов в клетку будет рассмотрена далее. Хемокиновые рецепторы обладают высоким сродством к лигандам (порядка  $10^{-9}$  М). Сродство основано на взаимодействии домена сердцевины хемокина с N-концевой



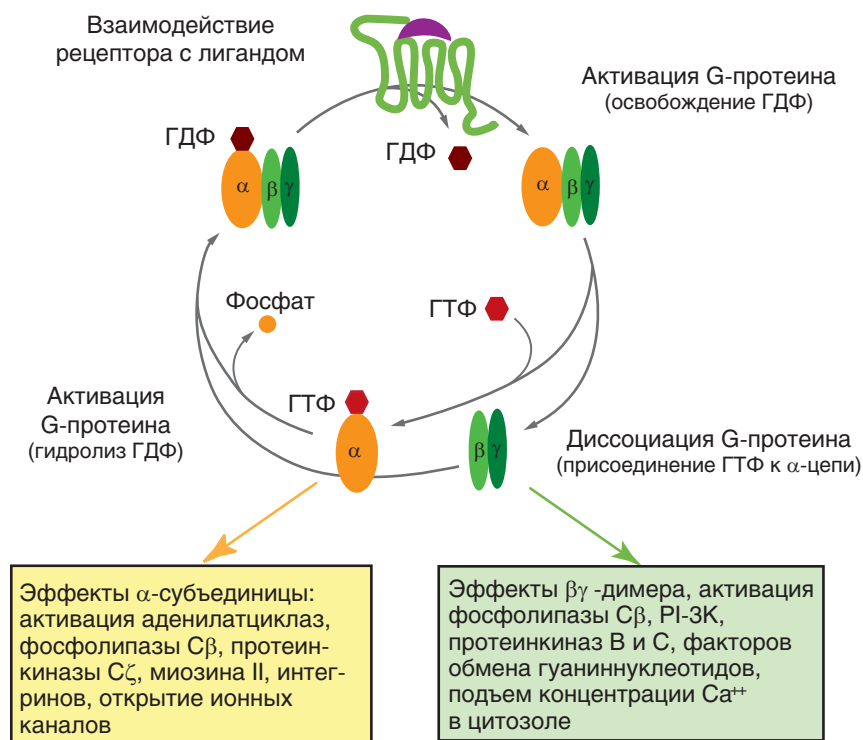
**Рис. 2.20.** Структура рецептора для хемокинов, его положение в клеточной мембране и связь с G-белком

частью рецептора. Пептиды, воспроизводящие фрагменты этих участков хемокина и рецептора, используют как инструменты для модификации эффектов хемокинов. Специфичность хемокиновых рецепторов характеризуется вырожденностью: с одним и тем же рецептором взаимодействует до 10 хемокинов (например, в случае CCR3). Только единичные рецепторы имеют один лиганд (см. табл. 2.15). С другой стороны, системе хемокинов свойственна избыточность: один и тот же хемокин может взаимодействовать с разными рецепторами, как, например, CXCL8/IL-8, распознаваемый рецепторами CXCR1 и CXCR2. Как правило, гомеостатические и провоспалительные хемокины взаимодействуют с разными рецепторами.

При взаимодействии хемокинов с их рецепторами на поверхности клетки происходит димеризация рецепторов. Вслед за этим запускаются события, вовлекающие G-белки, связанные с гуаниннуклеотидами. Функция G-белков состоит в регуляции внутриклеточных сигнальных процессов, осуществляемой за счет обратимых переходов ГТФ↔ГДФ. G-белки чувствительны к токсину столбняка, инактивирующему передачу сигнала от этих рецепторов внутрь клетки, обусловленную обменом ГТФ↔ГДФ и молекулярными превращениями белка G. G-белки — тримерные молекулы, содержащие цепи G $\alpha$ , G $\beta$  и G $\gamma$ . G $\alpha$ -цепь связана с ГДФ. Конформационные изменения, происходящие в рецепторе при связывании хемокина, и его фосфорилирование под влиянием тирозинкиназ обуславливают замещение ГДФ на ГТФ, что вызывает выход G $\alpha$ -цепи из состава комплекса и переход ее в цитозоль. G $\beta$ - и G $\gamma$ -цепи остаются в составе димера, связанного с мембраной. Разделившиеся компоненты G-белка действуют затем самостоятельно (рис. 2.21). Их эффекты состоят в активации ряда протеинкиназ (тирозинкиназы семейства Src, серинтреониновой протеинкиназы C, липидной фосфатидилинозитол 3-киназы), а также ГТФ-связывающих белков и ГТФаза.

Достаточно подробно изучена роль димера  $\beta\gamma$ . Он активирует 2 фермента — фосфолипазу C (PLC) (изоформа  $\beta$ ) и фосфатидилинозитол-3-киназу (PI $_3$ K, изоформа  $\gamma$ ). Эти ферменты участвуют в функционировании различных сигнальных путей. Важнейший продукт, формирующийся из мембранных фосфоинозитидов под влиянием PLC, — инозитол 3,4,5-трифосфат. Действуя на рецепторы на поверхности мембраны эндоплазматического ретикулума, он вызывает раскрытие кальциевых каналов и выход в цитозоль депонированного Ca $^{2+}$ . Другой продукт превращения фосфоинозитидов — диацилглицерол — активирует некоторые изоформы серинтреониновой протеинкиназы C, участвующей во многих внутриклеточных процессах. Это звено важно для обеспечения активации клетки, но непосредственно не связано с основным результатом действия хемотаксических факторов — влиянием на цитоскелет. Оно будет рассмотрено более подробно в разделе 3.5.2.1.

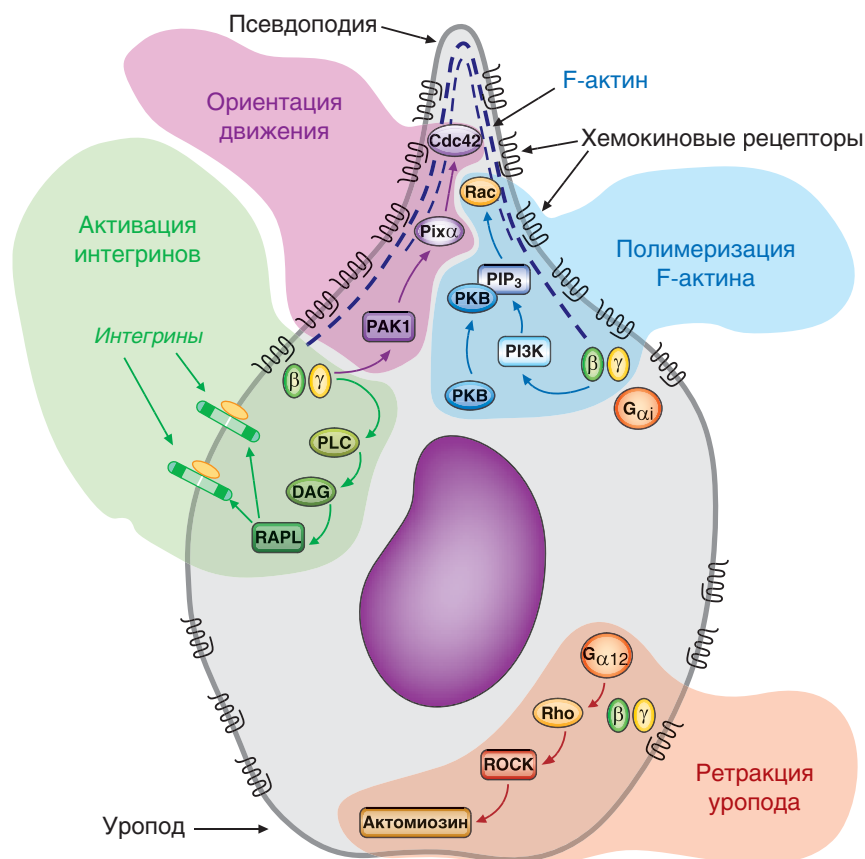
Активация цитоскелета происходит с вовлечением сигнальных путей, зависимых и не зависимых от PI-3K. Фосфатидилинозитол-3-фосфат активирует протинкиназу B (Akt), а также низкомолекулярные гуаниннуклеотидсвязывающие белки семейства Rh0, (Rho, Rap1 и Cdc42); их называют факторами обмена гуаниннуклеотидов — GEF (*Guanine-nucleotide exchange factors*). Обеспечивая превращение ГДФ в ГТФ эти белки активируют малую ГТФазу Ras — незаменимый фактор клеточной миграции. Ras реализует свою активность через взаимодействие с факторами, контролирующими



**Рис. 2.21.** Активация и интаивация G-белков, связанных с рецепторами, и вызываемые ими биологические эффекты

актин (WASP, WIP, Arp1/2, миозин II). В результате происходит полимеризация мономерного G-актина с его превращением в F-актин (филаментозный) (рис. 2.22). Актин составляет основу микрофиламентов и служит главным сократительным белком клетки, от которого зависит ее движение, формирование контактов и фагоцитоз. Направленность движения клетки определяется активностью GEF-белка Cdc42, обеспечивающего формирование F-актина и удаление некоторых ингибиторов из лидирующего края клетки. Для проявления Cdc42 своей активности необходим белок RAC-1. В результате локального образования F-актина формируется **ламеллоподия**, в которую перемещается значительная часть актина и действующих факторов локомоции. Поляризация клетки и активация интегринов (обеспечивает усиление адгезии клеток к субстрату и объектам фагоцитоза) происходит при участии еще одного из упомянутых GEF-белков — Rap1.

Роль комплекса  $\alpha$ -цепи G-белка с ГТФ изучена менее подробно; ее можно расценивать как вспомогательную. Комплекс участвует в подготовке клетки к миграции. При этом происходит активация Rho-GEF, участвующего в активации изоформы  $\zeta$  протеинкиназы C (контролирует состояние интегринов), а также в активации сократительного белка миозина II, что необходимо для реализации сократительной активности микрофиламентов. Помимо роли в сокращении цитоскелета, комплекс  $\alpha$ -цепи и ГТФ участвует



**Рис. 2.22.** Внутриклеточная передача сигнала и внутриклеточные процессы, обеспечивающие направленное движение клетки. Для осуществления хемотаксиса необходимы: полимеризация актина, регистрация градиента хемокина, усиление опосредованной интегринами адгезии и ретракция уророда вследствие формирования актинмиозиновых комплексов и их сокращения

в активации интегринов. Поскольку  $G\alpha$ -цепь обладает слабой ГТФазной активностью, ГТФ в составе комплекса превращается в ГДФ, и  $G\alpha$ -цепь воссоединяется с димером  $G\beta\gamma$ . Образующийся тример восстанавливает свою связь с хемокиновым рецептором и передача сигнала прекращается.

Таким образом, связывание хемотаксических факторов с рецепторами сопряжено с активацией интегринов, усилением адгезии, поляризацией клеток, образованием полимерной формы актина (F-актина), формированием двигательного псевдоподия (ламеллоподия) и, наконец, контракцией актомиозина, обеспечивающей движение клетки.

### 2.3.2.3. Хемокины в очаге воспаления. Интерлейкин-8 и другие провоспалительные хемокины

Провоспалительные хемокины продуцируются миелоидными (моноциты, макрофаги) и эндотелиальными клетками после их активации. В очагах

воспаления в синтезе хемокинов участвуют и активированные эпителиальные клетки. Стимул к выработке хемокинов — прямое действие патогенов, распознаваемых в основном TLR, а также действие провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-17 и т.д.). В этом отношении провоспалительные хемокины ничем не отличаются от других провоспалительных цитокинов. Хотя эти хемокины преимущественно индуцибельные, они могут нарабатываться заранее, связываясь с глюкозаминогликанами, храниться в гранулах (в нейтрофилах, эозинофилах, цитотоксических Т-клетках) и выбрасываться при дегрануляции клетки. При активации лимфоциты (особенно Т-клетки) тоже секретируют хемокины. Уже упоминалось, что иммобилизация хемокинов глюкозаминогликанами межклеточного матрикса и на поверхности клеток необходима для формирования их градиента, обеспечивающего направленность миграции.

К провоспалительным хемокинам относят лиганды рецепторов CXCR1, CXCR2, CXCR3, CCR1, CCR2, CCR3 и CCR5. Хемокиновые рецепторы обычно экспрессируются конститутивно, т.е. перемещение клеток при воспалении ограничено не рецепторным аппаратом клеток, а секретируемыми хемокинами. Спектры реактивности рецепторов провоспалительных хемокинов обычно широки и сильно перекрываются, однако они все-таки обладают некоторым своеобразием. Это определяет разнообразие клеток, привлекаемых в очаг при различных типах воспаления (острое, хроническое, классическое макрофагальное или аллергическое эозинофильное и т.д.). При воспалении хемокины играют роль не только хемотаксических факторов. Очень важно их участие в активации лейкоцитов, особенно на этапе вовлечения их в процесс миграции.

Решающую роль в привлечении нейтрофилов в начальном периоде острого воспаления играют СХС-хемокины. Среди них к группе провоспалительных факторов относят СХС-хемокины с порядковыми номерами 1–8 (только включение в эту группу CXCL4 вызывает сомнения), взаимодействующие с CXCR1 и CXCR2. Особую подгруппу образуют 3 лиганда CXCR3, секреция которых индуцируется IFN $\gamma$  — MIG, IP-10 и ITAC. По ряду свойств они занимают промежуточное положение между СХС- и СС-хемокинами: их мишени не только нейтрофилы, но и моноциты, а также активированные Т-клетки и Т-клетки памяти, преимущественно ориентированные на клеточный иммунный ответ (Th1-клетки).

Самый изученный и, вероятно, самый важный среди провоспалительных хемокинов — IL-8. Он относится к СХС-хемокинам и имеет характерную третичную структуру (2  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -слой). Существуют варианты молекулы, различающиеся по длине (от 69 до 77 остатков; основной вариант — 72 остатка). Такие различия определяются природой протеаз, осуществляющих процессинг молекулы. Молекула IL-8 содержит 2 дисульфидные связи. В жидкой фазе она существует преимущественно в виде димера. Как и другие хемокины, IL-8 обладает сродством к глюкозаминогликанам, в том числе к гепарансульфату, присутствующему в тканях. Благодаря этому значительная часть IL-8 иммобилизуется, что очень важно для формирования градиента его концентрации в тканях.

Многие клетки способны вырабатывать IL-8, однако основные его продуценты — моноциты, макрофаги и эндотелиальные клетки. Описана секреция

IL-8 тучными и эпителиальными клетками, лимфоцитами, фибробластами и некоторыми другими клетками. Условия выработки IL-8 — активация клеток микроорганизмами и вирусами и их продуктами, провоспалительными цитокинами (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и др.), некоторыми другими медиаторами воспаления (компоненты комплемента, кинины и т.д.) и факторами тромбообразования. Ген IL-8 входит в группу генов, активируемых при участии NF- $\kappa$ B и других активационных транскрипционных факторов. Хемокин выявляют в секрете клеток через 2–3 ч после активации. Эндотелиальные клетки, а также нейтрофилы могут накапливать пресинтезированный IL-8 и быстро (через 10–15 мин) выделять его при активации.

IL-8 распознают 2 рецептора — CXCR1 (связывает только IL-8) и CXCR2 (связывает также некоторые другие  $\alpha$ -хемокины). Основные клетки, экспрессирующие эти рецепторы, и главная мишень IL-8 — нейтрофилы. Показана способность IL-8 привлекать также эозинофилы, базофилы и Т-лимфоциты. Тем не менее главная функция IL-8 состоит в обеспечении экстравазации нейтрофилов и их направленной миграции в очаг воспаления. При этом в качестве источников IL-8 выступают как макрофаги воспалительного очага, так и эндотелиальные клетки сосудов в зоне воспаления. IL-8, вырабатываемый эндотелиальными клетками, обеспечивает привлечение нейтрофилов к сосудистой стенке и активацию их интегринов, а также инициируют эмиграцию клеток из сосуда. При этом IL-8 связан с поверхностью эндотелиальной клетки через глюкозаминогликаны. С эндотелием может связываться также IL-8, диффундирующий к сосудам из очага воспаления. Прикрепившись к базальной поверхности эндотелиоцита, IL-8 подвергается транцитозу и перемещается на апикальную поверхность клетки, обращенную в просвет сосуда. Градиент IL-8, формирующийся при его фиксации на межклеточном матриксе, обеспечивает выход нейтрофилов из сосудистого русла и миграцию этих клеток в очаг воспаления.

В очаге воспаления IL-8 продолжает проявлять свою активность. Он активирует находящиеся там нейтрофилы, способствует дегрануляции клеток, стимулирует выработку мононуклеарами цитокинов. Действие IL-8 на кислородный метаболизм выражено слабее, чем у провоспалительных цитокинов. Важный эффект IL-8 — его ангиогенное действие, особенно важное не только при развитии воспаления, но и при заживлении ран.

Аналогичную роль в привлечении и активации нейтрофилов играют другие  $\alpha$ -хемокины. Однако детальные проявления их функциональной активности, а также «разделение труда» между ними изучены недостаточно. Уже упоминалось, что некоторые CXC-хемокины, содержащие в своем составе последовательность ELR (Glu–Leu–Arg) обладают ангиогенными свойствами, т.е. способствуют размножению эндотелиальных клеток и образованию новых сосудов в очаге воспаления. Остальные CXC-хемокины не просто лишены ангиогенной активности — они проявляют антиангиогенное действие, с чем связано их противоопухолевое действие.

Среди CC-хемокинов выделяют несколько подгрупп. К провоспалительным цитокинам относят CCL с номерами 3–6, 14–16, 18 и 23. Основная мишень для большинства этих хемокинов — моноциты; для CCL5 (RANTES, от *Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*) — активированные Т-клетки и Т-клетки памяти. Этим факторам принадлежит ключевая роль на

поздних этапах любой воспалительной реакции, а также при развитии хронического воспаления. Подгруппу аллергических хемокинов образуют CCL с номерами 1, 2, 7, 8, 11–13, 24 и 26. Большинство из них обладает способностью привлекать эозинофилы или базофилы и вызывать выброс гистамина. Аллергическим хемокинам также присуща провоспалительная активность, реализуемая через их способность привлекать и активировать моноциты. Другие подгруппы CC-хемокинов непосредственно не участвуют в развитии воспаления. Это хемокины, связанные с развитием клеток (представленные в тимусе CCL17, CCL22, CCL25), и гомеостатические хемокины (CCL19, CCL20, CCL21), ответственные за упорядоченное распределение лимфоидных и дендритных клеток во вторичных лимфоидных органах (см. раздел 3.4.2.5). Единственный представитель семейства CX3C-хемокинов — фракталкин (синтезируется эндотелиальными клетками и связан с их мембраной) — сходен по составу клеток-мишеней и функциям с CC-хемокинами.

Спектр клеток-мишеней CC-хемокинов шире, чем у CX3C-хемокинов. Способность CC-хемокинов привлекать моноциты находит отражение в названии пяти из них — хемотаксические белки моноцитов (MCP — от *Monocyte chemotactic protein*). Однако большинство из провоспалительных CC-хемокинов служит хемотаксическими факторами и для дендритных клеток, В-лимфоцитов, NK-клеток, Т-клеток памяти и активированных Т-лимфоцитов (в ряде случаев CC-хемокины избирательно действуют на субклассы Т-клеток — Th1 и Th2). Наряду с хемотаксическим действием эти хемокины стимулируют провоспалительную активность моноцитов и макрофагов. Этому соответствует обозначение шести CC-хемокинов как воспалительных белков макрофагов (MIP — от *Macrophage inflammation protein*). Способность привлекать в очаг воспаления эозинофилы дала название трем эотаксинам (CCL11, CCL24, CCL26).

Среди 20 провоспалительных хемокинов группы CC ключевая роль в инициации и развитии воспалительных процессов, обусловленных преимущественной активностью моноцитов, принадлежит двум факторам: CCL2 (MCP-1) и CCL5 (RANTES). Удаление этих факторов с помощью моноклональных антител или «выключения» соответствующих генов приводит к ослаблению воспалительного процесса и рассматривается как потенциальный терапевтический подход при некоторых воспалительных заболеваниях. Показана роль CCL2 и CCL5 в патогенезе атеросклероза и противоопухолевой защите. При аллергии защитного эффекта достигают при воздействии на хемокины CCL11 (эотаксин) и CCL5.

Из данных о спектре клеток-мишеней провоспалительных CC-хемокинов следует, что функциональная роль хемокинов проявляется не на начальных фазах острого воспаления, а в более поздние его сроки, а также при хроническом воспалении и реализации иммунологической или аллергологической составляющих воспалительной реакции. Иными словами, если роль CX3C-хемокинов проявляется практически исключительно в рамках врожденного иммунитета, то CC-хемокины во многом служат факторами, интегрирующими врожденный и адаптивный иммунитет.

### 2.3.3. Эмиграция и хемотаксис лейкоцитов

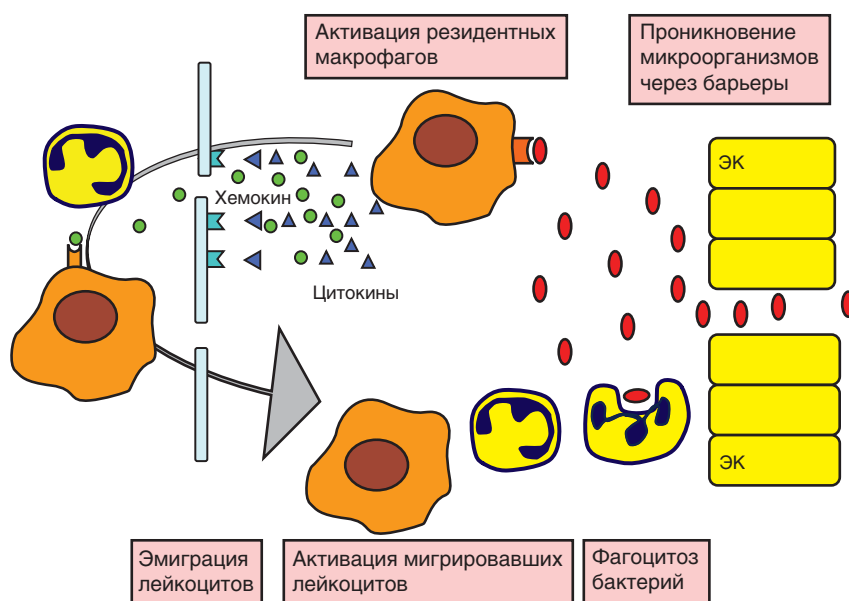
При развитии воспаления под влияние провоспалительных факторов быстро попадают клетки эндотелия мелких сосудов — капилляров и

посткапиллярных венул. В качестве факторов при этом выступают прежде всего цитокины, секретируемые макрофагами и другими вовлекаемыми в воспаление клетками, —  $IL-1\beta$  и  $TNF\alpha$  (рис. 2.23). Эндотелиальные клетки конститутивно экспрессируют рецепторы для этих цитокинов. Под влиянием цитокинов происходит активация эндотелиальных клеток с трансформацией из плоских в высокие клетки и экспрессией ряда мембранных молекул, включая Р- и Е-селектины, рецепторы L-селектинов (адрессины) и интегринов (ICAM-1, VCAM-1), а также секрецией провоспалительных цитокинов и хемокинов.

На лейкоцитах крови конститутивно экспрессированы L-селектины, рецепторы для Р- и Е-селектинов (PSGL-1 и другие адрессины), а также интегрины LFA-1, Mac-1, p150,95 и  $\alpha_D\beta_2$ , находящиеся в неактивной (свернутой) форме. Взаимодействие молекул адгезии лейкоцитов и активированных клеток эндотелия служит основой процесса эмиграции лейкоцитов из кровяного русла. Процесс осуществляется в 4 стадии (рис. 2.24).

- Стадия 1 (стадия качения). В описанной выше исходной ситуации имеются условия для взаимодействия L-селектинов лейкоцитов пристеночного слоя с адрессинами на эндотелиальных клетках, а также Е- и Р-селектинов эндотелиальных клеток с адрессинами лейкоцитов. Поскольку это взаимодействие слабое (из-за невысокого сродства и легкого смывания селектинов

#### Первичная реакция на инфицирование



**Рис. 2.23.** Первичная реакция местных клеток на поступление патогена. Под влиянием патогенов макрофаги и другие местные клетки активируются, секретируют цитокины и хемокины. Цитокины определяют изменение свойств клеток эндотелия сосудов (они активируются и сами продуцируют хемокины), что позволяет лейкоцитам мигрировать через сосудистую стенку и далее — в направлении очага воспаления. Микроорганизмы фагоцитируются в очаге поражения нейтрофилами и моноцитами

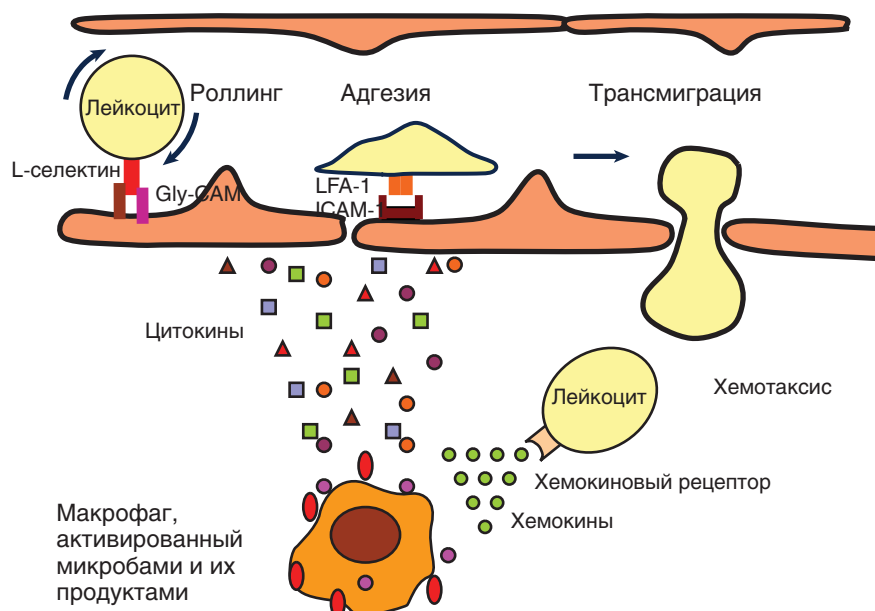


Рис. 2.24. Схема транссудистой миграции лейкоцитов

- с поверхности клеток), лейкоциты взаимодействуют с клетками сосудистой стенки непрочны и клетки перекатываются вдоль стенки капилляра или вены по направлению тока крови. Эта фаза занимает 1–5 с.
- Стадия 2 (**стадия активации**). Хемокины, продуцируемые эндотелиальными клетками (IL-8 и др.), воздействуют на рецепторы лейкоцитов и вызывают их активацию с участием ГТФ-связывающих белков семейства Rho. Одновременно с этим происходит слабое взаимодействие неактивных молекул LFA-1 и других лейкоцитарных интегринов с их рецепторами, экспрессированными под влиянием цитокинов на поверхности эндотелиальных клеток. При этом генерируется сигнал типа «снаружи внутрь» (см. раздел 2.3.1.2) и происходит «активация интегринов» — разворачивание молекулы и «открытие» ее головной части, что многократно повышает сродство интегринов к их рецепторам. Эта стадия занимает до 20 с.
  - Стадия 3 (**стадия прочной адгезии**). В результате описанных выше изменений взаимодействие лейкоцитарных интегринов с рецепторами эндотелиальных клеток становится прочным, и клетки останавливаются. Во взаимодействии со стороны лейкоцитов участвуют преимущественно молекулы LFA-1, а со стороны эндотелия — ICAM-1. Эта стадия длится несколько минут.
  - Стадия 4 (**стадия экстравазации**). После остановки лейкоцит становится доступным для хемотаксических сигналов, поставляемых хемокинами и другими хемотаксическими факторами (пептиды fMLP, C3a, C5a, лейкотриен D4 и др.). В продвижении между эндотелиальными клетками решающая роль принадлежит гомотипическим (подобное с подобным) взаимодействиям 2 типов, осуществляемых молекулами PECAM (CD31) и CD99. PECAM

участвует в проникновении лимфоцита в межэндотелиальное пространство и выходе из него, а CD99 — в преодолении зоны контакта между эндотелиальными клетками. Экстравазация лейкоцита занимает до 10 мин.

Дальнейшее продвижение лейкоцитов осуществляется за счет адгезивных взаимодействий с межклеточным матриксом и хемотаксического вектора, задаваемого гуморальными факторами, исходящими из очага воспаления. В адгезивных взаимодействиях участвуют  $\beta_1$ -интегрины лейкоцита (молекулы серии VLA) и белки матрикса — фибронектин, ламинин, коллаген. Наиболее важные хемотаксические агенты — факторы, вызывающие экстравазацию: бактериальные пептиды fMLP, а также группа эндогенных хемотаксических факторов, синтезируемых *de novo* в очаге воспаления (преимущественно макрофагами) или образующихся при расщеплении других факторов (компонентов комплемента). К эндогенным хемотаксическим факторам относятся фрагменты компонентов комплемента C3a, C5a, липидные метаболиты (лейкотриен D4 и фактор агрегации тромбоцитов), а также хемокины. Как уже отмечалось, хемокины различаются по способности привлекать разные типы лейкоцитов. Особенно четко такие различия проявляются в отношении нейтрофилов и моноцитов. Хемотаксической активностью в отношении нейтрофилов обладают  $\alpha$ -хемокины (IL-8, факторы группы GRO и т.д.), а в отношении моноцитов —  $\beta$ -хемокины (факторы групп MCP и MIP).

Обязательное условие направленного движения клеток — градиент хемотаксических факторов. Показано, что перепад концентрации фактора должен составлять не менее 1% на дистанцию, равную диаметру клетки.

Однако наиболее важна для осуществления хемотаксиса активная направленная подвижность клеток. В основе движения лейкоцитов лежит реакция контрактильных белков цитоскелета, прежде всего актина. Мобилизация компонентов цитоскелета происходит при активации через родопсиноподобные рецепторы хемотаксических факторов (см. выше). Вследствие поляризации и происходящей при этом реорганизации цитоскелета клетка из округлой становится треугольной. В сторону объекта хемотаксиса выдвигается **ламеллоподий** — участок цитоплазмы, бедный органеллами, но содержащий сеть микрофиламентов, в частности нитчатый (*filamentous*) F-актин. Ориентацию клетки в процессе хемотаксиса определяет полимеризация микротрубочек, а процесс движения — сокращение микрофиламентов.

Некоторая часть мембранных гликопротеинов перемещается в сторону полюса поляризации, на котором значительно усиливается экспрессия  $\beta_2$ -интегринов. Аппарат Гольджи переориентируется в направлении движения клетки. Происходит конформационная перестройка (ремоделирование) фосфолипидов мембраны. При этом клетка секретирует эластазу, коллагеназу и катепсины, что способствует преодолению базальных мембран вокруг сосудов и под эпителиальными пластами, а также других «преград».

Как известно, раньше других клеток в очаг воспаления мигрируют нейтрофилы, существенно позже туда попадают моноциты. Однако скорость хемотаксического перемещения нейтрофилов и моноцитов сопоставима (около 15 мкм/мин, т.е. почти 1 мм/ч). Различия во времени их проникновения в очаг воспаления связаны в значительной степени с разной исходной локализацией: нейтрофилы преобладают в пристеночном слое сосудистого русла и быстрее начинают движение к очагу воспаления.

### 2.3.4. Фагоцитоз

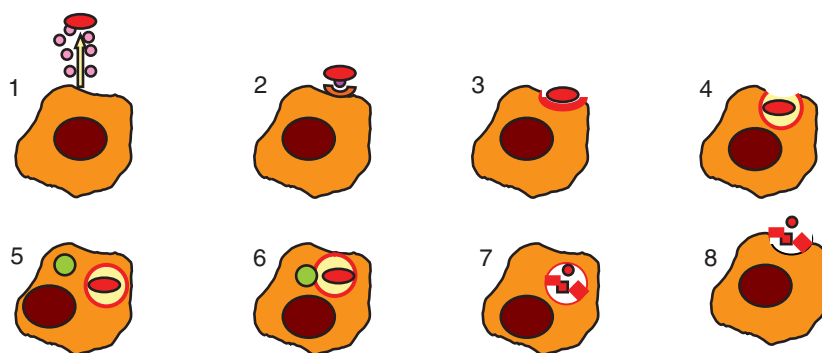
Под *фагоцитозом* понимают поглощение клеткой частиц размером более 0,5 мкм. Как уже отмечалось, явление фагоцитоза было открыто И.И. Мечниковым (1882). Он показал фундаментальную роль фагоцитоза как способа питания одноклеточных организмов, эволюционировавшую у многоклеточных в механизм защиты от чужеродных агентов. В настоящее время роль фагоцитоза в организме многоклеточных рассматривают еще шире: показано его участие в морфогенезе, элиминации клеток, погибающих по механизму апоптоза и т.д.

Традиционно выделяют 8 стадий фагоцитоза (табл. 2.16, рис. 2.25):

- приближение к объекту фагоцитоза в результате хемотаксиса;
- адгезия;
- активация мембраны;
- погружение;
- образование фагосомы;
- слияние фагосомы и лизосомы;
- киллинг и расщепление объектов фагоцитоза;
- выброс продуктов деградации.

**Таблица 2.16.** Стадии фагоцитоза

Стадия	Событие	Факторы клетки-мишени	Факторы фагоцита
Хемотаксис	Направленное движение фагоцита к объекту	Хемотаксины: бактериальные, C5a, C3a, хемокины, лейкотриены и др.	Рецепторы хемотаксических факторов, цитоскелет
Адгезия	Установление контакта (прилипание фагоцита к объекту)	Опонины (антитела, C3b, фибронектин), молекулы адгезии	Молекулы адгезии (интегрины и др.), рецепторы (FcγR, C3R и др.)
Активация мембраны	Подготовка к поглощению	Интегрины, опонины, защитные факторы микроорганизмов	Белки G, Ca <sup>2+</sup> , сигнальные факторы, киназы, цитоскелет
Погружение	Обволакивание объекта	Защитные факторы, препятствующие фагоцитозу	Цитоскелет (микрофиламенты)
Образование фагосомы	Замыкание мембраны и погружение	Не установлены	Цитоскелет (микротрубочки, микрофиламенты), мембрана
Образование фаголизосомы	Слияние фагосомы и лизосомы	Блокирующие агенты (подавляют слияние)	То же
Киллинг и переваривание	Гибель объекта и его переваривание	Факторы устойчивости	O <sub>2</sub> - и NO-зависимые факторы, катионные белки, пептиды, ферменты, закисление
Выброс продуктов деградации	Выброс содержимого фаголизосомы из клетки	Не установлены	Цитоскелет, мембрана



**Рис. 2.25.** Стадии фагоцитоза: 1 — хемотаксис; 2 — адгезия; 3 — активация мембраны; 4 — погружение; 5 — образование фагосомы; 6 — слияние фагосомы и лизосомы; 7 — киллинг и расщепление; 8 — выброс продуктов деградации

Хемотаксис фагоцитов рассмотрен нами выше, поскольку он связан с процессом эмиграции лейкоцитов из кровяного русла. Хемотаксис служит обязательной предпосылкой миграции, независимо от исходного положения фагоцита (в кровотоке, в очаге воспаления и т.д.). Хемотаксис можно рассматривать как дистантное взаимодействие фагоцита и его объекта. Благодаря предшествовавшему хемотаксису к началу фагоцитоза клетка оказывается поляризованной: нити цитоскелета и органеллы ориентированы в направлении источника хемотаксических сигналов (обычно — объекта фагоцитоза), а мембранные молекулы, необходимые для осуществления фагоцитоза, локализованы на полюсе клетки, обращенном к мишени.

Рассмотрим фагоцитоз с этапа адгезии, на котором клетки-участники фагоцитарного процесса взаимодействуют физически. В традиционный перечень стадий фагоцитоза внесены некоторые изменения, соответствующие современному пониманию молекулярных основ процесса фагоцитоза.

#### 2.3.4.1. Адгезия фагоцитов к объектам фагоцитоза. Феномен опсонизации

Обязательным условием адгезии фагоцита служит распознавание объекта фагоцитоза. Механизмы распознавания разнообразны и принципиально различаются в случаях фагоцитоза опсонизированного и неопсонизированного объектов. Основные разновидности рецепторов, вовлекаемых в процесс фагоцитоза, представлены в табл. 2.17.

**Таблица 2.17.** Рецепторы фагоцитов, участвующие в распознавании объекта фагоцитоза

Группа рецепторов	Разновидности	Клеточная локализация	Лиганд	Участие в фагоцитозе
<b>Без опсонизации</b>				
Рецепторы для интернализации	Маннозный рецептор (MR — CD206)	Незрелые миелоидные дендритные клетки, моноциты, макрофаги	Манноза, фукоза, глюкоза, N-ацетилглюкозамин	Фагоцитоз различных групп микроорганизмов

Продолжение табл. 2.17

Группа рецепторов	Разновидности	Клеточная локализация	Лиганд	Участие в фагоцитозе
	DEC-205	Незрелые миелоидные дендритные клетки, плазмоцитоидные дендритные клетки	Мананны	
	Dectin-1	Незрелые миелоидные дендритные клетки, плазмоцитоидные дендритные клетки, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, Т-клетки	β-Глюканы	
Рецепторы для апоптотических клеток	PSR (рецептор фосфатидилсерина)	Макрофаги и другие клетки	Фосфатидил-L-серин	Фагоцитоз апоптотических клеток
	Интегрин α <sub>v</sub> β <sub>3</sub>	Эндотелиальные клетки, макрофаги	Витронектин	Взаимодействуют друг с другом и растворимым тромбоспондином
Scavenger-рецепторы («мусорщики»)	SR-AI/II	Макрофаги, дендритные клетки	Липиды, полианионы	Фагоцитоз апоптотических клеток, для SR-A — также некоторых бактерий (кокки)
	CD36	Макрофаги, моноциты	Фосфатидил-L-серин	
С опсонизацией				
Fcγ-рецепторы	FcγRI (CD64)	Макрофаги, активированные нейтрофилы, активированные эозинофилы	Fc-IgG1, Fc-IgG3	Фагоцитоз объектов, опсонизированных IgG1- и IgG3-антителами
	FcγRIIA (CD32)	Нейтрофилы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, эозинофилы и др.		
	FcγRIII (CD16)	Нейтрофилы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, эозинофилы и др.		
Рецепторы для комплемента	CR1 (CD35)	Моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, В-клетки, эритроциты	iC3b	Фагоцитоз объектов, опсонизированных iC3b

Окончание табл. 2.17

Группа рецепторов	Разновидности	Клеточная локализация	Лиганд	Участие в фагоцитозе
	CR3 (CD11b/CD18; интегрин $\alpha_M\beta_2$ )	Моноциты, макрофаги, нейтрофилы, естественные киллеры, дендритные клетки	iC3b, фибриноген	
	CR4 (CD11c/CD18; интегрин $\alpha_I\beta_2$ )	Моноциты, макрофаги, естественные киллеры, дендритные клетки	iC3b, фибриноген	

В отсутствие опсонизации молекулярное распознавание, необходимое для прилипания фагоцитов к клеткам-мишеням, осуществляется в основном двумя группами рецепторов. Одна из этих групп — *scavenger*-рецепторы («мусорщики»), физиологически предназначенные для элиминации липопротеинов низкой плотности и способные распознавать липидные компоненты бактерий. Вторая группа участвует в элиминации апоптотических клеток:  $\alpha_v\beta_3$ -интегрин, распознающий витронектин, и рецептор фосфатидилсерина (оба лиганда появляются на поверхности клеток при нарушении асимметрии клеточной мембраны в процессе апоптоза). В качестве рецептора еще одной молекулы, экспрессируемой апоптотическими клетками, выступает тромбоспондин. Эта растворимая молекула кооперируется с двумя упомянутыми мембранными рецепторами: она первой связывается со своим лигандом и облегчает распознавание других маркеров апоптоза мембранными рецепторами профессиональных (макрофаги) и факультативных (эндотелиальные клетки) фагоцитов.

Распознавание фагоцитом предварительно опсонизированных клеток более типично для инфекционных процессов. Под опсонизацией (от греч. *οψωνεο* — подготавливать пищу) понимают обволакивание частицы молекулами, облегчающими ее распознавание и поглощение фагоцитом. Существует 2 основных варианта опсонизации: в одном случае опсонизирующие агенты — антитела класса IgG, а в другом — фрагмент C3-компонента комплемента iC3b. Часто оба фактора опсонизируют клетку совместно. Это неудивительно, поскольку антитела в составе иммунных комплексов активируют комплемент, что приводит к отложению на клетке-мишени C3b, расщепляющегося до iC3b (см. раздел 2.5.1). Однако опсонизация компонентами комплемента более распространена, поскольку активация комплемента возможна без участия антител (альтернативный и лектиновый пути) или с участием антител, для которых на фагоцитах нет рецепторов (например, IgM-антител). Своеобразный вариант опсонизации инертных частиц (частиц металла, пластика и т.д.) — обволакивание их белками межклеточного матрикса, в результате чего они становятся доступными для распознавания мембранными  $\beta_1$ -интегринами фагоцитов.

Лейкоциты, обладающие фагоцитарной активностью, несут на своей поверхности рецепторы для опсоинов, а также рецепторы-мусорщики и рецепторы, распознающие апоптотические клетки. Последний тип рецепторов широко распространен и свойственен не только «профессиональным» фагоцитам, но и ряду других клеток (эндотелиальные, эпителиальные и т.д.). Благодаря способности многих типов клеток элиминировать апоптотические клетки, не происходит «загрязнения» продуктами распада тканей, в которых в физиологических условиях происходит массовая гибель клеток путем апоптоза (например, при эмбриогенезе).

При распознавании рассмотренными рецепторами своих лигандов происходит сближение фагоцитов с их мишенями, обычно закрепляемое молекулами адгезии, в частности  $\beta_1$ -интегрином VLA-4 и  $\beta_2$ -интегрином LFA-1. На поверхности бактериальных клеток отсутствуют рецепторы интегринов (ICAM, VCAM, белки межклеточного матрикса), однако обычно присутствуют короткие аминокислотные последовательности, распознаваемые интегринными (например, последовательность RGD, распознаваемая некоторыми интегринными). Распознавание неопсонизированных патогенов затруднено. Опсонизация облегчает этот процесс.

#### 2.3.4.2. Рецепторы для распознавания опсоинов (Fc- и C3-рецепторы)

Некоторые из молекул, связанные с распознаванием объектов фагоцитоза, упомянуты выше. Рассмотрим 2 типа рецепторов, играющих основную роль в распознавании опсоинов, фиксированных на поверхности фагоцитируемых клеток: рецепторы для Fc-части иммуноглобулинов/антител (FcR) и рецепторы для комплемента (CR).

##### *Fc-рецепторы*

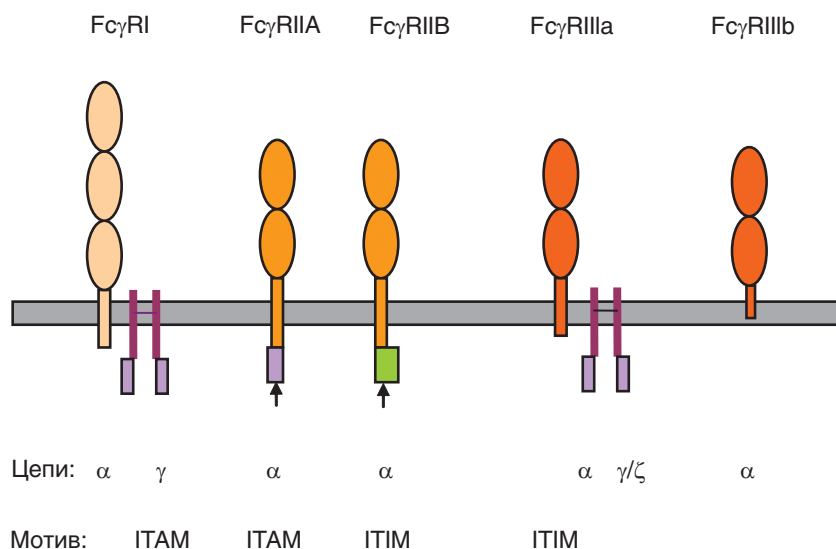
Распознавание патогенов и других клеток, опсонизированных антителами класса IgG, осуществляется с помощью Fc-рецепторов (FcγR), экспрессированных на поверхности фагоцитов. Эти рецепторы распознают участки хвостовой части (Fc, см. раздел 3.1.1.1) молекул иммуноглобулинов IgG-класса (в наибольшей степени субклассов IgG1 и IgG3). Эти участки расположены в C<sub>H</sub>2- и C<sub>H</sub>3-доменах γ-цепей иммуноглобулинов. В молекулах свободных антител они скрыты и открываются только при связывании с антигеном, сопровождающимся изменением конфигурации молекулы IgG. Кроме Fcγ-рецепторов, известны Fc-рецепторы, распознающие связанные антитела классов IgA и IgE (FcαR и FcεR). Функциональная роль Fc-рецепторов значительно шире их участия в распознавании объектов фагоцитоза, поэтому они будут многократно упоминаться в дальнейшем. Основные характеристики Fc-рецепторов представлены в табл. 2.18 и на рис. 2.26.

У человека выделяют 3 типа Fcγ-рецепторов — FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16); 2 последних типа существуют в нескольких вариантах, различающихся устройством C-концевой части. Перечисленные рецепторы отличаются друг от друга сродством к Fc-части молекулы IgG. В порядке убывания аффинности они образуют ряд: FcγRI > FcγRII > FcγRIII.

Таблица 2.18. Характеристика Fc-рецепторов

Традиционное обозначение	CD-номера-ция	Молекулярная масса, кДа	Экспрессия на клетках	Сродство к изотипам иммуноглобулинов	Аффинитет (Kd), М
FcγRI	CD64	72–75	Моноциты/макрофаги, активированные нейтрофилы, фолликулярные дендритные клетки	IgG1=IgG3 > IgG2 > IgG4	$10^{-8} - 10^{-9}$ *
FcγRII	CD32	40–50	Моноциты/макрофаги, нейтрофилы, В-клетки, эозинофилы, тромбоциты, дендритные клетки, активированные Т-клетки	IgG1=IgG3 > IgG3 > IgG4	$10^{-7}$
FcγRIII	CD16	50–65	Естественные киллеры, моноциты/макрофаги, активированные нейтрофилы, активированные эозинофилы, активированные Т-клетки	IgG1, IgG3	$10^{-6}$
FcαR	CD89	55–75	Нейтрофилы, активированные моноциты/макрофаги, активированные эозинофилы, Т-клетки, В-клетки	IgA	Нет данных
FcεRI	—	α — 29,6; β — 26,5; γ — 9,7	Тучные клетки, В-клетки, дендритные клетки, эозинофилы	IgE	$10^{-9} - 10^{-10}$ *
FcεRII	CD23	45–50	В клетки, активированные моноциты/макрофаги, эозинофилы, активированные Т-клетки, фолликулярные дендритные клетки	IgE	$10^{-7}$

\* — способны связывать нативные (не в составе комплекса с антигеном) молекулы антител.



**Рис. 2.26.** Строение мембранных Fc-рецепторов. Особо акцентировано наличие в цитоплазматической части рецепторов мотивов, передающих активационные (ITAM) или ингибирующие (ITIM) сигналы. Линии, соединяющие изображения цепей, обозначают дисульфидные связи

Наиболее высокоаффинный рецептор FcγRI состоит из двух полипептидных цепей. Цепь, связывающаяся с Fc-участком γ-цепи IgG (α-цепь), имеет 3 внеклеточных домена, относящихся к суперсемейству иммуноглобулинов. Ее цитоплазматический участок лишен последовательностей, позволяющих передавать сигнал внутрь клетки. Такая активационная сигнальная последовательность (участок ITAM — *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) есть в цитоплазматической части другой полипептидной цепи — γ-цепи, осуществляющей в связи с этим сигнальную функцию рецептора. FcγRI экспрессирован на покоящихся клетках только одного типа — макрофагах; нейтрофилы и эозинофилы начинают экспрессировать его после активации. Это единственный тип Fcγ-рецепторов, связывающий свободные антитела. Фиксация антител на FcγRI обуславливает формирование «армированных» макрофагов, несущих на поверхности антитела с активными центрами, направленными наружу.

Рецепторы FcγRII представлены более широко: они свойственны практически всем клеткам врожденного иммунитета, а также В-лимфоцитам. FcγRII тоже имеют одну α-цепь, содержащую 2 внеклеточных иммуноглобулинподобных домена. Внутриклеточный участок α-цепи FcγRII по протяженности превосходит аналогичные участки других Fc-рецепторов. Известно 2 варианта этих рецепторов — FcγRIIA и FcγRIIB, различающиеся особенностями строения их цитоплазматической части. FcγRIIA содержит в ней активационный мотив ITAM, а FcγRIIB — ингибирующий мотив

ITIM (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*). Фосфорилирование остатков тирозина в ITAM делает возможным взаимодействие его с тирозинкиназами семейства Syk, что служит основой для передачи активационного сигнала (см. раздел 3.5.2.1). Фосфорилирование тирозина в ITIM обеспечивает его взаимодействие с фосфатазами SHP1, SHP2 и SHIP, ослабляющими активационный сигнал и оказывающими ингибирующее действие (см. раздел 3.6.6.3). Рецепторы FcγRIIA присутствуют на поверхности фагоцитов различной природы и играют важную роль в распознавании опсонизирующих антител. Рецепторы FcγRIIB экспрессированы преимущественно на В-лимфоцитах и участвуют в регуляции их активности.

Низкоаффинные рецепторы FcγRIII имеют сложную структуру. Помимо основной α-цепи, имеющей 2 иммуноглобулинподобных внеклеточных домена, они содержат 2 дополнительные цепи, идентичные γ-цепям рецепторов FcγRI или FcεRI. Эти цепи несут участок ITAM. По особенностям структуры С-концевой части α-цепи эти рецепторы также неоднородны. Их основной вариант — FcγRIIIA — содержит α-цепь, имеющую полноценную трансмембранную и внутриклеточную части, причем последняя взаимодействует с γ-цепью, что позволяет рецептору передавать сигнал в клетку. Такой вариант рецептора характерен для естественных киллерных клеток, а также моноцитов, макрофагов и ряда других клеток. Альтернативный вариант — FcγRIIIB, содержащий α-цепь, заякоренную в мембране через гликозилфосфатидилинозитол. Этот вариант рецептора экспрессируется на нейтрофилах.

### **С3-рецепторы**

С3-рецепторы по своей структуре более гетерогенны, чем Fc-рецепторы. Известно 4 разновидности С3-рецепторов (табл. 2.19). CR1 (CD35) экспрессирован не только на классических фагоцитах (нейтрофилах, моноцитах), но и на ряде других клеток: В-лимфоцитах, эритроцитах, фолликулярных дендритных клетках. На последних CR1 участвует в связывании иммунных комплексов, т.е. выполняет важнейшую функцию, играющую ключевую роль в развитии гуморального иммунного ответа (см. раздел 3.5.2.2). Молекула CD35 связывает, помимо С3b, фрагмент С3d. Рецептор CR2 (CD21) имеет наиболее широкий спектр лигандов. Он связывает фрагменты С3, находящиеся на разных стадиях деградации — С3b, iС3b, С3d. Кроме того, CR2 служит рецептором вируса Эпштейна–Барр. Этот рецептор экспрессирован на В-лимфоцитах и фолликулярных дендритных клетках, но не на фагоцитах. Он не имеет отношения к фагоцитозу, но играет важную роль в активации В-клеток (см. раздел 3.6.2.1) и процессах гуморального ответа, происходящих в зародышевых центрах. Наконец CR3 и CR4 представляют уже охарактеризованные (см. раздел 2.3.1) β<sub>2</sub>-интегины — Mac-1 (CD11b/CD18) и p150,95 (CD11c/CD18). Они связывают инактивированный фрагмент С3b — iС3b (см. раздел 2.5.1). Все С3-рецепторы играют важную роль в контроле активации комплемента, ингибируя связывание С3 с поверхностью собственных клеток и ускоряя отделение компонентов комплемента от иммунных комплексов.

**Таблица 2.19.** Рецепторы для компонентов комплемента на клетках человека

Название	Лиганды	Молекулярная масса, кДа	Экспрессирующие клетки	Биологические функции
CR1 (CD35)	C3b, iC3b, C4b, C3d	160–250	Эритроциты, моноциты/макрофаги	Опсонизация, расщепление C3b, клиренс иммунных комплексов
CR2 (CD21)	iC3b, C3dg, C3d	140	В-клетки, Т-клетки, естественные киллеры	Иммунорегуляция, связывание вируса Эпштейна–Барр
CR3 (CD11b/CD18)	iC3b	170/95	Моноциты/макрофаги, нейтрофилы	Опсонизация, расщепление iC3b
CR4 (CD11c/CD18)	C3b, iC3b, C3dg	150/95	Моноциты/макрофаги, нейтрофилы	Опсонизация
C3aR	C3a	59	Тучные клетки, базофилы, моноциты/макрофаги, нейтрофилы	Освобождение медиаторов, хемотаксис
C5aR	C5a	43	Нейтрофилы, моноциты, базофилы, эозинофилы	Освобождение медиаторов, хемотаксис
C5L2	C5a	41	Нейтрофилы, незрелые дендритные клетки	То же; выражено слабее

**2.3.4.3. Активация, обусловленная связыванием рецепторов фагоцитов.****Формирование фагоцитарной чаши**

Распознавание мишеней фагоцитоза через различные мембранные рецепторы фагоцитов приводит к запуску процессов активации, отличающихся деталями, но приводящих к одинаковому результату — погружению и последующему разрушению частицы. Наиболее полно изучены активационные сигнальные процессы, запускаемые при адгезии опсонизированных клеток (особенно вариант передачи сигнала через FcγR). Этот и C3R-зависимый варианты активации фагоцитов схематично изображены на рис. 2.27.

На начальных стадиях фагоцитоза основные события происходят на обращенном к мишени участке поляризованной клетки, где должна сформироваться временная структура, называемая фагоцитарной чашей (*phagocytic cup*). На поверхности патогена обычно фиксировано несколько молекул антител. Они обуславливают объединение Fc-рецепторов в кластеры в результате перекрестного сшивания. Это приводит (за счет конформационных изменений) к активации прилежащих к цитоплазматической части рецепторов тирозинкиназ семейства Src. Эти киназы фосфорилируют цитоплазматические участки рецептора, в том числе остатки тирозина в мотиве ITAM, а также контактирующие с ними киназы семейства Syk. Фосфотирозины ITAM обеспечивают связывание этого мотива с SH2-доменами

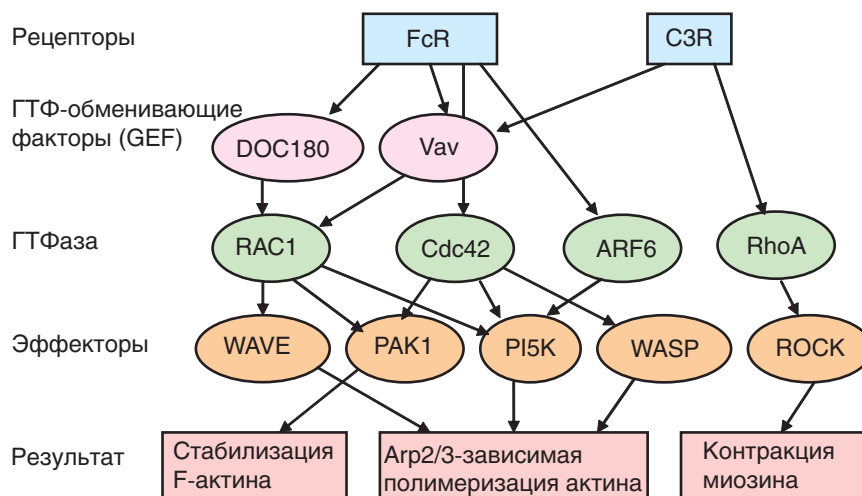


Рис. 2.27. Сигнальные пути, запускаемые связыванием рецепторов для опсонов

Сук-киназ. Далее активационная волна передается на ряд ферментов, определяющих дальнейший ход событий.

На данном этапе наиболее важна активация двух ферментов:  $PI_3K$  и PLC.  $PI_3K$  катализирует превращение фосфатидилинозитол 4,5-дифосфата ( $PI_{4,5}P_2$ ) в фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфат ( $PI_{3,4,5}P_3$ ), а PLC — расщепление  $PI_{4,5}P_2$  с образованием диацилглицерола (DAG) и инозитолтрифосфата. Диацилглицерол активирует протеинкиназу C. При этом уровень  $PI_{4,5}P_2$  не уменьшается благодаря его синтезу при участии фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназы. Выключение  $PI_3K$  и PLC предотвращает развитие фагоцитоза.

Следующий этап активации направлен на образование продуктов, участвующих в полимеризации актина — процесс, на котором основан фагоцитоз. Для реализации этого этапа необходимо участие ГТФаз — Rac-1, Cdc42 (их активность преобладает при FcγR-зависимом фагоцитозе) и Rho (задействована преимущественно в комплемент-зависимом поглощении частицы). Нити актина окружают основание формирующейся фагоцитарной чаши. За их адгезию к мембране в этих участках отвечают белки семейства MARCKS (*Myristoylated alanine-rich C kinase substrate*), активируемые протеинкиназой C.

Активация ГТФаз происходит с участием белков обмена гуанидиновых нуклеотидов — GEF-белков (GEF — *Guanine nucleotide exchanging factor*). Участие в фагоцитозе наиболее четко показано для малого белка Vav, обладающего высоким сродством к  $PI_{3,4,5}P_3$  и обеспечивающего активацию ГТФаз семейства Rho. В сборке F-актина основная роль принадлежит GEF-комплексу Arp1/2. Активацию этого комплекса осуществляет ГТФаза Cdc42 с участием белка WASP (*Wiskott–Aldrich syndrome protein*) — белок, связывающий нити актина с мембраной; дефект WASP приводит к развитию синдрома Вискотта–Олдрича — см. раздел 4.7.1.5). WASP выполняет роль

связующего звена между прикрепленными к мембране фосфоинозотидами и GEF-комплексом Arp1/2. Полимеризацию актина контролируют и другие белки, однако их роль изучена мало.

Таким образом, полимеризация актина в сочетании с погружением частиц составляет основу формирования фагоцитарной чаши — главного результата рассмотренных процессов и исходной позиции следующего этапа фагоцитоза.

#### 2.3.4.4. Формирование и созревание фагосомы

Существуют различия в феноменологии процесса погружения частицы в зависимости от того, какие рецепторы участвуют в ее распознавании. При FcγR-зависимом фагоцитозе в захвате объекта участвуют псевдоподии, тогда как при комплемент-зависимом фагоцитозе частица погружается в клетку без их формирования. Хотя в инициации фагоцитоза задействовано несколько миозинов, в формировании псевдоподий главная роль принадлежит миозину X, активация которого происходит при связывании с продуктами PI<sub>3</sub>K. Миозин X рассматривается как основной «двигатель» при формировании фагосомы.

В фагоцитозе участвуют большие площади мембраны, иногда превышающие исходную площадь всей плазмолеммы. Увеличение площади клеточной мембраны происходит за счет фокального экзоцитоза — мобилизации внутриклеточных мембран (главным образом за счет ранних эндосом, но также с участием поздних эндосом и эндоплазматического ретикулума), а также за счет формирования мембран *de novo*. В этих процессах задействована ГТФаза Arf-6 (*ADP-ribosylation factor*), а также несколько групп белков, доставляющих мембранный материал в зону фагоцитоза. Таким образом, мембрана формирующейся фагосомы мозаична, собрана из кусков различного происхождения. Слияние мембранных фрагментов происходит с участием белка VAMP3 и родственных факторов семейства SNARE под контролем ГТФазы Rab.

Погружение частицы обусловлено сокращением нитей актина, сконцентрированных вокруг фагоцитарной чаши. Погружение формирующейся фагосомы в клетку завершается смыканием над ней мембраны, подобно застежке-молнии. Сразу после этого нити актина исчезают из окружения фагосомы. Процесс разборки актиновых нитей зависит от ионов Ca<sup>2+</sup>. В то же время актиновые филаменты формируют нити, отходящие от фагосомы внутрь клетки, и их сокращение перемещает фагосому в глубь цитоплазмы.

Сразу после образования фагосома не несет бактерицидных веществ и ферментов, способных разрушить патоген. Перемещаясь внутрь клетки, фагосома проходит процесс созревания, основу которого составляют множественные акты слияния с фагосомой различных гранул, привносящих в нее эффекторные молекулы. Показатель созревания — смена мембранных маркеров фагосом: сначала на ее мембране присутствуют маркеры ранних эндосом (Rab5, EEA1), затем они сменяются маркерами поздних эндосом (Rab7, Rab9, белки группы LAMP2). Другие показатели созревания — закисление содержимого и изменение спектра ферментов, содержащихся в фаголизосомах, о чем подробнее будет сказано далее. При созревании фагосомы претерпевают изменения, характерные для эндосом в целом. Слияние с эндосомами реализуется по механизму, сходному с механизмом доставки

мембран к фагоцитарной чаше. Ключевую роль при этом играют белки семейства SNARE, входящие в состав мембран сливающихся гранул. Эти белки гомотипически взаимодействуют между собой. В большинстве случаев направление движения эндосом к фагосоме определяют микротрубочки. Слияние гранул стимулируется повышением уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ .

Решающий вклад в созревание фагосом и обретение ими способности убивать и расщеплять поглощенные объекты вносят лизосомы. Слияние фагосомы и лизосомы рассматривают как момент формирования фаголизосомы. В нейтрофилах источник бактерицидных веществ и ферментов для фагосомы — специализированные лизосомоподобные гранулы — специфические (нейтральные, раньше всего сливающиеся с фагосомами), азурофильные (кислые, сливающиеся с фагосомами позже), желатиновые, а также секреторные гранулы (см. раздел 2.1.2). Наиболее важна при созревании доставка в фаголизосому комплексов NADPH-оксидазы при помощи специфических гранул (см. далее). По мере последовательного вливания в фаголизосому содержимого различных гранул изменяется pH ее содержимого, возрастает ее бактерицидный потенциал и способность разрушать те или иные субстраты. Последовательность вовлечения различных гранул в формирование фаголизосомы зависит от порогового уровня их чувствительности к ионам  $\text{Ca}^{2+}$ : он выше для азурофильных гранул, чем для специфических, поэтому азурофильные гранулы позже сливаются с фагосомами. Это придает процессу созревания фаголизосомы определенную «логику»: сначала проявляют свою активность ферменты с нейтральным оптимумом действия, поступающие из специфических гранул, а по мере закисления среды мобилизуются ферменты азурофильных гранул, наиболее активные при кислых значениях pH. Сенсорами для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в гранулах служат белки семейства синаптогаминов. Процесс слияния гранул контролируют также киназы и ГТФазы семейства Rab (в частности белок Rab5).

Сформированная фаголизосома — клеточная органелла, специализированная для осуществления киллинга и расщепления фагоцитированных корпускулярных объектов.

### 2.3.5. Бактерицидная функция фагоцитов

Конечное назначение фагоцитоза состоит в создании оптимальных условий для киллинга и цитолиза патогенов, т.е. в осуществлении внутриклеточного цитолиза. Поэтому эффективность фагоцитоза обусловлена не столько поглощением патогена, сколько его разрушением внутри клетки. В зависимости от реализации бактерицидных свойств, различают завершённый и незавершённый фагоцитоз. Только первый отвечает своему биологическому предназначению и может рассматриваться как эффективная защитная реакция — проявление врожденного иммунитета.

Киллинг происходит в фаголизосомах фагоцитов. Фаголизосомы содержат факторы, разрушающие микроорганизмы (табл. 2.20). Выделяют несколько групп таких факторов:

- кислородзависимые факторы:
  - активные формы кислорода;
  - галоидсодержащие соединения;
- азотистые метаболиты;

- кислород- и оксид азота-независимые факторы:
  - факторы, обуславливающие локальное закисление;
  - бактерицидные пептиды;
  - катионные белки;
  - ферменты;
  - конкурентные ингибиторы метаболизма.

Таблица 2.20. Факторы бактерицидности фагоцитов

Группа факторов или воздействие	Факторы
Закисление (рН 4,5–5,0)	Результат активности V-АТФазы
Активные формы кислорода	$^*\text{O}_2^-$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ , $^*\text{OH}$ , $\text{OH}^-$ , $\text{OCl}^-$ , $^*\text{O}_2$ , $\text{O}_3$
Активные формы азота	$\text{NO}$ , $\text{OO}^*\text{NOI}$ и т.д.
Катионные белки	Серпроцидины (катепсин G, эластаза, азурацидин и протеиназа-3), лизоцим, лактоферрин, BPI-белки
Кислые гидролазы	Миелопероксидаза, 5'-нуклеотидаза, $\beta$ -арил-сульфатаза, $\beta$ -глюкуронидаза, кислая глицеро-фосфатаза и т.д.
Бактерицидные пептиды	Дефензины $\alpha$ и $\beta$ , кателицидины

Все эти факторы проявляют свою бактерицидную и литическую активность преимущественно в фаголизосомах, в которые они поступают из лизосом (ферменты, пептиды) или генерируются *de novo* (активные формы кислорода и азота). Некоторые из бактерицидных факторов ( $\text{NO}$  и его метаболиты) могут формироваться и действовать вне гранулярного аппарата клеток. Все бактерицидные факторы могут проявлять свою активность также за пределами клетки, куда они попадают в результате дегрануляции или других форм секреции. Однако эти факторы следует отличать от бактерицидных факторов, не связанных с фагоцитозом, а участвующих в реализации внеклеточного цитолиза (см. 2.3.6.1).

### 2.3.5.1. Кислородзависимые факторы бактерицидности

В обеспечении киллинга фагоцитированных микроорганизмов наиболее важна роль производных кислорода. Главное событие в образовании кислородзависимых бактерицидных факторов — кислородный взрыв — быстрое (реализуемое за секунды) и высокопродуктивное осуществление цепи реакций, приводящих к образованию **активных форм кислорода**. Активные формы кислорода включают высокореактивные свободные радикалы, ионы кислорода и кислородсодержащих химических групп. Образование активных форм кислорода катализируется ферментом **NADPH-оксидазой** (NADPH — восстановленная форма никотинамиддинуклеотидфосфата), называемой также оксидазой фагоцитов (**Phox**).

#### Сборка NADPH-оксидазы

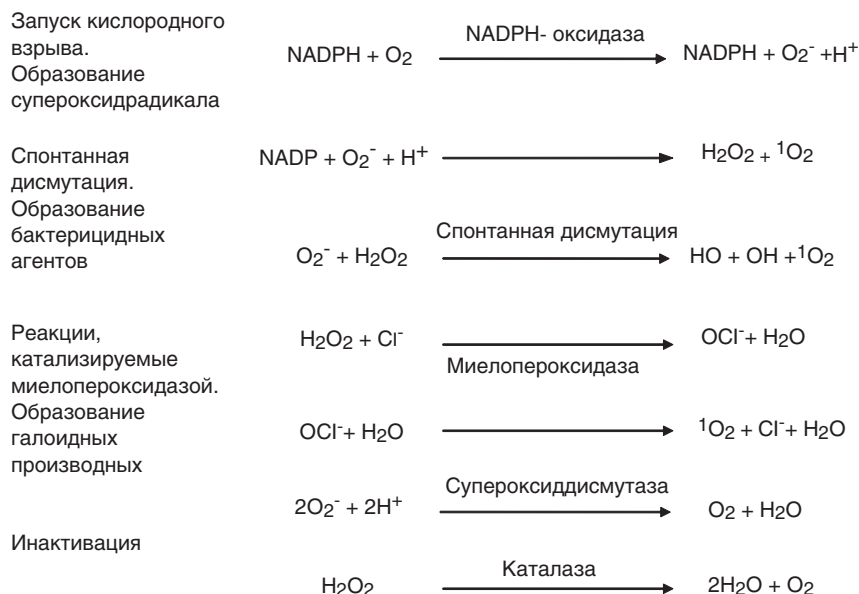
Кислородный взрыв реализуется в мембране фаголизосом. Сборка NADPH-оксидазы — исходное событие в запуске кислородного взрыва и генерации активных форм кислорода. NADPH-оксидаза активируется под влиянием сигналов, возникающих при связывании лигандов с Fc-рецеп-



### Образование активных форм кислорода

Конформационные изменения, происходящие при сборке NADPH-оксидазы, приводят к тому, что ее основной компонент gp91<sup>phox</sup> приобретает способность взаимодействовать с окисленной формой кофактора, образующегося при гликолизе, — NADPH. Это взаимодействие происходит при участии протетической группы FAD (флавин адениндинуклеотид) и двух молекул гема. FAD получает электрон (e<sup>-</sup>) от NADPH и передает его «наружной» молекуле гема, обращенной к цитозолю, от которой он переходит к «внутренней» молекуле гема, обращенной к содержимому фагосомы. Внутренняя молекула гема передает электрон молекуле кислорода, что приводит к образованию **супероксида**, объединяющего в себе свойства аниона и радикала, и потому называемого супероксидрадикалом, или супероксиданионом (\*O<sub>2</sub>I<sup>-</sup>). Супероксидрадикал — короткоживущий родоначальник активных форм кислорода (рис. 2.29). В начальную фазу фагоцитоза супероксиданион, образующийся на участке клеточной мембраны, находится во внутриклеточном пространстве; после формирования фагосомы и фаголизосомы он поступает внутрь этих гранул.

На следующем этапе реализуется цепь реакций, приводящих к образованию радикалов, ионов кислорода и содержащих их молекул, обладающих более высокой бактерицидной активностью чем супероксиданион, — активных форм кислорода. Под действием фермента супероксиддисмутазы из двух молекул супероксидного аниона образуется **перекись водорода**. В присутствии ионов Fe<sup>2+</sup> супероксид взаимодействует с перекисью водорода



**Рис. 2.29.** Кислородзависимые процессы в фагоцитах, приводящие к образованию бактерицидных веществ — активных форм кислорода и галоидсодержащих метаболитов. Слева — основные стадии процесса; справа — химические реакции и их продукты

с образованием **гидроксил-радикала** (\*ОН) (см. рис. 2.29) — сильного окислителя. Перекись водорода и особенно гидроксил-радикал обладают очень сильной бактерицидной активностью. При их совместном действии происходит перекисное окисление липидов, разрыв пептидных связей, окисление сульфгидрильных групп и другие глубокие химические изменения макромолекул в клеточных стенках патогенов, приводящие к их гибели. При мутациях генов, кодирующих субъединицы NADPH-оксидазы, нарушается активность этого фермента и, как следствие, развивается хроническая гранулематозная болезнь (см. раздел 4.7.1.4).

***Кислородзависимые факторы бактерицидности, индуцируемые миелопероксидазой***

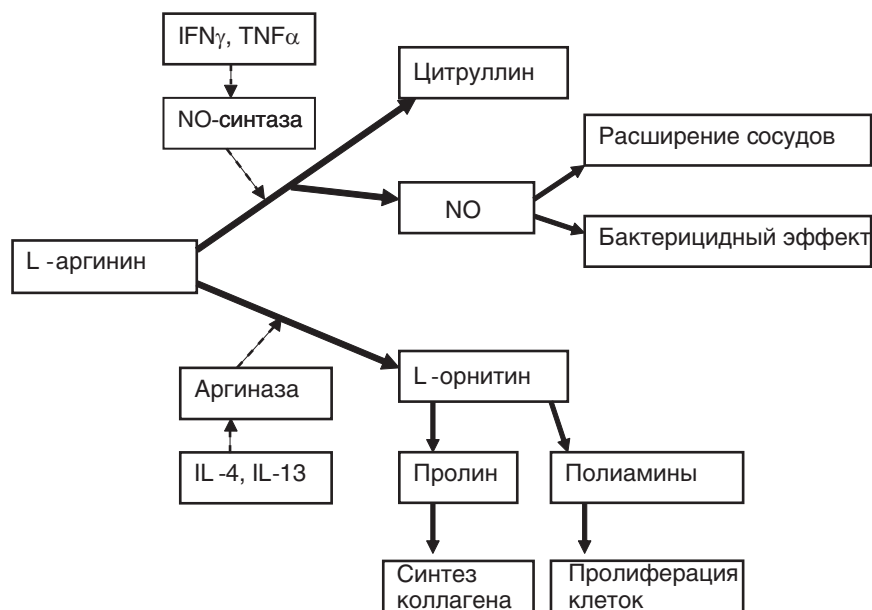
Миелопероксидаза — маркерный фермент азурофильных гранул нейтрофилов. Она составляет 1–5% общего белка этих клеток. Зрелая молекула миелопероксидазы — гетеродимер, образованный тяжелой  $\alpha$ - и легкой  $\beta$ -цепями. С  $\alpha$ -цепью связана железосодержащая группа — гем. Миелопероксидазная микробицидная система включает, помимо собственно миелопероксидазы, перекись водорода и кофакторы, в том числе ионы галогенов ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ).

Миелопероксидаза катализирует в фаголизосомах окислительные реакции. Превращение йодида ( $\text{I}^-$ ) в молекулярный йод (при участии миелопероксидазы и перекиси водорода) обеспечивает его связывание с сульфгидрильными группами белков, приводящее к нарушению жизнеспособности микроорганизмов. При катализируемом миелопероксидазой взаимодействии ионов  $\text{Cl}^-$  с перекисью водорода образуется сильный микробицидный агент — **хлорноватистая (гипохлорная) кислота**  $\text{HOCl}$ . При ее взаимодействии с аминокислотами образуются **хлорамины**, обладающие бактерицидным действием. При окислении хлорноватистой кислоты супероксидом образуется **гидроксильный радикал** \*ОН, а при ее окислении перекисью водорода — **синглетный кислород**  $^1\text{O}_2$  (см. рис. 2.29). Эти метаболиты обладают сильной микробицидной активностью. Синглетный кислород особенно активно взаимодействует с полиненасыщенными жирными кислотами, вызывая их перекисное окисление, нарушающее целостность мембраны бактерий. Синглетный кислород участвует в образовании еще одного микробицидного вещества — **озона** ( $\text{O}_3$ ).

Нейтрофилы — наиболее эффективные продуценты активных форм кислорода. К этим агентам чувствительны разные типы микроорганизмов, в первую очередь — внеклеточные патогены.

**2.3.5.2. Оксид азота и его производные**

Активные формы азота образуются при окислении аргинина с его превращением в цитруллин. Известно 2 пути превращения аргинина, один из которых катализируется аргиназой и приводит к образованию орнитина. Продукты другого пути, катализируемого **NO-синтазой**, — цитруллин и оксид азота (рис. 2.30). Известно 3 изоформы NO-синтазы, из которых эпидермальная и нейрональная экспрессируются спонтанно в соответствующих клетках, а макрофагальная NO-синтаза является индуцибельной (**iNOS**). Именно макрофагальная изоформа ответственна за образование активных форм азота в фагоцитах. Основной индуктор iNOS —  $\text{IFN}\gamma$ ; этот фактор вносит важный вклад в усиление микробицидной



**Рис. 2.30.** Пути утилизации аргинина макрофагами и образование NO. Сплошные стрелки обозначают превращения веществ; прерывистые — влияние ферментов и цитокинов

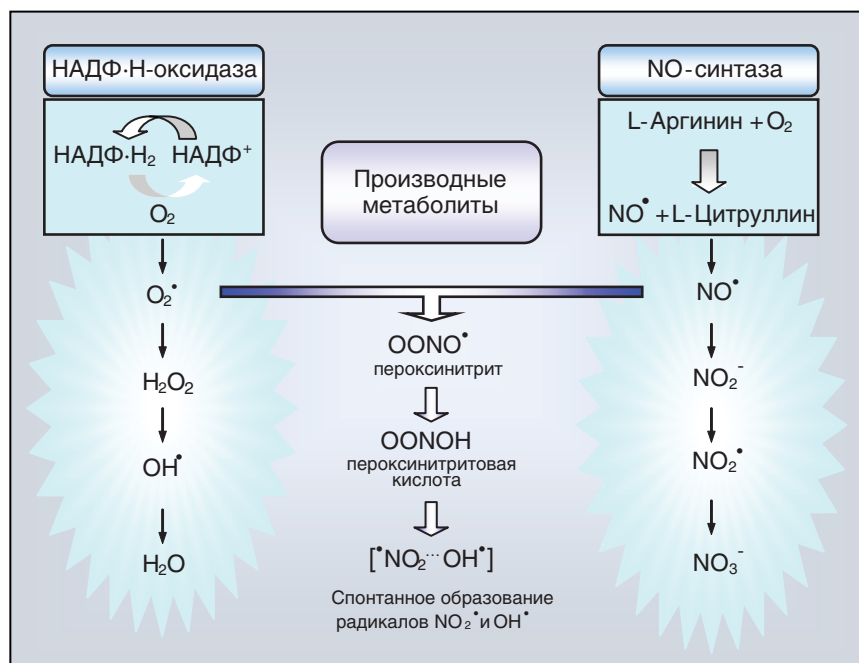
активности макрофагов. Другой активатор iNOS — тетрагидроптерин — активируется  $\text{TNF}\alpha$ . Оптимальное условие индукции iNOS — сочетанное действие  $\text{IFN}\gamma$  и  $\text{TNF}\alpha$ .

**Оксид азота (NO)** обладает микробицидной активностью. Особенно сильные бактерицидные свойства проявляет продукт взаимодействия оксида азота с супероксидным радикалом — **пероксинитрит** ( $\text{OONO}\cdot$ ), окисляющий сульфгидрильные группы белковых и небелковых молекул, нарушая при этом их функции (рис. 2.31). Из пероксинитрита образуются другие активные формы азота — радикалы  $\text{NO}_2^*$  и  $\text{OH}^*$  (см. рис. 2.30). В процессе превращения оксида азота происходит образование анионов и радикалов нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_2^*$ ), а также нитратанионов ( $\text{NO}_3^-$ ).

Основные продуценты активных форм азота — моноциты/макрофаги. Хотя нейтрофилы также способны синтезировать некоторое количество оксида азота, его роль в микробицидном эффекте для этих клеток не доказана. К активным формам азота наиболее чувствительны внутриклеточные патогены — микобактерии, грибы, простейшие. Поскольку образование оксида азота возможно вне фагосом в цитозоле, он действует не только на фагоцитируемые микроорганизмы, но и на вирусы, *Mycobacterium tuberculosis*, грибы и простейшие. Оксид азота обладает также тумороцидным эффектом.

#### 2.3.5.3. Факторы бактерицидности, не зависящие от кислорода и оксида азота

Микроорганизмы выработали способы нейтрализации факторов кислородозависимой бактерицидности, а также NO и связанных с ним азотсодержащих соединений, основанные на действии бактериальных супероксиддис-



**Рис. 2.31.** Взаимодействие кислородного и азотистого путей формирования бактерицидных веществ. Образование под действием NO-синтазы бактерицидных окислов азота и их взаимодействие с супероксиданионом

мутаз, каталаз и др. Однако у фагоцитов сформировались альтернативные механизмы бактерицидности.

#### *Защисление внутренней среды фаголизосомы*

При эндоцитозе содержимое эндосом закисляется. Для ранних эндосом характерны слабокислые значения pH (6,0–6,5). В содержимом поздних эндосом pH составляет 5,5–6,0, а в лизосомах — <5,0. Аналогичные изменения pH происходят при созревании фагосом. Закисление содержимого гранул — необходимое условие их слияния с фагосомами. Последовательное закисление среды в эндосомах — результат активности V-АТФазы — сложного белка, перекачивающего протоны из цитозоля в гранулы. V-АТФаза состоит из нескольких субъединиц. V-АТФаза отсутствует в фагосомах, но доставляется в них с лизосомами. В нейтрофилах V-АТФаза содержится во всех разновидностях гранул, кроме специфических (отсюда нейтральная реакция их содержимого). В фаголизосомах pH составляет 4,5–5,0. В фаголизосомах нейтрофилов pH среды несколько выше, чем в аналогичных структурах макрофагов. Это связано с более активной работой в нейтрофилах NADPH-оксидазы, сопряженной с потреблением протонов для формирования перекиси водорода. Кроме того, активные формы кислорода ослабляют активность V-АТФазы.

Закисление среды фаголизосомы оказывает бактериостатическое и бактерицидное действие, поскольку при значениях pH, близких к 4,5, снижает-

ся электростатический потенциал клеток микроорганизмов, что приводит к нарушению поступления в них питательных веществ. Кроме того, кислая среда способствует активации большинства ферментов (особенно из азурофильных гранул), обладающих бактерицидной и бактериолитической активностью. Продукты, выделяющиеся при разрушении микроорганизмов, усиливают закисление.

### **Ферменты**

При описании азурофильных и специфических гранул нейтрофилов уже перечисляли содержащиеся в них ферменты (общее число ферментов, выявляемых в фаголизосомах — более 60). Как известно, сначала с фагосомами сливаются специфические гранулы, содержащие ферменты, активные при нейтральных и слабощелочных значениях pH (именно такой pH имеет среда фагосом на данном этапе): щелочную фосфатазу и лизоцим, входящие в группу катионных белков (см. далее).

Азурофильные гранулы доставляют в фаголизосомы широкий набор кислых гидролаз и других ферментов, активных при кислых значениях pH: миелопероксидазу, 5'-нуклеотидазу,  $\beta$ -арилсульфатазу,  $\beta$ -глюкуронидазу, кислую глицерофосфатазу, а также гликозидазы. Азурофильные гранулы — дополнительный источник лизоцима и лактоферрина. Из азурофильных гранул в фаголизосому поступают также нейтральные протеазы, объединяемые в группу серпроцидинов, — еще одних представителей катионных белков.

Большинство сосредоточенных в фаголизосомах ферментов участвуют в расщеплении убитых микроорганизмов.

### **Катионные белки**

В составе катионных белков преобладают щелочные аминокислотные остатки (что и определяет их катионность). Среди катионных белков есть как обладающие ферментативной активностью (лизоцим и серпроцидины), так и конкурентные белки, бактерицидное действие которых основано на связывании жизненно важных для патогенов веществ (лактоферрин, витамин  $B_{12}$ -связывающий фактор).

**Лизоцим** — катионный белок. Его молекулярная масса 15 кДа, изоэлектрическая точка (pI) — 10. Лизоцим — фермент, обладающий активностью мурамидазы. Действуя на гликановый компонент молекул, лизоцим вызывает деполимеризацию пептидогликанов клеточной стенки микроорганизмов, тем самым нарушая ее целостность. Обычно субстрат лизоцима в интактной клетке маскирован поверхностными молекулами. В связи с этим активность лизоцима проявляется только при его комбинации с другими ферментами, например, в фаголизосоме.

**Серпроцидины** (от *Serine protease cidin*) — группа гомологичных белков, обладающих протеазной активностью, включающая **катепсин G**, **эластазу**, **азурацидин** и **протеиназу-3**. Молекулярная масса серпроцидинов варьирует от 25 до 29 кДа. Щелочной характер этих белков обусловлен высоким содержанием аргинина и амидированных форм дикарбоновых аминокислот (глутамин, аспарагин). Некоторые серпроцидины присутствуют не только в нейтрофилах, но и в моноцитах. Эти белки обладают микробоцидной активностью, не коррелирующей с протеолитической активностью. *In vitro* серпроцидины действуют на грамположительные и грамотрицательные

бактерии, простейших, патогенные грибы, а также на клетки эукариот. Наибольшей микробоцидностью обладает катепсин, наименьшей — эластаза и протеиназа-3. Однако выключение гена эластазы значительно снижает гибель фагоцитированных микроорганизмов. Часто серпроцидины действуют совместно и при этом оказываются более эффективны, чем по отдельности. Катепсин G сохраняет микробицидную активность даже во фрагментированном состоянии. Активность серпроцидинов вне клеток подавляется ингибиторами сериновых протеиназ серпинами. Серпроцидины структурно и функционально родственны гранзимам цитотоксических лимфоцитов.

**Лактоферрин** — катионный белок, служащий маркером специфических гранул. Для него характерна способность формировать прочный комплекс с двумя ионами  $\text{Fe}^{3+}$  или других металлов с переменной валентностью. Взаимодействие происходит с участием ионов бикарбоната. При связывании ионов железа образуется вещество красного цвета, что определило первоначальное обозначение лактоферрина как «красного белка».

Способность лактоферрина связывать ионы железа — основа его бактерицидного действия. Лактоферрин образует хелаты с ионами  $\text{Fe}^{3+}$  и создает их дефицит. Ионы железа участвуют в разнообразных жизненно важных процессах микроорганизмов, включая размножение. Секвестрирование ионов железа некоторые авторы рассматривают как один из фундаментальных механизмов защиты макроорганизма не только от инвазии патогенов, но и от роста опухоли. Бактериостатическое действие лактоферрина, основанное на конкуренции за ионы железа, — реальный механизм врожденного иммунитета. Помимо этого показана возможность прямого микробоцидного действия лактоферрина на некоторые патогены, однако оно выражено достаточно слабо.

**ВРІ-протеины** (от *Bacteria permeability inducing*) — белки, повышающие проницаемость бактериальной стенки — образуют еще одну группу катионных белков с бактерицидной активностью. Молекулярная масса ВРІ-протеинов составляет 59 кДа. Они представлены в нейтрофилах и эозинофилах. Как и другие катионные белки, ВРІ-протеины обогащены основными аминокислотными остатками, в частности лизином, и содержат гидрофобные участки. Их изоэлектрическая точка (pI) составляет около 9,5. Белки этой группы действуют на грамотрицательные бактерии, распознавая ЛПС (они гомологичны ЛПС-связывающим белкам). ВРІ-протеины связываются с поверхностью бактерий при помощи электростатических взаимодействий. При проникновении в мембрану ВРІ-протеины проявляют сродство к ЛПС, блокируя его активность (это может быть основанием для их возможного клинического применения). Литическое действие ВРІ-протеинов коррелирует с повышением проницаемости бактериальной стенки для белков.

### **Бактерицидные пептиды**

Бактерицидные, или антибиотические, пептиды — наиболее интенсивно изучаемые бактерицидные факторы многоклеточных. Выделяют несколько групп бактерицидных пептидов, из которых наиболее известны дефензины и кателицидины.

**Дефензины** — катионные пептиды молекулярной массой 3–5 кДа (обычно содержат около 30 аминокислотных остатков), с характерным высоким

содержанием остатков аргинина и других основных аминокислот (лизина, гистидина), а также гидрофобных аминокислот (валина, лейцина, пролина и т.д.). Основные и гидрофобные аминокислоты пространственно разобщены, что придает молекуле пептида амфипатичность. Для дефензинов характерна  $\beta$ -складчатая структура. Важнейшее их свойство — наличие 6 остатков цистеина, формирующих 3 дисульфидные связи. В зависимости от расположения этих связей выделяют  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\theta$ -дефензины. Для  $\alpha$ -дефензинов характерно следующее распределение дисульфидных связей (указаны номера остатков цистеина, скрепляемых связью): 1–6, 2–4, 3–5. Связь между 1-м и последним (6-м) остатками цистеина делает молекулу циклической. Эта цикличность не характерна для  $\beta$ -дефензинов, тогда как  $\theta$ -дефензины образуют цикл за счет пептидной связи между крайними, не цистеиновыми остатками.

У человека описано 6 разновидностей  $\alpha$ -дефензинов. Дефензины группы  $\alpha$  — важный компонент фаголизосом нейтрофилов: на их долю приходится 5–7% общего белка нейтрофилов. Нейтрофилы содержат 5 разновидностей  $\alpha$ -дефензинов. Они представлены также в некоторых макрофагах (например, легочных). В эпителиальных клетках (в частности, в эпителии крипт слизистой оболочки кишечника) присутствуют 2 другие разновидности  $\alpha$ -дефензинов. У человека известно 2  $\beta$ -дефензина, локализованных в эпителии дыхательных путей, но не в лейкоцитах.

**Кателицидины** (пептиды, гомологичные кателину) — положительно заряженные амфипатические пептиды. В их структуре преобладают  $\alpha$ -спирализованные участки. Кателицидины содержат функционально важный домен, гомологичный катепсину L (кателину). В нейтрофилах человека присутствуют 1 вариант кателицидинов — LL-37.

Бактерицидные пептиды проявляют антибактериальную, антимикотическую и противовирусную активность. Их бактерицидность связана с особенностями их строения. Взаимодействие дефензинов с клетками микроорганизмов не зависит от рецепторов и обусловлено электростатическими взаимодействиями положительно заряженных остатков собственных аминокислот с отрицательно заряженными группами (в составе пептидогликанов, ЛПС и др.) на поверхности патогенов. В реализации следующей фазы взаимодействия дефензинов с патогеном решающая роль принадлежит амфипатичности структуры этих пептидов: положительно заряженные группы продолжают контактировать с анионными молекулами клеточной стенки, а гидрофобные участки способствуют внедрению молекулы в клеточную мембрану патогена, что приводит к нарушению ее целостности. Существует несколько моделей, описывающих летальное действие дефензинов. Согласно одной из них («сборка бочки»), мономер пептида встраивается в клеточную стенку микроорганизма, затем к этому мономеру последовательно присоединяются другие. В результате формируется трехмерная циклическая структура («бочка»), образующая канал, через который проходят ионы и более крупные молекулы (гидрофобные участки дефензинов при этом связаны с компонентами мембраны микроорганизма, а гидрофильные участки обращены внутрь микроба). Нарушение целостности мембраны и изоляции внутренней среды микроорганизма от окружения приводит к его гибели.

Дефензины локализованы и оказывают свое действие преимущественно внутри нейтрофилов, точнее, в их фаголизосомах. Однако в результате секреции дефензины могут поступать во внеклеточное пространство и проявлять там свои бактерицидные свойства. Однако эта возможность ограничена содержанием в плазме крови и межклеточной жидкости серпинов — ингибиторов сериновых протеаз, подавляющих действие дефензинов. Во внеклеточном пространстве дефензины проявляют хемокиноподобные и иммунорегуляторные свойства при более низких концентрациях, чем в фаголизосомах.

### 2.3.6. Секреторная и киллерная активность фагоцитов

Секреторная активность фагоцитов реализуется двумя альтернативными путями, основанными на разных механизмах, — в форме дегрануляции и секреции, зависящей от аппарата Гольджи. Дегрануляция осуществляется при участии микротрубочек и прекращается при их деполимеризации (например, при обработке колхицином). В классический вариант секреции с участием аппарата Гольджи микротрубочки не вовлекаются, однако этот процесс можно нарушить действием цитохалазина и других ядов, повреждающих микрофиламенты.

#### 2.3.6.1. Выброс фагоцитами продуктов деградации (дегрануляция)

*Дегрануляция* — основная форма секреторной активности тучных клеток, базофилов и ключевое событие реакций гиперчувствительности немедленного типа (см. раздел 4.5.2.1). Для эозинофилов дегрануляция служит основным условием внеклеточного цитолиза — формы защиты от многоклеточных паразитов (см. ниже).

Для нейтрофилов дегрануляция — заключительный этап фагоцитоза. Ее следствия — попадание содержимого фаголизосом в межклеточное пространство — побочный эффект реакции. Однако в дегрануляцию вовлекаются не только фаголизосомы, но и свободные гранулы нейтрофилов. Дегрануляция лизосом моноцитов и макрофагов также происходит при фагоцитозе. В эффекторное действие моноцитов и макрофагов дегрануляция вносит меньший вклад, чем аппарат Гольджи-зависимая секреция.

Итак, заключительная фаза фагоцитоза — выброс содержимого фаголизосом путем дегрануляции. За счет сокращения нитей актомиозина фаголизосомы транспортируются по каркасу из микротрубочек к клеточной мембране и сливаются ней. Сигналом к секреции служит повышение уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . Секреция контролируется ГТФазами семейства Rab. При этом происходит превращение мембранных фосфоинозитидов, катализируемое PI-3P. Экзоцитоз гранул нейтрофилов может быть спровоцирован действием форболмиристат ацетата, активирующего протеинкиназу C и ряд других ферментов. Ключевую роль во взаимном распознавании мембран играют белки семейства SNARE: под влиянием форболмиристат ацетата на клеточной мембране появляются белки SNAP-23 и синтаксин-4, распознаваемые SNARE-белками мембран гранул синтаксином-6 и VAMP-2, соответственно. Такое распознавание — обязательное условие дегрануляции.

Выброс гранул и фаголизом, образованных с их участием, не совпадает по времени и контролируется не полностью идентичными механизмами. В дегрануляцию специфические гранулы и фаголизосомы, образованные с их

участием, вовлекаются раньше азурофильных гранул. Содержимое гранул попадает в нейтральную внеклеточную среду, т.е. в благоприятные условия для проявления активности ферментов и других факторов, содержащихся в специфических гранулах. Азурофильные гранулы содержат ферменты с оптимумом действия в кислой среде, создающейся лишь на пике воспалительной реакции. На этом этапе в окружении нейтрофилов оказываются лизоцим и щелочная фосфатаза. Однако по мере прогрессирования воспаления повышается вклад в дегрануляцию азурофильных гранул и в межклеточной среде воспалительного очага происходит накопление кислых гидролаз и активных форм кислорода.

Все перечисленные факторы задействованы в защите против микроорганизмов. Активные формы кислорода и галоидсодержащие соединения проявляют свой бактерицидный эффект во внеклеточной среде, несмотря на короткий срок существования. Лизоцим, катионные протеазы (катепсин G, азуроцидин, эластаза), лактоферрин оказывают более сильное антипатогенное действие. Однако эффективность этой защиты во внеклеточном пространстве значительно ниже, чем внутри клетки, где факторы действуют в более высокой концентрации и в тесном контакте друг с другом. Важно отметить, что во внеклеточном пространстве большинство этих факторов проявляет цитотоксическое действие в отношении собственных клеток организма. Продукты дегрануляции и некротической гибели нейтрофилов вызывают «расплавление» тканей в очаге воспаления и образование гноя. В результате дегрануляцию можно рассматривать скорее как побочный эффект, чем как дополнение к внутриклеточному цитолизу.

В то же время ферменты, особенно протеазы, выделяемые из гранул нейтрофилов, вносят существенный вклад в формирование вазоактивных пептидов, играющих важную роль в развитии сосудистой реакции при воспалении. Так, кислые и нейтральные протеазы участвуют в образовании кининов, влияющих на сократимость и проницаемость мелких сосудов. Сериновая протеаза, производимая нейтрофилами, катализирует превращение ангиотензиногена в ангиотензин II, вызывающий сужение крупных сосудов, что приводит к повышению кровяного давления. Катионные белки обуславливают высвобождение вазоактивных пептидов и гистамина из тучных клеток и тромбоцитов и вызывают агрегацию последних. Некоторые протеазы способны расщеплять факторы комплемента C3 и C5 с образованием C3a и C5a, играющих важную роль в развитии воспаления. Некоторые вазоактивные пептиды уже содержатся в гранулах нейтрофилов, а при дегрануляции происходит их высвобождение.

Нейтрофилы, завершившие процесс фагоцитоза, погибают (чаще путем апоптоза). Тканевые нейтрофилы быстро подвергаются апоптозу и без осуществления фагоцитарной реакции; фагоцитоз только ускоряет этот процесс. Причина апоптоза в этом случае — повышение проницаемости митохондрий для цитохрома c и фактора Аро-1, формирующих апоптосому, в которой происходит активация каспазы 9 (см. раздел 3.4.1.5). В процессе апоптоза на поверхности нейтрофилов появляется фосфатидилсерин и другие молекулы, распознаваемые мембранными рецепторами макрофагов, что приводит к фагоцитозу апоптотирующих нейтрофилов. Таким образом, макрофаги «очищают территорию» после фагоцитоза. При активации

макрофагов в них происходит образование антиапоптотических факторов (Bcl-2 и др.), поэтому они не подвергаются апоптозу после завершения фагоцитоза.

#### **2.3.6.2. Дегрануляция эозинофилов как основа внеклеточного цитолиза**

Принципиально иную функцию имеют факторы, выделяемые во внеклеточную среду при дегрануляции эозинофилов. Эти клетки играют основную роль в защите от слишком крупных для фагоцитоза патогенов — прежде всего от многоклеточных паразитов.

Выше (см. раздел 2.1.3) был рассмотрен состав гранул эозинофилов. Напомним, что в специфических (крупных) гранулах преобладают 4 главных белка: главный щелочной белок (MBP), присутствующий в сердцевине гранулы в виде кристаллов, и 3 белка матрикса — эозинофильный катионный белок (ECP), эозинофильная пероксидаза (EPO) и нейротоксин, происходящий из эозинофилов (EDN). При дегрануляции кристаллический MBP переходит в растворимую форму. Все перечисленные белки участвуют в повреждении клеток макропаразитов. Белки ECP и EDN обладают также рибонуклеазной активностью и оказывают противовирусное действие. Определенный вклад в антипатогенный эффект эозинофилов вносят минорные составляющие гранул — ферменты (присутствующие в специфических гранулах — миелопероксидаза, коллагеназа, эластаза,  $\beta$ -глюкуронидаза, катепсин, РНКазы; присутствующие в мелких гранулах — кислая фосфатаза, арилсульфатаза, пероксидаза). В то же время белки MBP, ECP, EPO и ферменты гранул повреждают нормальные клетки организма.

Всем названным белкам в той или иной степени свойственна иммунорегуляторная активность, направленная на ограничение воспалительной реакции; она характерна и для эйкозаноидов, синтезируемых в липидных тельцах эозинофилов. Для многих цитокинов, выделяемых эозинофилами по механизму классической секреции (IL-4, IL-5, IL-10, TGF $\beta$ , отчасти IL-6), тоже характерно преобладание противовоспалительных эффектов.

Как уже отмечалось, внеклеточный цитолиз менее эффективен, чем внутриклеточный, прежде всего в связи с уменьшением концентрации выделяемых клетками факторов. В случае эозинофилов эта проблема решается благодаря их адгезии к поверхности паразитов, что позволяет обеспечить достаточно высокие концентрации выделяемых веществ. В результате внеклеточный цитолиз, обеспечиваемый факторами, секретируемыми эозинофилами, представляет главный и вполне адекватный механизм иммунной защиты против многоклеточных паразитов.

#### ***Секреторная функция моноцитов и макрофагов***

Секреторная активность моноцитов и макрофагов реализуется преимущественно через аппарат Гольджи-зависимый механизм и (в отличие от таковой активности нейтрофилов) играет очень важную роль. Однако дегрануляция фаголизосом тоже выполняет важные функции: таким путем из макрофагов выделяются продукты окислительного взрыва, галоидные производные, азотистые метаболиты, протеазы, кислые гидролазы, участвующие во внеклеточном цитолизе и переваривании убитых патогенов. Дегрануляция моноцитов и макрофагов не сопровождается «расплавлением» тканей, поскольку они выделяют значительно меньше перечисленных

веществ, чем нейтрофилы. Дегрануляция макрофагов протекает не взрывообразно, а в значительной степени регулируемо; макрофаги существенно меньше нейтрофилов подвергаются апоптозу.

В основе выделения моноцитами и макрофагами большинства факторов врожденного иммунитета и иммунорегуляторных веществ, синтезируемых *de novo*, лежит классический секреторный процесс (табл. 2.21). Многие из этих веществ подробно рассмотрены в разделе 2.5.

**Таблица 2.21.** Продукты секреции макрофагов

Группа факторов	Факторы	Условия секреции	Функциональная значимость
Белки матрикса	Фибронектин, тромбоспондин, протеогликаны	Спонтанно, усиливается при активации	Формирование межклеточного матрикса, межклеточные контакты
Интегрины	$\beta_1$ , $\beta_2$	То же	Межклеточные контакты, движение и активация клеток
Компоненты комплемента	C1–C9, факторы В, D, I, Н	— << —	Эффекторные реакции иммунитета: бактериолиз, фагоцитоз
Факторы свертывания крови	Факторы V, VII, IX, X, протромбиназа	— << —	Свертывание крови, воспаление
Сывороточные белки (транспортные, ингибиторы и т.д.)	Трансферрин, авидин, $\alpha_2$ -макроглобулин, транскобаламин, ингибиторы протеаз и др.	— << —	Транспорт и метаболизм белков, воспаление и др.
Метаболиты арахидоновой кислоты	PGE2, LTB, LTC, TxA2, 5-HETE, 15-HETE	— << —	Регуляция воспаления, иммунного ответа, аллергии
Активные формы кислорода и азота	$O_2^-$ , $H_2O_2$ , $OH^*$ , NO, $OO^*NO$ и др.	При активации	Бактерицидное, туморицидное, цитотоксическое действие
Ферменты	Кислые гидролазы, нейтральные протеазы, миелопероксидаза, лизоцим и др.	При активации (лизоцим — спонтанно)	То же
Цитокины	IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IFN $\alpha$ , GM-CSF, G-CSF, M-CSF и др.	В основном при активации	Обеспечение воспалительного и иммунного процессов, гемопоэза
Гормоны, нейропептиды	Соматотропный гормон, аденокортикотропный, $\beta$ -эндорфины	То же	Регуляция различных процессов, в том числе воспалительного и иммунного

Цитокины — наиболее важная для реализации и регуляции иммунной защиты группа продуктов, выделяемая моноцитами/макрофагами. Эти клетки секретируют все провоспалительные цитокины —  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IL-23; все провоспалительные хемокины, интерфероны (в наибольшей степени  $\text{IFN}\alpha$ , в наименьшей —  $\text{IFN}\gamma$ ) и колониестимулирующие факторы. Таким образом, моноциты/макрофаги служат источником факторов, определяющих развитие воспалительной реакции и участвующих в большинстве реакций врожденного иммунитета. Кроме того, макрофаги, наряду с дендритными клетками, обеспечивают запуск адаптивного иммунного ответа, эффекторами которого служат лимфоидные клетки.

Макрофаги секретируют компоненты комплемента (практически все) и эйкозаноиды (простагландины, лейкотриены). Эти клетки вырабатывают гомеостатические факторы, поддерживающие нормальное регулируемое функционирование многих основных систем организма: молекулы межклеточного матрикса (фибриноген, тромбоспондин, протеогликан), факторы свертывания крови, значительную часть белков сыворотки крови, в частности, транспортные белки (трансферрин,  $\alpha_2$ -макроглобулин). Макрофаги выделяют активные пептиды — провоспалительные (вазоактивные пептиды и т.д.) и регуляторные (гормоны). Факторы, секретируемые макрофагами, участвуют в иммунопатогенезе атеросклероза. Эти клетки секретируют липопротеиную липазу (способствует образованию из липопroteinов низкомолекулярных липидных метаболитов, способных проникать в стенки артерий) и аполиппротеин А. Макрофаги могут участвовать в транспорте поглощенных ими липидных соединений в стенку сосуда.

Макрофаги спонтанно секретируют белки межклеточного матрикса, компоненты комплемента, различные сывороточные белки, факторы липидного метаболизма. При активации макрофагов включаются гены большинства вырабатываемых ими продуктов, а также усиливается продукция некоторых конститутивно синтезируемых веществ (C2, C4, фибронектина). Однако образование макрофагами некоторых веществ (например, липопротеиновой липазы) при активации, наоборот, ослабляется. Моноцитам/макрофагам не свойственно ни характерное для нейтрофилов взрывообразное выделение продуктов, ни характерное для лимфоцитов медленное развертывание секреции. Для экспрессии индуцибельных генов обычно требуется 20–30 мин, а синтез белковых продуктов начинается в пределах 1 часа. Продолжительность экспрессии генов и секреции продуктов макрофагами, как правило, не превышает 1 суток.

Таким образом, секреторная активность свойственна всем миелоидным клеткам, участвующим во врожденном иммунитете. Для гранулоцитов характерна быстрая дегрануляция, обычно сопряженная с внеклеточной микробоцидностью. Для моноцитов/макрофагов характерен регулируемый секреторный процесс, зависящий от аппарата Гольджи; при этом они выделяют множество факторов, обладающих иммунорегуляторной и гомеостатической функцией.

#### 2.3.6.3. Контактная киллерная активность миелоидных клеток

Реализация миелоидными клетками 2 из 3 основных типов цитотоксичности (внутри- и внеклеточного) описана выше. Нейтрофилы и моноци-

ты/макрофаги относят к «профессиональным» фагоцитам. Фагоцитарная активность в умеренной степени свойственна также эозинофилам, базофилам и тучным клеткам. Внеклеточный цитолиз задействован в антипаразитарной и, возможно, противоопухолевой защите, осуществляемой эозинофилами и нейтрофилами. Для миелоидных клеток также характерен 3-й тип цитотоксичности — контактный цитолиз. Мишенью при этом выступают не столько сами патогены, сколько инфицированные ими клетки.

Обязательное условие контактного цитолиза (как отражено в названии) — установление контакта между клетками, включающего две составляющие: неспецифическую адгезию и рецепторное распознавание. В адгезии участвуют молекулы интегринов, прежде всего  $\beta_2$ -интегрин LFA-1 ( $\alpha_1\beta_2$ ), экспрессируемый на миелоидных клетках. Рецепторами  $\alpha_1\beta_2$  на клетке-мишени служат молекулы суперсемейства иммуноглобулинов — ICAM-1 и ICAM-2. Взаимодействие этих молекул обеспечивает прочное взаимное прилипание клеток. Более специфичное рецепторное взаимодействие основано на распознавании мембранными рецепторами миелоидных клеток молекул опсоинов, представленных на поверхности клетки-мишени. Наиболее характерные лиганды для рецепторов миелоидных клеток — Fc-участки IgG-антител и фрагменты компонентов комплемента (iC3b и др.). В распознавании участвуют в первом случае Fc-, а во втором — CR-рецепторы, широко представленные на поверхности миелоидных клеток (особенно активированных). Fc $\gamma$ RI экспрессирован на макрофагах и активированных клетках других типов; Fc $\gamma$ RIIA и Fc $\gamma$ RIII — на всех разновидностях миелоидных клеток. В результате таких взаимодействий устанавливается прочный контакт между клеткой-эффектором и мишенью.

После формирования контакта в клетку-мишень передается летальный сигнал, приводящий к ее апоптозу (см. раздел 3.4.1.5). Механизмы киллинга, осуществляемого миелоидными клетками, не выяснены. Очевидно, выделение цитотоксических веществ происходит за счет экзоцитоза фаголизосом. Эффективность секретируемых факторов повышается благодаря тесному контакту клеток. Апоптоз могут индуцировать цитокины, секретируемые лейкоцитами (например, TNF $\alpha$ , действующий через рецептор TNFRI на клетке-мишени). В индукции апоптоза участвуют также сигналы, поставляемые в клетку-мишень мембранными индукторами апоптоза (Fas-лигандом, TRAIL) через специализированные рецепторы (Fas-рецептор, DR3, DR4). Контактный цитолиз, осуществляемый доставкой в клетки-мишени цитотоксических веществ типа гранзимов, наименее вероятен, поскольку требует высокой специализации клеток, свойственной естественным киллерам и цитотоксическим Т-лимфоцитам, но не миелоидным клеткам.

Особую роль в контактном цитолизе играют армированные макрофаги — разновидность активированных макрофагов с фиксированными на их поверхности антителами. Этот эффекторный механизм будет рассмотрен при описании защитного действия антител (см. раздел 3.6.2.4).

Следует, однако, отметить, что контактный цитолиз не служит основным эффекторным механизмом миелоидных клеток при осуществлении ими защитных реакций. Вероятно, это связано с функциональными особенностями этих клеток. Объективная потребность в контактном цитолизе

в рамках врожденного иммунитета обуславливает привлечение в эту систему лимфоидных клеток — естественных киллеров.

## 2.4. ВКЛАД ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ВО ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ. ЕСТЕСТВЕННЫЕ КИЛЛЕРЫ

Основные эффекторы в системе врожденного иммунитета — миелоидные клетки. Они играют основную роль в распознавании ПAMP и осуществлении фагоцитоза, обеспечивающего внутриклеточный киллинг. Однако в реализации функций врожденного иммунитета участвуют также и лимфоидные клетки — естественные киллеры, или NK-клетки (от *Natural killer*). Они были открыты позже «классических» популяций лимфоцитов — T- и B-клеток — в 1974 г. [И. Геллстрём (*I. Hellström*), К.Е. Геллстрём (*K.E. Hellström*)]. Этим клеткам свойствен особый способ выявления чужеродных молекул, отличный от распознавания как образов патогенности миелоидными клетками, так и антигенов лимфоцитами. Естественные киллеры распознают сигналы опасности в виде эндогенных стрессорных молекул, а основная функция этих клеток — контактный цитоллиз несущих сигналы опасности клеток. Таким образом, несмотря на формальную принадлежность естественных киллеров к системе врожденного иммунитета, основная их функция значительно отличается от таковой миелоидных клеток.

К клеткам врожденного иммунитета относят также некоторые разновидности лимфоцитов, а именно  $\gamma\delta$ T-клетки, NKT-клетки и V1-лимфоциты. Однако их роль в естественной защите пока изучена недостаточно. Кроме того, V1-лимфоциты и  $\gamma\delta$ T-клетки участвуют также в реакциях адаптивного иммунитета. Эти субпопуляции лимфоцитов обычно обозначают как «подобные клеткам врожденного иммунитета» (*innate-like cells*). Подробно  $\gamma\delta$ T-клетки, NKT-клетки и V1-лимфоциты будут рассмотрены в соответствующих разделах (см. разделы 3.3.1.3, 3.3.2.6, 3.3.2.7, 3.6.4).

### 2.4.1. Характеристика естественных киллеров

Естественные киллеры — довольно крупные (10–12 мкм в диаметре) лимфоциты с азурофильной зернистостью в цитоплазме. Их характеризуют как большие гранулярные лимфоциты. Главное отличие NK-клеток от других популяций лимфоцитов — отсутствие на естественных киллерах антигенспецифических рецепторов, кодируемых генами, перестраиваемыми в процессе дифференцировки клеток (как это свойственно другим лимфоцитам — см. раздел 3.1.4). С этим связано отсутствие клональной структуры популяции NK-клеток: все естественные киллерные клетки идентичны по строению их ключевых рецепторов. Основные маркеры NK-клеток у мышей — молекула адгезии NK1.1, у человека — комбинация молекул CD56 и CD16. CD56 — молекула гомофильной адгезии; она экспрессирована на нервных и мышечных клетках, а также на некоторых T-лимфоцитах. CD16 — низкоаффинный Fc-рецептор Fc $\gamma$ RIII, представленный на нейтрофилах и моноцитах. Ни один из этих двух маркеров не специфичен для NK-клеток.

Характерная особенность естественных киллеров, имеющая прямое отношение к выполнению ими своей основной функции, — наличие цито-

плазматических **азурофильных гранул**. Как и гранулы гранулоцитов по своему генезу они представляют разновидность лизосом, хотя и имеют некоторые черты секреторных везикул. Величина гранул варьирует от 100 до 500 нм.

Перфорин, гранзимы и гранулолизин — основные компоненты гранул НК-клеток, связанные с их цитолитической функцией. **Перфорин** — белок с молекулярной массой 66–70 кДа. Это структурный аналог терминального компонента комплемента C9. Перфорин способен полимеризоваться в гидрофобном окружении (см. далее) и формировать поры в мембране клетки-мишени. **Гранзимы** — сериновые протеазы. Выделяют несколько разновидностей гранзимов (А, В, С), из которых гранзим В, проникающий в клетку-мишень через перфориновые поры, индуцирует ее апоптоз. **Гранулизины** (изоформы 15 и 9 кДа, вторая более активна) содержатся только в зрелых гранулах в связанной с липидами форме. Помимо перфорины и гранзимов гранулы НК-клеток содержат амины (гистамин, серотонин), протеогликаны (хондроитинсульфат, гепарин), а также катехоламины (адреналин, норадреналин), ферменты (катепсины, химотрипсиноподобные протеазы, кислые фосфатазы) и ряд пептидных гормонов.

Выделяют 2 субпопуляции НК-клеток, различающиеся соотношением мембранных маркеров и функциями (табл. 2.22):  $CD56^{hi}CD16^{-}$  и  $CD56^{lo}CD16^{+}$  клетки (значки hi и lo — соответственно, высокий и низкий уровень экспрессии маркера). Субпопуляция НК-клеток, слабо экспрессирующая CD56, преобладает в кровотоке (90–95%, против 5–10%  $CD56^{hi}$  клеток), однако в печени, эндометрии матки и децидуальной оболочке плода преобладают  $CD56^{hi}$  естественные киллеры.  $CD56^{hi}$  клетки преобладают также в лимфатических узлах, составляя 75% от числа НК-клеток. Различия между субпопуляциями НК-клеток связаны не только с особенностями мембранного фенотипа, но и с их функциями.  $CD59^{lo}CD16^{+}$  клетки обладают выраженной цитотоксической активностью и относительно слабо секретируют цитокины, тогда как  $CD56^{hi}CD16^{-}$  клетки — активные продуценты  $IFN\gamma$  и других цитокинов ( $TNF\alpha$  и  $\beta$ , GM-CSF, IL-10), но проявляют слабую киллерную активность. Только  $CD56^{hi}CD16^{-}$  НК-клетки экспрессируют  $\alpha$ -цепь рецептора IL-2, т.е. несут высокоаффинный рецептор для этого цитокина. Именно поэтому *in vitro*  $CD56^{hi}CD16^{-}$  НК-клетки интенсивно пролиферируют в ответ на IL-2. Рецептор IL-2  $CD59^{lo}CD16^{+}$  естественных киллеров состоит из  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей и обладает промежуточной аффинностью. Именно поэтому эти клетки слабо пролиферируют и только при действии высоких концентраций IL-2. Таким образом,  $CD59^{lo}CD16^{+}$  клетки можно охарактеризовать как эффекторные, а  $CD56^{hi}CD16^{-}$  — как регуляторные НК-клетки. В настоящее время преобладает мнение, что  $CD59^{lo}CD16^{+}$  клетки представляют терминальную, а  $CD56^{hi}CD16^{-}$  клетки — промежуточную стадию развития НК-клеток.

Наиболее важные функции НК-клеток — цитотоксическая активность в отношении измененных (трансформированных, инфицированных вирусами, подвергшихся действию стресса) клеток организма и секреция цитокинов (в первую очередь  $IFN\gamma$ ), что играет важную роль в регуляции иммунных процессов. Эти свойства реализуются за счет поликлонального распознавания маркеров клеточного стресса в сочетании с контролем «свой—чужой» (по экспрессии клетками-мишенями молекул МНС-I).

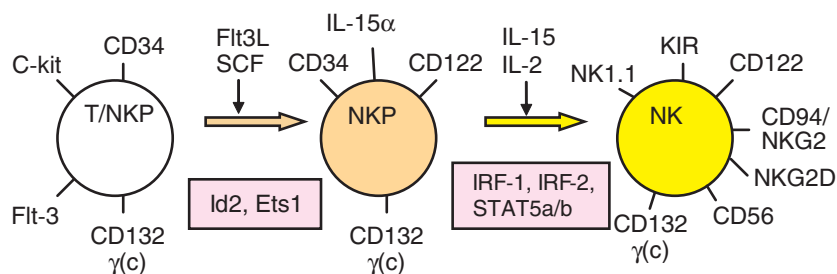
**Таблица 2.22.** Сравнительная характеристика субпопуляций NK-клеток CD56<sup>hi</sup> и CD56<sup>lo</sup>

Характеристика	CD56 <sup>hi</sup>	CD56 <sup>lo</sup>	LAK (CD56 <sup>lo</sup> )
Преимущественная локализация	Печень и другие солидные органы	Кровоток, селезенка, инфицированные органы, опухоли	Лимфоидные органы*
Экспрессия CD16	±	++	±
Экспрессия KIR2/3DL	—	±	+
Экспрессия NKG2A	+	±	+
Экспрессия NKG2D, NKp30, NKp46	+	+	+
Экспрессия NKp44	—	—	+
Экспрессия CCR7, CD62L	+(в крови)	—	—
Экспрессия CD25 (IL-2Rα)	+++	+	++
Экспрессия CD127 (IL-7Rα)	+	—	—
Экспрессия молекул адгезии	+	+(усиливается при активации)	++ (особенно в адгезивной фракции)
Перфоринзависимая цитотоксичность	±	++	+++
Зависимость цитотоксичности от МНС-I	++	++	±
Антителозависимая цитотоксичность	±	++	++
Секреция IFNγ и других цитокинов	++	±	++
Пролиферативная активность	+	±	++

\* — требует дальнейшего исследования; — — отсутствие экспрессии; ± — слабая экспрессия; + — умеренная экспрессия; ++ сильная экспрессия; +++ — очень сильная экспрессия.

### 2.4.2. Развитие и гомеостаз популяции естественных киллеров

NK-клетки развиваются в костном мозгу и происходят от того же общего лимфоидного предшественника CLP, который дает начало всем разновидностям лимфоцитов (рис. 2.32). В развитии естественных киллеров важную роль играет влияние микроокружения, реализуемое как через прямые межклеточные контакты, так и посредством цитокинов, например, взаимодействие представленного на мембране NK-клеток лимфотоксина α с рецепторами на стромальных клетках. Смесь цитокинов, содержащая IL-7 и IL-15, а также Flt-3-лиганд, необходима для дифференцировки естественных киллеров из костномозговых клеток-предшественников *in vitro*. На этапе выбора пути дифференцировки CLP в направлении Т- и В-линий, потенциал развития NK-клеток сохраняется за про-Т-клетками, иногда обозначаемыми как пре-Т/NK-клетки (Т/NKP). Развитие Т/NKP-клеток блокируют дефекты, затрагивающие гены мембранных молекул CD3ε и



**Рис. 2.32.** Основные стадии развития естественных киллеров: общий предшественник NK- и Т-лимфоцитов (Т/НКР), специализированный предшественник НК-клеток (НКР) и зрелая НК-клетка. Указаны мембранные маркеры клеток; в прямоугольниках — дифференцировочные факторы, регулирующие соответствующую стадию развития

$Fc\epsilon RI\gamma$  (CD3 $\epsilon$  — компонент рецепторного комплекса Т-клеток;  $Fc\epsilon RI\gamma$  в качестве передающей сигнал полипептидной цепи входит в состав ряда рецепторов, в том числе  $Fc\epsilon RI$ ).

На следующем этапе клетки линии естественных киллеров окончательно отделяются от Т-линии. Это наиболее четко выражено при развитии тимоцитов — на самых ранних стадиях созревания (стадии тимоцитов DN1, DN2 — см. раздел 3.3.2.3) возможна их дифференцировка не только в Т-лимфоциты, но и в НК-клетки. Эта способность полностью утрачивается на стадии DN3-клеток, когда происходит перестройка V-генов TCR (начальные неспецифические этапы этой перестройки происходят и в предшественниках НК-клеток). Условие дифференцировки НК-клеток — экспрессия внутриклеточных факторов дифференцировки Id2 и Ets1. Необходимые для дифференцировки Т-клеток факторы группы Notch блокируют развитие естественных киллеров.

После отделения от Т-линии дифференцирующиеся НК-клетки обозначают как пре-НК, или НКР-клетки (*Natural killer progenitor*). При переходе на эту стадию развития на поверхности клетки экспрессируется  $\beta$ -цепь (CD122), общая для рецепторов IL-2 и IL-15. К этому моменту другой компонент этих рецепторов —  $\gamma(c)$ -цепь (от  *$\gamma$ -common*), представляющая собой общую цепь для большой группы гемопоэтиновых рецепторов (см. раздел 2.5.5.2) уже представлена на клетках (она появляется на стадии НКТР). Вскоре клетка экспрессирует  $\alpha$ -цепь рецептора для IL-15, и с этого момента IL-15 становится основным цитокином, определяющим дальнейшее развитие, выживаемость и гомеостаз НК-клеток.

Следующий этап развития, реализуемый при участии IL-15, IL-18 и IL-12, — формирование зрелой НК-клетки. Для этого этапа свойственно последовательное появление маркеров и рецепторов, характерных для НК-клеток: NK1.1, CD94/NKG2 и NKG2D. Важное условие экспрессии рецепторных молекул Ly49, CD94/NKG2 — взаимодействие НКР-клеток со стромальными клетками костного мозга, экспрессирующими молекулы МНС-I — лиганды этих рецепторов. В то же время на НК-клетках появляются интегрины [в частности  $\beta_2$ -интегрин Mac-1 ( $\alpha_M\beta_2$ )], и исчезает молекула

CD34. На последнем этапе созревания NK-клетка проходит несколько актов деления. IL-15-зависимая передача сигнала играет ключевую роль на этом этапе развития NK-клеток. Переход от стадии NKP к зрелым NK-клеткам блокируется при выключении генов самого IL-15,  $\alpha$ -цепи его рецептора и связанной с ней тирозинкиназы Jak3, а также транскрипционных факторов STAT5 (а и b), обеспечивающих передачу сигнала от рецептора, и факторов IRF-1 и IRF-2, необходимых для секреции IL-15.

Зрелые NK-клетки покидают костный мозг и мигрируют в периферический отдел иммунной системы. Их расселение существенно отличается от распределения Т- и В-лимфоцитов. Значительная часть NK-клеток находится в циркуляции, составляя около 10% (5–15%) числа лимфоцитов периферической крови. Естественные киллеры содержатся в синусоидах печени, эндометрии матки и некоторых других солидных органах. Их содержание в лимфатических узлах и селезенке невелико (2,5–5%). В селезенке NK-клетки локализованы в основном в красной пульпе. Расселение естественных киллеров обусловлено экспрессированными на их поверхности хемокиновыми рецепторами: CXCR4, CCR1 и CCR5. Эти рецепторы определяют миграцию клеток по градиенту хемокинов: CXCL12 (SDF-1) и многих  $\beta$ -хемокинов. Только небольшая их часть (5% NK-клеток крови) экспрессирует рецептор CCR7, участвующий в преодолении эндотелиального барьера в посткапиллярных венулах и миграции лимфоцитов в Т-зоны вторичных лимфоидных органов. На NK-клетках, кроме того, экспрессирован рецептор для фракталкина CX<sub>3</sub>CR.

Естественные киллеры — короткоживущие клетки (время полужизни составляет 7–10 сут). Как уже отмечалось, выживаемость NK-клеток зависит от IL-15. При отсутствии IL-15 они быстро погибают; при этом перенесенные NK-клетки не приживаются. IL-15 не действует на рецепторы NK-клеток напрямую. Этот цитокин предварительно связывают вспомогательные клетки и представляют его естественным киллерам, удлинняя действие и существенно повышая его эффект. Дополнительную роль в поддержании жизнеспособности NK-клеток играет IL-7. При снижении численности NK-клеток запускается механизм гомеостатической пролиферации, также обусловленный IL-15 и IL-7.

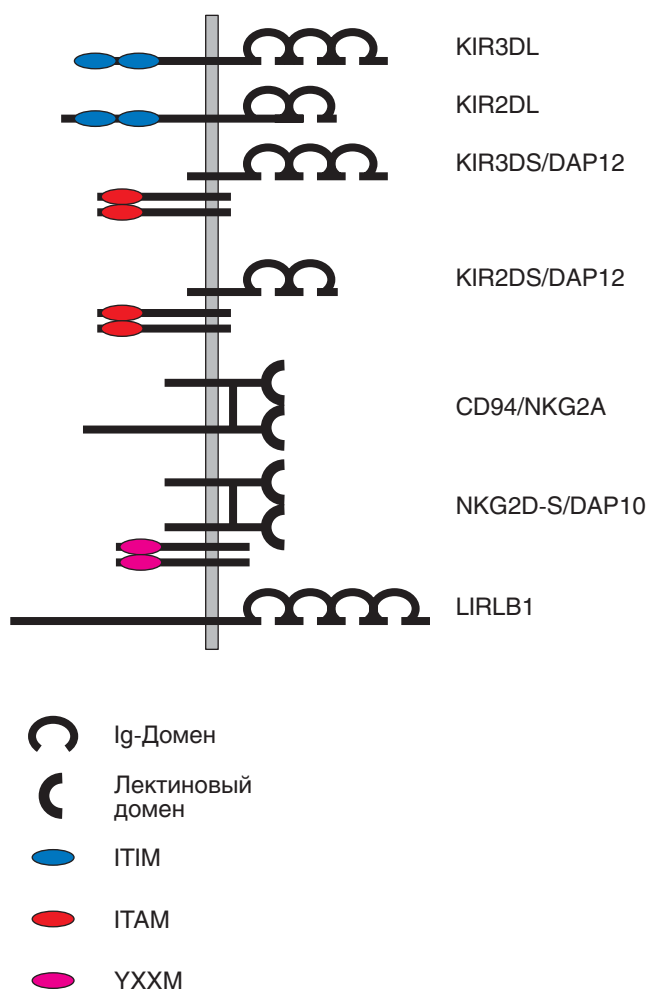
### 2.4.3. Рецепторы естественных киллеров

Как уже отмечалось выше, по особенностям распознавания чужеродных агентов NK-клетки отличаются как от миелоидных клеток врожденного, так и от лимфоидных клеток адаптивного иммунитета. Тем не менее по данному параметру они наиболее близки к Т-лимфоцитам, поскольку способны распознавать МНС-I в качестве маркера собственных клеток. NK-клетки экспрессируют множество рецепторов (табл. 2.23). Описано несколько семейств NK-рецепторов (рис. 2.33). Многие рецепторные белки NK-клеток кодируются генами NK-комплекса (у человека локализован в коротком плече хромосомы 12). Согласно вызываемому эффекту (мобилизация или подавление функциональной активности) выделяют активирующие и ингибирующие рецепторы NK-клеток (причем и те и другие могут входить в состав одного семейства).

**Таблица 2.23.** Рецепторы естественных киллеров

Название	Обозначение согласно CD-номенклатуре	Функция	Мотив, передающий сигнал	Лиганды
<b>KIR</b>				
KIR2DL1	CD158a	И	ITIM	HLA-Cw 2,4,5,6 (S77/N80)
KIR2DL2	CD158b1	И	ITIM	HLA-Cw 1,3,7,8 (S77/N80)
KIR2DL3	CD158b2	И	ITIM	HLA-Cw (S77/N80)
KIR2DL4	CD158d	И	FcεRIγ/ITIM	HLA-G
KIR2DL5A	CD158e1	И	ITIM	Не установлены
KIR2DL5B		И	ITIM	Не установлены
KIR3DL1	CD158e1	И	ITIM	HLA-Bw4
KIR3DL2	CD158k	И	ITIM	HLA-A
KIR3DL3	CD158z	И	ITIM	HLA-A 3,11
KIR2DS1	CD158h	A	DAP12/ITAM	HLA-Cw 2,4,5,6
KIR2DS2	CD158j	A	DAP12/ITAM	HLA-Cw 1,3,7,8
KIR2DS3		A	DAP12/ITAM	Не установлены
KIR2DS4	CD158i	A	DAP12/ITAM	HLA-Cw4
KIR2DS5	CD158g	A	DAP12/ITAM	Не установлены
KIR3DS1	CD158e2	A	DAP12/ITAM	Не установлены
<b>CD94/NKG2</b>				
CD94/NKG2A	CD94/CD95a	И	ITIM	HLA-E
CD94/NKG2E	CD94/CD95e	И	ITIM	Не установлены
CD94/NKG2F	CD94/CD95f	И	ITIM	Не установлены
CD94/NKG2C	CD94/CD95g	A	DAP12/ITAM	HLA-E
<b>NKG2D</b>				
NKG2D	Нет	A	DAP10/ YXXM	MIC A, B; ULBP 1-4
<b>LILR</b>				
LILRB1	CD85j	И	ITIM	HLA-A,B,C,E,F,G; CMV
LILRB2	CD85k	И	ITIM	HLA-F
<b>FcR</b>				
FcγRIII	CD16	A	ITAM	IgG1, IgG3
<b>NCR</b>				
NKp46	Нет	A	CD3ζ/ITAM, FcεRIγ/ITAM	Не установлены
NKp30	Нет	A	CD3ζ/ITAM	Не установлены
NKp44	Нет	A	DP-12/ITAM	Не установлены

И — ингибирование; A — активация.



**Рис. 2.33.** Схема строения основных рецепторов естественных киллеров. Наличие мотива ITAM или ITIM в цитоплазматической части молекулы или в дополнительной полипептидной цепи определяет тип рецептора — активирующий или ингибирующий

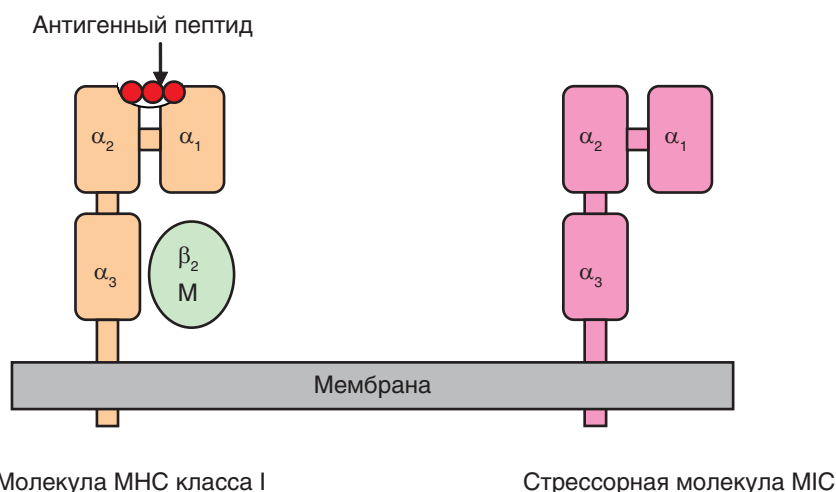
#### 2.4.3.1. Активирующие рецепторы естественных киллеров

К активирующим относят рецепторы нескольких групп. Основной из них — рецептор NKG2D — гомодимерный трансмембранный белок II типа (наружу направлен С-конец молекулы), С-лектин (т.е.  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый углеводсвязывающий белок). В мембране NKG2D электростатически связан с адапторным белком DAP-10, имеющим в своей цитоплазматической части активационный мотив YXXM (образован остатками тирозина и метионина, разделенными двумя любыми аминокислотными остатками). При связывании рецептора с лигандом происходит фосфорилирование остатка тирозина в этом мотиве, что обеспечивает взаимодействие YXXM с липидной киназой —  $\text{PI}_3\text{K}$ , приводящее к ее фосфорилированию и активации.

Далее активационный сигнал поступает в ядро, где происходит индукция комплекса генов, связанных с цитолизом. NKG2D несут все НК-клетки, а также некоторые Т-лимфоциты и макрофаги (что свидетельствует об относительности разделения типов распознавания между клетками различного гистогенетического происхождения).

Лигандами NKG2D служит особый тип молекул, кодируемых генами *MHC* I класса *MICA* и *MICB*. По своей третичной структуре продукты этих генов сходны с молекулами MHC-I (см. раздел 3.2.2), что и определило их название (MIC — от *MHC class I-related chain*). Другая группа лигандов NKG2D включает 4 белка ULBP (от *UL-16 binding proteins*), нумерованные от 1 до 4. Молекулы MIC содержат 3 внеклеточных домена, организованных подобно доменам MHC-I. От молекул MHC-I их отличают 2 важные особенности: в состав MIC не входит  $\beta_2$ -микроглобулин и их 2-й и 3-й домены (считая от клеточной мембраны) не имеют свойственного молекулам MHC-I желобка, предназначенного для связывания антигенного пептида (рис. 2.34). Молекулы ULBP имеют сходное строение, но содержат 2 домена. Таким образом, ни MIC, ни ULBP не имеют отношения к презентации антигена. С другой стороны, сами гены *MICA* и *MICB*, располагающиеся в комплексе MHC рядом с геном *HLA-B*, высокополиморфны (соответственно, 54 и 18 аллелей).

Роль этих молекул как объекта распознавания НК-клетками обусловлена их экспрессией только на трансформированных, инфицированных или подвергшихся стрессорному воздействию клетках. Контроль экспрессии генов, кодирующих MIC и ULBP, аналогичен контролю экспрессии классических стрессорных генов белков теплового шока. Вирусная инфекция индуцирует экспрессию стрессорных белков семейств MIC и ULBP, а экспрессируемый при этом белок теплового шока HSP60 маскирует молекулу



**Рис. 2.34.** Сопоставление структуры молекул MHC-I и MIC. При значительном сходстве общего плана строения молекул обращает на себя внимание отсутствие в MIC полости для связывания пептида, а также ассоциированной молекулы  $\beta_2$ -микроглобулина

HLA-E, распознаваемую ингибирующими рецепторами. Иногда индукция вирусами белков-активаторов NK-клеток определяет видовую устойчивость к данному вирусу. Так, устойчивость мышей к цитомегаловирусу связывают с индукцией этим вирусом белка m17, распознаваемого активационным вариантом рецепторов.

При развитии некоторых опухолей выявлена индукция стрессорных белков, особенно относящихся к группе MIC. Однако опухолевые клетки не только экспрессируют молекулы MIC, но и секретируют их в растворимой форме, что может привести к ослаблению реакции NK-клеток на эти молекулы (см. раздел 4.1.2.4). Таким образом, экспрессия лигандов NKG2D сигнализирует об опасности, вызванной индуцированным изменением клетки. Иммунная система при этом обеспечивает не исправление, а элиминацию таких клеток (при участии NK-лимфоцитов).

Группа NK-рецепторов семейства KIR (от *Killer cell Ig-like receptor*) включает 15 молекул. Рецепторы этой группы — трансмембранные белки суперсемейства иммуноглобулинов, с 2 или 3 внеклеточными доменами (что отражено в названии рецепторов в виде символов 2D или 3D соответственно). KIR-рецепторы характерны для NK-клеток человека и слабо представлены у мышей. Из них 9 обладают ингибирующими свойствами и 6 — активирующими, что определяется строением цитоплазматической части молекулы. Она может быть длинной (тип L — *long*) или короткой (тип S — *short*). S-вариант цитоплазматической части KIR связан с белком DAP12, содержащим последовательность ITAM и, следовательно, передающей активационные сигналы. Последовательность аминокислотных остатков в ITAM можно выразить формулой YXXI/Lx(6–12)YXXI/L, где Y — остаток тирозина; L — лейцина; I — изолейцина; X — любой остаток. L-вариант цитоплазматической части KIR содержит ингибирующий мотив ITIM (I/V/L/SXYXXL, где Y — остаток тирозина; L — лейцина; I — изолейцина; V — валина; S — серина; X — любой остаток), через который в клетку передаются супрессирующие сигналы. Принадлежность рецепторов KIR к этим 2 функциональным группам представлена в табл. 2.23. Лиганды активирующих KIR-рецепторов не всегда известны (для некоторых KIR-рецепторов — аллельные варианты молекул HLA-C). Например, молекулы KIR2DS2 и KIR2DS3 распознают аллели HLA-C Cw1, Cw3, Cw7, Cw8, содержащие в  $\alpha_1$ -домене Н-цепи в 77-й позиции остаток серина, а в 80-й позиции — аспарагина.

Существует еще несколько активационных рецепторов NK-клеток, природа и особенности функционирования которых изучены слабее. К ним относят белки NKp46, NKp30 и NKp44, объединяемые в группу NCR (от *Natural cytotoxicity receptors*). NKp46 и NKp30 экспрессируются на всех NK-клетках конститутивно, хотя и в неодинаковой степени, а рецептор NKp44 на NK-клетках — только после их активации IL-2 (т.е. на LAK-клетках — см. далее). Лиганды для этих рецепторов — слабоохарактеризованные стрессорные молекулы, экспрессия которых индуцируется вирусами (показано для вирусов гриппа и Сендай). Активационные свойства рецепторов обусловлены связью NKp46 и NKp30 с полипептидными цепями CD3 $\zeta$  и Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ , а NKp44 — с цепью DP-12. Перечисленные цепи содержат в своей цитоплазматической части активационный мотив ITAM. К активационным рецепторам принадлежит белок CD94/NKG2C (тоже связанный с DP-12)

группы NKG2, которая будет охарактеризована при описании ингибирующих рецепторов.

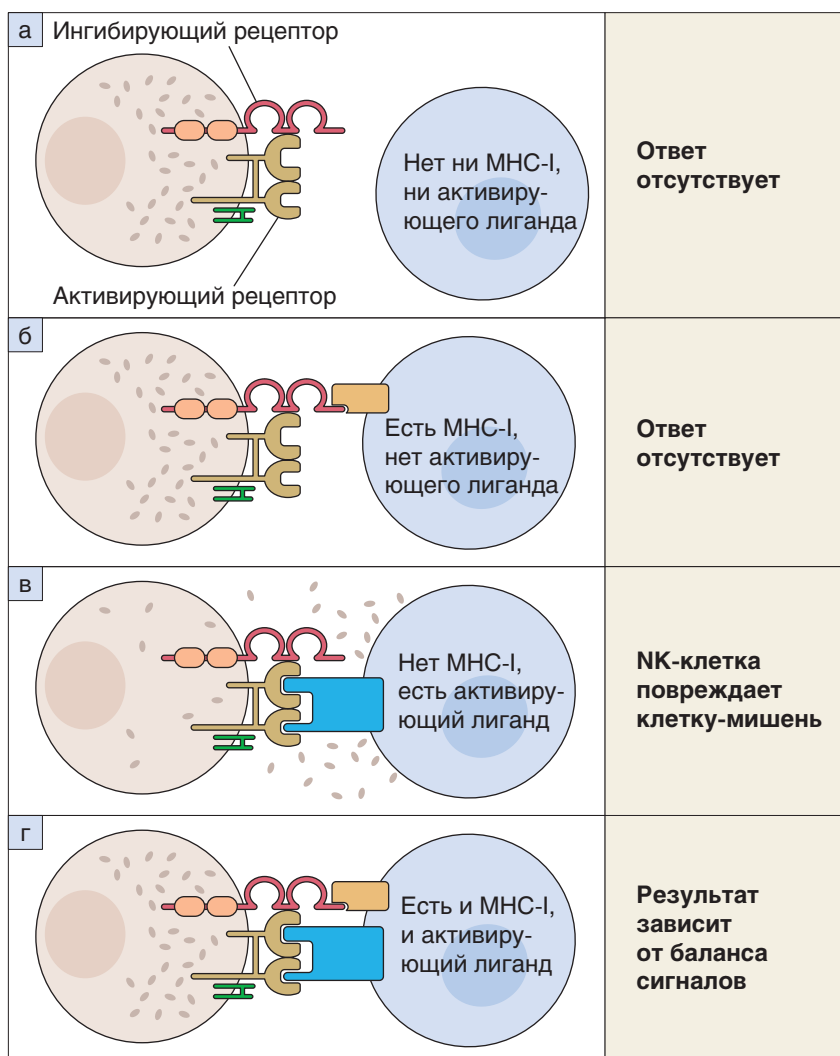
Fc-рецептор FcγRIII (CD16) тоже относят к активационным рецепторам NK-клеток. FcγRIII обуславливает активацию зрелых NK-клеток в ответ на взаимодействие с клетками-мишенями, опсонизированными IgG-антиusernameами. Этот рецептор описан вместе с другими Fcγ-рецепторами выше (см. раздел 2.3.4.2).

#### 2.4.3.2. Ингибирующие рецепторы естественных киллеров

Основная функция ингибирующих рецепторов — предотвращение контактного цитолиза клеток-мишеней, несущих те же молекулы MHC-I, что и сама NK-клетка. Эту функцию можно объяснить концепцией «потери своего», состоящей в том, что киллерная активность NK-клеток распространяется только на клетки, не имеющие или утратившие признаки генетической идентичности с NK-клеткой. Клетки с выраженной экспрессией молекул MHC-I (т.е. молекул MHC, присутствующих в норме практически на всех ядросодержащих клетках организма) не подвергаются контактному цитолизу естественными киллерами даже при инфицировании, трансформации и в условиях клеточного стресса. Эти ограничения обуславливают активацию киллеров только при отсутствии на клетке-мишени таких же молекул MHC-I (рис. 2.35). Концепция «потери своего» в настоящее время общепринята, однако в нее внесены некоторые изменения: ведущую роль отдают балансу сдерживающего эффекта молекул MHC-I и активирующего эффекта стрессорных молекул — лигандов активирующих рецепторов NK-клеток.

Цитолиз собственных клеток предотвращается при помощи ингибирующих рецепторов, представленных несколькими группами мембранных молекул NK-клеток. По структуре и особенностям распознавания выделяют несколько групп ингибирующих рецепторов естественных киллеров. Все они распознают молекулы MHC-I: одна группа рецепторов распознает все молекулы MHC-I независимо от их аллельной принадлежности; другая распознает определенные (широко распространенные) аллельные формы.

К рецепторам первой группы относят CD94/NKG2 и LILR (от *Leukocyte Ig-like receptor*), экспрессируемые и CD56<sup>hi</sup> и CD56<sup>lo</sup> NK-клетками. Рецепторы группы CD94/NKG2 — гетеродимеры, включающие практически лишенную цитоплазматической части неполиморфную цепь CD94 и один из четырех вариантов молекул NKG2 — A, C, E или F. Описанная выше активационная молекула NKG2D не связана с белками группы NKG2 ни генетически, ни структурно, ни функционально и получила сходное наименование в связи с обстоятельствами ее открытия. Белки NKG2 — C-лектины с C-концом, направленным наружу клетки (белки II типа). Из 4 рецепторов CD94/NKG2 ингибирующие только три (A, E и F), а NKG2C — активирующий (см. выше). Цитоплазматическая часть NKG2A содержит последовательность ITIM. Рецепторы группы CD94/NKG2 (и ингибирующие, и активирующие) распознают неклассические молекулы MHC — HLA-E, характеризующиеся слабовыраженным полиморфизмом. Входящие в состав HLA-E и презентируемые ею пептиды представляют собой фрагменты лидирующей последовательности белков MHC-I.



**Рис. 2.35.** Варианты реакций естественных киллеров в зависимости от экспрессии на клетках-мишенях молекул МНС-I и активирующих лигандов

Другая группа включает рецепторы охарактеризованной выше группы KIR, экспрессированные на CD56<sup>dim</sup> NK-клетках. Эти рецепторы распознают распространенные аллельные формы молекулы МНС-I — HLA-C, реже HLA-A, HLA-B и HLA-G, причем эти молекулы должны содержать не только H-цепь, но и  $\beta_2$ -микроглобулин и встроенный пептид. Как уже было отмечено, молекулы KIR могут проявлять активационные или ингибирующие свойства в зависимости от строения их цитоплазматической части. Ингибирующие рецепторы (в группе KIR они составляют большинство — 9 из 15) имеют длинный цитоплазматический участок (вариант L), содержащий последовательность ITIM. Через нее рецептор контактирует с

тирозинфосфатазами семейства SHP1, SHP2 и SHIP, дефосфорилирующими активированные белки, и тем самым прерывающими активационный сигнал. L- и S-формы аналогичных рецепторов, как правило, распознают одни и те же аллельные варианты HLA-C, но оказывают противоположный эффект. NK-клетки мышей слабо экспрессируют KIR-рецепторы. Однако они имеют большую группу (8 членов) ингибиторных рецепторов семейства Ly49, отсутствующих у человека. Ly49, как и KIR, распознают аллельные варианты молекул MHC-I.

#### 2.4.4. Эффекторные функции естественных киллеров

##### 2.4.4.1. Контактный цитоллиз и его стадии

Основная функция естественных киллеров — цитоллиз клеток, несущих признаки трансформации, инфицирования или клеточного стресса, при отсутствии на них собственных молекул MHC-I. Как известно, большую роль в разрушении клеток (особенно клеток патогенов) играют лейкоциты миелоидного ряда. Однако миелоидные клетки осуществляют цитоллиз преимущественно путем фагоцитоза (внутриклеточный цитоллиз) или секреции цитотоксических субстанций (внеклеточный цитоллиз). Лимфоциты (естественные киллеры и цитотоксические Т-лимфоциты) индуцируют гибель клеток-мишеней доставляя в клетки-мишени летальные вещества или поставляя им киллерные сигналы. Эту форму цитотоксичности обозначают как контактный цитоллиз. Макрофаги и нейтрофилы тоже могут осуществлять такие реакции, но скорее в виде исключения.

В реакции контактного цитоллиза выделяют 4 этапа:

- распознавание естественным киллером клетки-мишени и формирование с ней контакта;
- активация естественных киллеров;
- программирование гибели клеток-мишеней;
- уничтожение клетки-мишени.

Всего контактный цитоллиз занимает 1–2 часа.

На 1-м этапе реакции происходит формирование зоны контакта (иммунного синапса) между киллером и клеткой-мишенью. Несмотря на сложность этого процесса, он осуществляется очень быстро — в течение 1,5–2 мин. Важная особенность этого этапа — его зависимость от ионов  $Mg^{2+}$ , необходимых для установления межклеточных контактов. При формировании синапса происходит взаимодействие молекул адгезии, а затем активационных или ингибиторных рецепторов NK-клеток с их лигандами.

В активации NK-клетки участвуют сигналы, генерируемые при взаимодействии активационных рецепторов с их лигандами. Результат такой активации — секреция киллерной клеткой предназначенных для осуществления цитоллиза молекул в микрополость между контактирующими клетками или экспрессия мембранных индукторов клеточной гибели.

Программирование лизиса состоит в доставке через образованную перфорином трансмембранную пору в клетку-мишень гранул, содержащих гранзимы, или передаче киллерного сигнала через апоптотические рецепторы. После этого этапа предотвратить гибель клетки-мишени уже невозможно, даже нарушив контакт с клеткой-киллером.

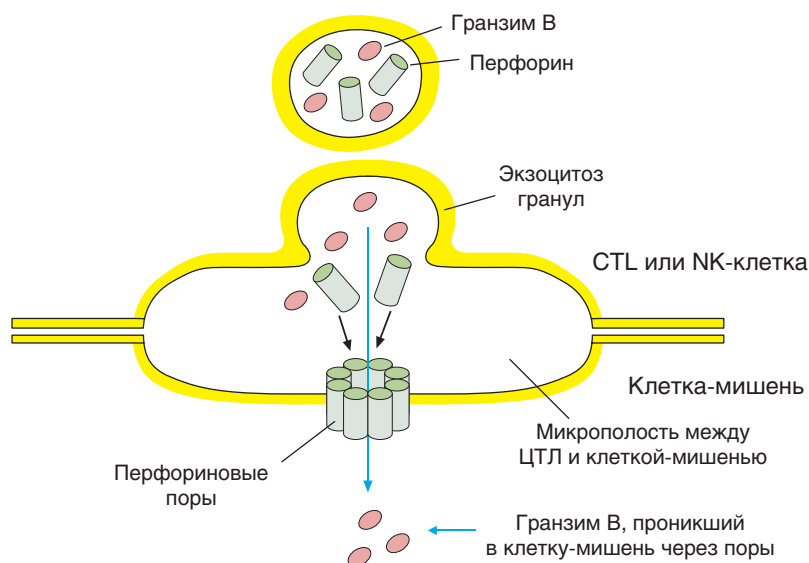
Гибель клетки-мишени, происходящая на 4-м этапе, осуществляется по механизму апоптоза и состоит в ее «сморщивании», уменьшении размера, фрагментации ДНК без существенного нарушения проницаемости мембраны. Погибшие клетки быстро подвергаются фагоцитозу. НК-клетки при этом не только сохраняют жизнеспособность, но вскоре снова могут участвовать в аналогичных актах цитолиза (феномен рециклинга).

Следует отметить, что в большинстве случаев свежeweделенные опухолевые клетки не становятся мишенью естественных киллеров. Это связано с сохранением на таких клетках молекул МНС-I и, возможно, недостаточной степенью экспрессии стрессорных молекул. Только немногие искусственно полученные линии опухолевых клеток подвергаются цитолизу естественными киллерами *in vitro*. Обычно в качестве мишеней НК-клеток используют клетки эритромиелоидного лейкоза человека K562.

#### 2.4.4.2. Цитолитический иммунный синапс и передача сигнала от рецепторов естественных киллеров

Механизмы перечисленных этапов контактного цитолиза в настоящее время изучены достаточно полно. Иммунный синапс, называемый также супрамолекулярным активационным кластером (SMAC — *Supramolecular activation cluster*), — универсальная основа взаимодействия клеток при презентации антигена (см. раздел 3.5.1.3) и осуществлении контактного киллинга. Формирование иммунного синапса происходит с участием двух классов молекул — молекул адгезии, формирующих контакт между клетками, и рецепторных молекул и их мишеней, обуславливающих специфический характер взаимодействия. В запуске активационных сигналов участвуют связанные с рецепторами ферменты и адапторные белки, доставляемые в синапс в составе рафтов — обогащенных сфинголипидами и холестерином липидных доменов в составе клеточной мембраны.

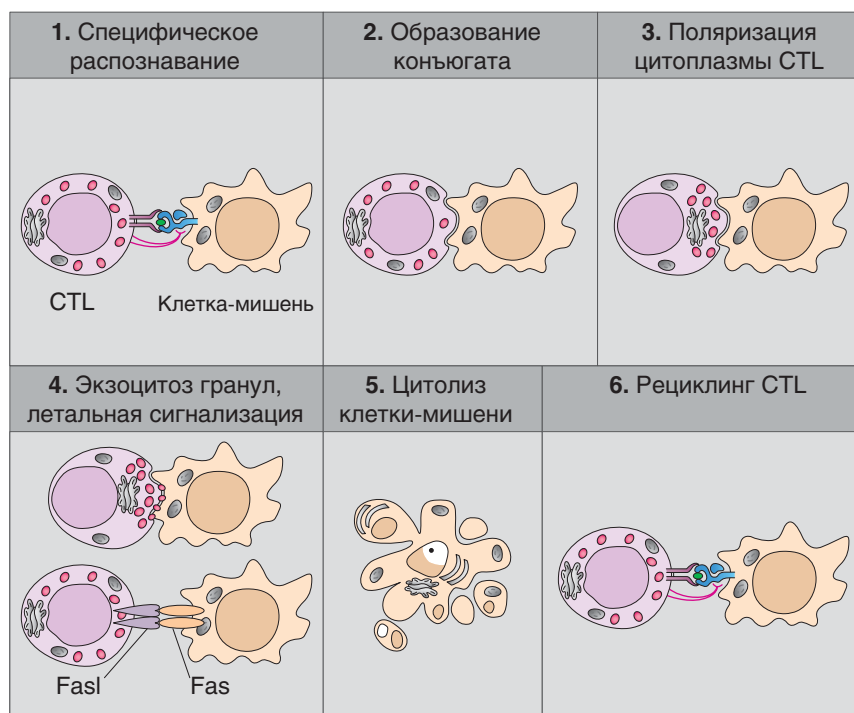
Синапс, образующийся при контактном цитолизе клеток-мишеней естественными киллерами или Т-лимфоцитами (см. раздел 3.6.1.1), называют цитотоксическим иммунным синапсом (рис. 2.36). Для его формирования необходимо отсутствие ингибирующих сигналов (экспрессия МНС-I) и распознавание молекул-мишеней активирующими рецепторами. Решающую роль на начальном этапе формирования такого синапса играют молекулы адгезии —  $\beta_2$ -интегрины (LFA-1, Mac-1 — со стороны киллера) и их рецепторы (особенно ICAM-1, ICAM-2 — со стороны клетки-мишени), а также молекула CD2 и ее рецептор CD58. Уже на этом этапе происходит мобилизация к синапсу некоторых внутриклеточных структур — компонентов цитоскелета и ферментов. При помощи белка талина устанавливается связь синапса с цитоскелетом и происходит полимеризация актина (формирование F-актина), осуществляемая с участием белка WASP (от *Wiskott–Aldrich syndrome protein*), играющего роль посредника между актиновыми нитями и мембраной клетки. С участием F-актина происходит перемещение рафтов и формируется организующий центр микротрубочек. Микротрубочки ориентируются по направлению к клетке-мишени, и по ним к синапсу транспортируются гранулы, содержащие перфорин. К синапсу в составе рафтов доставляется PLC (изоформа  $\gamma$ ), адапторные белки LAT, SLP-76, протеинкиназы Fyn, Lck, Syk, ZAP-70, Itk, PKC (изоформа  $\theta$ ).



**Рис. 2.36.** Структура цитолитического синапса. Цитолитический синапс формируется при распознавании киллером клетки-мишени. Синапс стабилизируется молекулами адгезии. В его центральной части формируется микрополость, в которую секретируется перфорин, гранзимы и другие участвующие в цитолизе вещества. Секретция ориентирована таким образом, что акцептором этих веществ становится мембрана клетки-мишени. Далее — см. текст

В центре синапса на мембране NK-клеток расположены активационные рецепторы, а на мембране клеток-мишеней — их лиганды. При взаимодействии активационного рецептора NKG2D с лигандом происходит перекрестное связывание 2 рецепторов. Это необходимо для нековалентного взаимодействия NKG2D с адапторными белками DAP-10 (два белка DAP-10 на 1 рецептор). При этом происходит фосфорилирование мотива YXXM в молекуле DAP-10 (при участии тирозинкиназ Src) и запускается активационный сигнал, передаваемый через  $PI_3K$ . Происходит формирование мультимолекулярного комплекса, включающего 2 молекулы рецептора NKG2D, 4 молекулы белка DAP-10, p85-субъединицу киназы  $PI_3K$ , адапторный белок Grb2 и GEF-белок (GEF — *Guanine nucleotide exchange factor*) Vav1. Это приводит к активации не только  $PI_3K$ , но и  $PLC\gamma$ , а также ГТФазы семейства Rho. Затем в процесс вовлекаются киназы p38, Jak3, EKK1/2, MEK1/2 и транскрипционный фактор STAT5 — компоненты нескольких параллельных сигнальных путей. Результат этой последовательности молекулярных событий — мобилизация ионов  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо и индукция ряда транскрипционных факторов (в частности NF $\kappa$ B и AP-1), ответственных за экспрессию активационных генов. Это обеспечивает ответ NK-клеток, проявляющийся в одной из двух основных форм — развитии цитотоксической реакции (в случае  $CD56^{dim}$  клеток, или синтезе цитокинов в случае  $CD56^{bright}$  клеток).

При связывании лиганда Fc $\gamma$ RIII NK-клеток активация происходит сходным образом. При взаимодействии с Fc-фрагментом IgG происходит



**Рис. 2.37.** Этапы клеточного цитолиза клетки-мишени естественным киллером

димеризация  $Fc\gamma RIII$ , приводящая к фосфорилированию последовательности ITAM в его цитоплазматической части, что обуславливает активацию Src-киназ. Эти киназы фосфорилируют  $\zeta$ - или  $Fc\epsilon RI\gamma$ -цепи, что приводит к активации  $PI_3K$ . Дальнейшие события развиваются так же, как и при активации через рецептор NKG2D. Параллельно активируется фосфатаза SHIP1, обеспечивающая возврат клетки в исходное состояние после завершения ответа.

Если в зоне контакта ингибирующие рецепторы распознают сингенные молекулы MHC-I, формируется ингибиторный иммунный синапс. Его особенность состоит в образовании кластеров ингибиторных рецепторов KIR, CD95/NKG2, LILR с фосфорилированием ингибиторного мотива ITIM и рекрутированием к нему фосфатаз SHP1 и SHP2. Под влиянием этих фосфатаз происходит подавление начавшегося фосфорилирования Src-киназ и мобилизация талина к месту контакта. Особенно важно на этом этапе дефосфорилирование белка Vav-1. В результате контакт между клетками быстро (в течение нескольких минут) нарушается. В отличие от ситуации с активационным синапсом в этом случае отсутствует привлечение в зону контакта рафтов, содержащих ферменты и адапторные белки. Последствия ингибиторного сигнала быстро проходят и через короткий промежуток времени клетка вновь приобретает способность к активации.

### 2.4.4.3. Механизмы контактного цитолиза

Перфорин-зависимый механизм контактного цитолиза, осуществляемого НК-клетками и цитотоксическими Т-лимфоцитами, сводится к следующим событиям. Периферия зрелого иммунного синапса, как отмечалось выше, представляет зону прочной адгезии, образованную  $\beta_2$ -интегринами и их рецепторами. Эта адгезия сохраняется и после получения НК-клетками активационного сигнала. В то же время в центральной части синапса межмолекулярные контакты разрушаются. В результате образуется микрополость. При формировании межклеточного контакта и иммунного синапса происходит взаимная поляризация взаимодействующих клеток. Посредством талина, связанного с интегринами, происходит организация цитоскелета НК-клетки, приводящая к концентрации около синапса нитей F-актина и формированию центра, организующего микротрубочки. Движение гранул, содержащих перфорин и гранзимы, в зону контакта направляют микротрубочки, ориентированные в направлении клетки-мишени. Сокращение актиновых волокон приводит к выбросу гранул в зону контакта, что гарантирует адресность их действия и безопасность этого процесса для окружающих клеток.

Как уже упоминалось, гранулы НК-клеток содержат перфорин, гранзим В и гранулизин. В присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  (содержится в зоне контакта) конформация перфорины изменяется, приводя к открытию в его молекуле гидрофобного участка. Это позволяет перфोरину встраиваться в клеточную мембрану, чему способствует также сродство упомянутого участка к фосфорилхолину. Другая важная особенность перфорины — способность к полимеризации в гидрофобном окружении мембраны. Объединяясь, 10–20 молекул перфорины образуют пору со средним диаметром 16 нм (10–20 нм), достаточным для прохождения не только ионов, но и молекул белка. Однако не нарушение целостности плазмалеммы служит причиной гибели клетки-мишени, а «впрыскивание» в нее через поры собственно цитотоксических молекул — гранзимов В (наиболее активен гранзим В9) и гранулизинов, запускающих апоптоз, т.е. активную гибель клетки, вызванную активацией ее собственных молекулярных механизмов. Условие развития апоптоза — активация сериновых протеаз — каспаз, имеющая каскадный характер: сначала активируются инициаторные, затем — исполнительные каспазы. Гранзим В — сериновая протеаза; он способен включать апоптоз путем прямой активации исполнительной каспазы 3 или запуска митохондриального механизма развития апоптоза через активацию проапоптотического фактора Bid. Гранулизин активирует в мембране клетки-мишени сфингомиелиназу (Smase), расщепляющую сфингомиелин с образованием церамида. Церамид служит одним из факторов, нарушающих проницаемость мембраны митохондрий, что приводит к выходу из них цитохрома с и фактора AIF (*Apoptosis inducing factor*), что служит пусковым событием апоптоза. В процессе апоптоза происходит расщепление ДНК в участках между нуклеосомами и множество других изменений, приводящих к гибели клетки в основном от истощения энергетических ресурсов (см. раздел 3.4.1.5). Таким образом, программирование лизиса состоит в доставке в клетку-мишень веществ, способных вызвать ее апоптоз.

Помимо описанного выше классического механизма цитолиза, осуществляемого НК-клетками, некоторый (относительно небольшой) вклад в гибель клетки-мишени вносит индукция ее апоптоза через лиганд-рецепторное

взаимодействие молекул семейств TNF и TNFR. В качестве индукторов апоптоза выступают мембранные молекулы NK-клеток FasL, TRAIL, мембранная форма TNF, а в качестве акцепторов летального сигнала — соответственно Fas-рецептор (CD95), рецепторы DR4, DR5 и TNFRI. Этот механизм явно второстепенный, поскольку при инактивации гена перфорина NK-клетки практически теряют киллерную активность. В связи с этим такой тип цитолиза более детально будет рассмотрен при описании цитотоксических Т-лимфоцитов, значительно активнее его использующих.

Выделяют еще один механизм проявления NK-клетками цитолитической активности — антителозависимый. Запуск цитолиза по этому пути происходит при распознавании Fc-рецепторами естественных киллеров FcγRIII (CD16) специфических участков в доменах C2 и C3 антител (подклассы IgG1 и IgG3), связавшихся с клетками-мишенями. Включение активационного сигнала при этом (как и в случае NKp46) происходит через вспомогательные молекулы Fc-рецептора — ζ-цепь CD3 или γ-цепь FcεRI (хотя ни CD3, ни FcεRI отдельно на поверхности NK-клеток не экспрессируются, указанные цепи присутствуют на ней в составе FcγRIII). Участие антител и Fc-рецепторов существенно повышают эффективность цитолиза, называемого в этом случае антителозависимым клеточным цитолизом. Первоначально считали, что этот тип цитолиза осуществляется клетками особой субпопуляции естественных киллеров — К-клетками. Затем было установлено, что при наличии IgG-антител, опсонизирующих клетку-мишень, антителозависимый клеточный цитолиз может осуществлять любая NK-клетка, экспрессирующая молекулы CD16 (т.е. зрелая NK-клетка фенотипа CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>++</sup>).

#### 2.4.5. Естественные киллеры и иммунная защита

Естественные киллеры, присутствующие в органах и кровотоке (особенно субпопуляция CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>lo</sup>) практически готовы к реализации цитолитической активности. Контакт с трансформированными или инфицированными клетками приводит к быстрой активации NK-клеток и мобилизации их цитолитического потенциала. При инфицировании вирусом создаются условия, повышающие готовность NK-клеток к цитотоксической реакции еще до контакта с клетками-мишенями. Такая предварительная активация естественных киллеров происходит в результате воздействия на них цитокинов, продуцируемых в ответ на инфекцию (в наибольшей степени — IL-12).

Цитокины индуцируют особую разновидность активированных цитотоксических клеток — LAK-клеток (*Lymphokine-activated killer*). При длительном (обычно 5–6 сут) культивировании мононуклеаров крови в присутствии IL-2 образуются киллеры, обладающие более выраженной цитотоксической активностью и действующие на более широкий спектр клеток-мишеней, включая свежeweделенные опухолевые клетки. Первоначально предполагали, что IL-2 повышает цитолитический потенциал суспензии клеток, стимулируя пролиферацию и повышая активность цитотоксических Т-лимфоцитов. Однако впоследствии выяснили, что, хотя Т-лимфоциты (как γδ-, так и αβ-типа) и вносят вклад в суммарный цитолитический эффект в суспензиях клеток, основную роль в усилении цитолиза при добавлении IL-2 играли NK-клетки. Таким образом, термин «LAK-клетки» в настоящее время применяют к NK-клеткам, стимулированным IL-2.

Образование LAK-клеток происходит и под действием других цитокинов (IL-7, IL-1, GM-CSF, IL-4, интерферонов), хотя и менее эффективно. При этом ограничение цитолиза сингенных MHC-I<sup>+</sup> клеток для них сохраняет силу, но роль этого запрета в балансе стимулов, способствующих и препятствующих лизису, снижается.

Молекулярные основы изменения активности NK-клеток при их превращении в LAK-клетки под влиянием IL-2 и других цитокинов не выяснены. Известно только, что при этом экспрессируется один из активационных рецепторов группы NCR — NKp44. Считают, что именно этот факт обуславливает усиление активности и расширение спектра мишеней LAK-клеток.

LAK-клетки, полученные при культивировании мононуклеаров крови опухолевых больных с IL-2, используют в комплексном лечении некоторых видов злокачественных опухолей. В то же время сам факт образования LAK-клеток в естественных условиях не доказан.

В современной иммунологии NK-клеткам отводят важную роль в элиминации видоизмененных клеток, утративших признаки принадлежности данному организму (MHC-I) и приобретшие новые признаки, сигнализирующие об опасности (стрессорные молекулы). В наибольшей степени такие изменения проявляются при опухолевой трансформации клеток и инфицировании их вирусами. Действительно, при этом происходит ослабление экспрессии и даже утрата молекул MHC-I. Возможно, биологический смысл прекращения экспрессии клетками MHC-I состоит в попытке «уйти» от цитотоксического действия Т-киллеров. Если это предположение верно, то эволюционно естественные киллеры должны были появиться позже антигенспецифических Т-лимфоцитов.

В конечном счете и при инфицировании вирусами, и при перерождении клеток роль разных типов цитотоксических клеток (NK-клеток и Т-лимфоцитов) определяется балансом экспрессии на пораженных клетках MHC-I и стрессорных молекул. Наличие на клетках MHC-I делает их мишенями для цитотоксических Т-лимфоцитов, но не NK-клеток. При отсутствии или слабой экспрессии MHC-I наличие стрессорных молекул на клетках делает их мишенями для естественных киллеров.

## 2.5. ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

Гуморальная составляющая врожденного иммунитета представлена несколькими взаимосвязанными системами — системой комплемента, цитокиновой сетью, бактерицидными пептидами, а также гуморальными системами, связанными с воспалением. Действие большинства этих систем подчиняется одному из двух принципов — **каскада** и **сети**. По каскадному принципу функционирует система комплемента, при активации которой происходит последовательное вовлечение факторов. При этом эффекты каскадных реакций проявляются не только в конце активационного пути, но и на промежуточных стадиях. Принцип сети характерен для системы цитокинов и предполагает возможность одновременного функционирования различных компонентов системы. Основа функционирования такой системы — тесная взаимосвязь, взаимное влияние и значительная степень взаимозаменяемости компонентов сети.

### 2.5.1. Система комплемента

Система комплемента была открыта раньше других гуморальных систем врожденного иммунитета. В 1898 г. сотрудник Института Пастера в Париже Ж. Борде (*J. Bordet*) обнаружил термолabileную составляющую системы факторов, ответственных за иммунный гемолиз, и назвал ее термином «алексин» (термин «комплемент», от лат *complementare* — дополнять, введен П. Эрлихом позже). Вскоре выяснилось, что комплемент — не одиночный фактор, а целая система факторов. Значительно позже, в 70-е годы XX века, на основе работ Л. Пиллемера (*L. Pillemer*), выполненных в 50-е годы XX века, было сформулировано представление о пропердиновой системе, которое вскоре было трансформировано в учение об альтернативном пути активации комплемента (с тех пор классическим путем активации стали называть антителозависимый путь, открытый Ж. Борде). Наконец, в 90-е годы XX века было признано существование 3-го пути активации комплемента — лектинового.

Активация системы комплемента осуществляется в два основных этапа (фазы):

- запуск активации (происходит при участии факторов различной природы, не относящихся к системе комплемента), завершающийся формированием C3/C5-конвертаз;
- лизис клеток-мишеней (рис. 2.38).

Пути активации кардинально различаются особенностями первой фазы, тогда как фаза клеточного лизиса одинакова для всех трех путей (рис. 2.39).

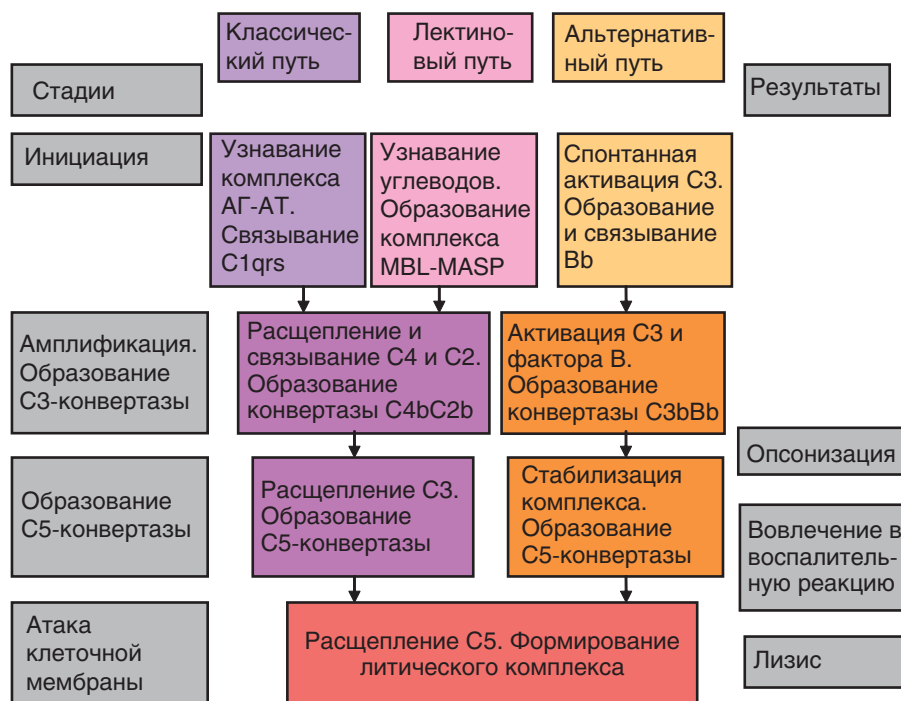
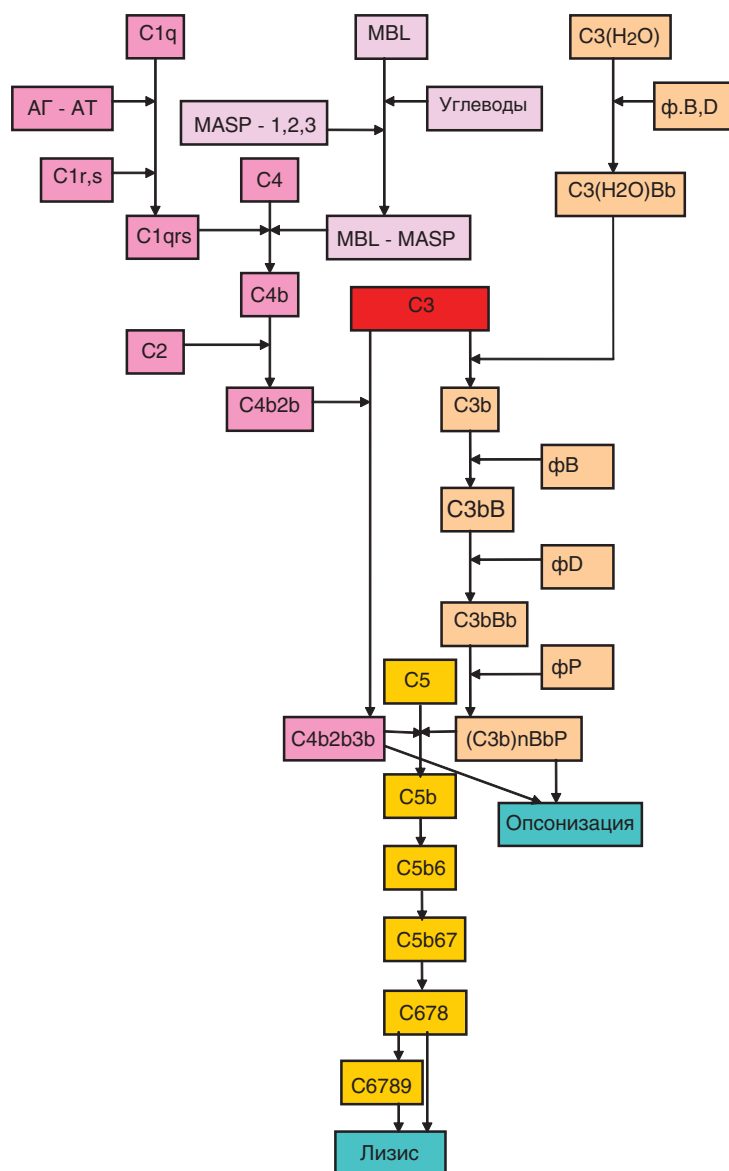


Рис. 2.38. Основные этапы активации комплемента и ее результаты



**Рис. 2.39.** Активация системы комплемента по классическому, лектиновому и альтернативному пути

#### 2.5.1.1. Факторы системы комплемента

Характеристика основных компонентов комплемента дана в табл. 2.24. Выделяют факторы, запускающие три основных пути активации комплемента, общие факторы (C3, C5, белки литического комплекса), а также регулирующие и ингибирующие белки. Факторы классического пути активации, а также общего для всех путей этапа — атаки клеточной мембраны — обозначают заглавной буквой С с добавлением порядкового номера (например, C3), обычно соответствующего последовательности их вступления в процесс

активации (исключение — C4). Фрагменты, образующиеся при расщеплении компонентов комплемента обозначают так же, как «родительский» компонент, с добавлением строчных букв «а» или «b». При этом крупный фрагмент помечают буквой «b», а мелкий — «а» (например, C3a и C3b). Для факторов альтернативного и лектинового путей приняты другие обозначения.

**Таблица 2.24.** Компоненты системы комплемента человека

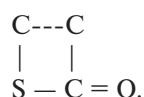
Компонент	Молекулярная масса, кДа	Число цепей (их молекулярная масса, кДа)	Продукты расщепления цепи (их молекулярная масса, кДа)	Концентрация в сыворотке крови, мкг/мл
<b>Альтернативный путь</b>				
Фактор В	95	1	а (30); b (63)	200
Фактор D	25	1	Не расщепляется	1–5
Пропердин (фактор Р)	220	4 (47,5)	То же	25
<b>Лектиновый путь</b>				
MBL	400	6–18 — по 2–6 цепей трех типов	— << —	1,5–1,8
MASP-1	93	1	— << —	1,5–12
MASP-2	93	1	— << —	Нет данных
MASP-3		1	— << —	Нет данных
<b>Классический путь</b>				
C1q	459	18 — по 6 цепей 3 типов	— << —	80
C1r	190	2 (95)	2 фрагмента (60; 35)	34–50
C1s	85	1	2 фрагмента (59; 28)	30–50
C4	210	2 (192)	а(6); b (197)	15–25
C2	110	1	а (30) ; b (87)	350–500
<b>Литический каскад</b>				
C3	195	2 (α — 120; β — 75)	а(10); b (185)	1200
C5	190	2 (44)	а(15); b (185)	75
C6	128	1	Не расщепляется	60
C7	120	1	То же	60
C8	160	3 (α — 65,1; β — 67,0; γ — 27,9)	— << —	60
C9	79	1	— << —	60
<b>Регуляторы и ингибиторы</b>				
Фактор H	150	1	— << —	500
Фактор I (C3b-INa)	90	2 (40; 50)	— << —	250
Белок S (витронектин)	89	1	— << —	500

Окончание табл. 2.24

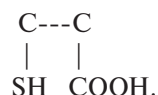
Компонент	Молекулярная масса, кДа	Число цепей (их молекулярная масса, кДа)	Продукты расщепления цепи (их молекулярная масса, кДа)	Концентрация в сыворотке крови, мкг/мл
DAF (CD55)	45–70	1	— << —	Отсутствует (мембранный белок)
C1-ингибитор (C1 <sub>inh</sub> )	105	1	— << —	180
C4-связывающий белок (C4bp)	560	8 (80)	— << —	250

Белки системы комплемента в норме содержатся в сыворотке крови, главным образом во фракции  $\beta$ -глобулинов. Только некоторые регулирующие белки представлены исключительно на мембранах клеток. Факторы комплемента вырабатываются клетками печени — гепатоцитами (до 90% всех факторов системы комплемента), а также моноцитами/макрофагами, клетками почечного эпителия, эндотелиальными клетками. Только C7 и фактор D вырабатываются преимущественно вне печени — соответственно в нейтрофилах и жировой ткани. Хотя факторы комплемента продуцируются постоянно, при воспалении под влиянием цитокинов (IFN $\gamma$ , цитокины семейства IL-1) их секреция усиливается.

Белки системы комплемента содержат домены (модули), относящиеся к различным семействам. Упомянем три семейства доменов, наиболее широко представленных среди белков комплемента. К **семейству C3/ $\alpha_2$ -макроглобулина**, относят C3, C4 и C5. Для всех этих белков характерна **тиоэфирная связь** между COOH-группой остатка глутаминовой кислоты и SH-группой цистеина (в молекуле C5 она утрачена в ходе филогенеза):



Эта связь играет ключевую роль в активации альтернативного пути и в фиксации компонентов комплемента на клеточных мембранах. В присутствии воды происходит гидролиз этой связи с восстановлением групп SH и COOH:



Карбоксил при этом может формировать связь с NH $_2$ -группами различных молекул, в том числе мембранных белков клеток. Обычно эта тиоэфирная связь экранирована, и окружающие молекулы, в том числе вода, не имеют к ней доступа. Экранирование тиоэфирной связи исчезает только при определенной конформации молекулы, которую компоненты C3 и C4 могут приобретать спонтанно или при частичном расщеплении (активации). Как уже

отмечалось, с неэкранированной тиоэфирной связью реагируют молекулы воды или мембранных белков (о значении таких реакций см. далее).

Второй тип доменов, распространенных в белках системы комплемента, — короткие **согласительные (*consensus*) повторы**. Они характерны для белков, регулирующих активацию комплемента (фактор H, C4bp, DAF, CR1, CR2) и поэтому их называют доменами контроля комплемента (доменами CCP — от *Complement control proteins*). Такие домены входят в состав мозаичных (т.е. содержащих домены различных типов) белков — фактора B, C2, C1r, C1s, C6, C7, MASP-1, MASP-2, MASP-3. Третий тип доменов, распространенных в системе комплемента — **модуль сериновых протеаз**, присутствующий в C2, а также факторах B, D, I, MASP-1, MASP-2, MASP-3, C1r, C1s.

Основная молекула системы комплемента — C3. Она представляет собой  $\alpha$ -глобулин, состоящий из двух полипептидных цепей, скрепленных дисульфидной связью:  $\alpha$  (120 кДа) и  $\beta$  (75 кДа) (рис. 2.40). Тиоэфирная связь располагается в  $\alpha$ -цепи; ее экранирование обеспечивается конформацией  $\alpha$ -цепи, закрепленной дисульфидной связью.

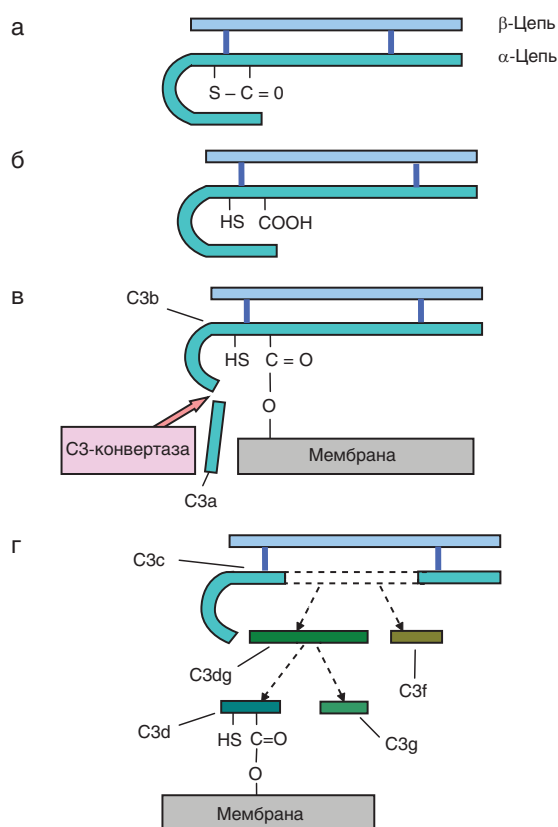
Пусковые молекулы классического и лектинового путей — соответственно C1q и MBL — принадлежат к семейству **коллектинов**. Они имеют большие размеры и комплексное строение (рис. 2.41). C1q и MBL образованы тремя типами цепей (A, B и C), скрученных в жгуты. Молекула C1q содержит 6, а молекула MBL — от 2 до 6 таких жгутов (т.е. всего C1q содержит 18, а MBL — от 6 до 18 полипептидных цепей), что и обуславливает их большую молекулярную массу. В собранном виде молекула C1q и тяжелый вариант молекулы MBL имеют вид «букета тюльпанов»: N-концевые домены молекул, имеющие коллагеноподобную структуру, спирально переплетаясь, формируют ствол «букета», тогда как глобулярные C-концевые части цепей образуют расходящиеся «ветви букета» (в каждой из этих ветвей присутствуют все три типа цепей — A, B и C). Бутонообразные завершения этих «ветвей» участвуют во взаимодействии с естественными лигандами — комплементсвязывающими участками молекул иммуноглобулинов-антител (в случае C1q) и лектинами (в случае MBL). Несмотря на значительное сходство четвертичной структуры C1q и MBL, они обладают низкой гомологией.

Структурное сходство характерно для некоторых белков, относящихся к разным путям активации, но выполняющим сходные функции: факторов B и C2, а также C1r, C1s, MASP-1, MASP-2 и MASP-3. Еще одну группу сходных белков образуют белки литического комплекса — C6, C7, C8 и C9; к ней относят также порообразующий белок цитотоксических лимфоцитов — перфорин (см. раздел 2.4). Это амфифильные белки, обладающие как гидрофильными, так и липофильными свойствами, что обеспечивает им возможность встраиваться в клеточные мембраны. Эти молекулы состоят из различных доменов — тромбоспондинового, рецептора липопротеинов низкой плотности, эпидермального фактора роста.

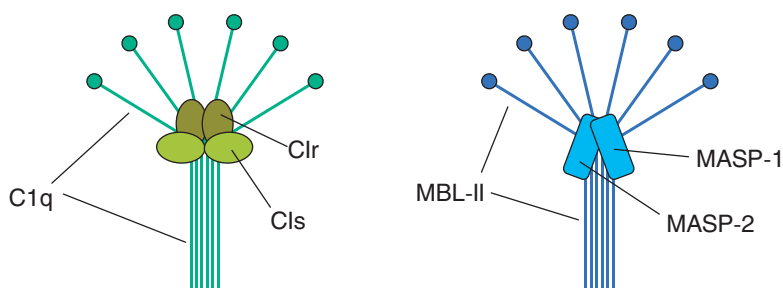
### 2.5.1.2. Активация комплемента по альтернативному пути

#### *Механизмы запуска*

Альтернативный путь активации филогенетически наиболее древний. Он полностью реализуется в рамках врожденного иммунитета. Запуск альтер-



**Рис. 2.40.** Схема строения молекулы C3 и формирования ее фрагментов: а — интактная молекула C3. В составе α-цепи есть экранированная тиоэфирная связь; б — в определенных ситуациях тиоэфирная связь становится доступной для молекул воды и подвергается гидролизу; в — при действии C3-конвертазы от α-цепи отщепляется фрагмент C3a, экранирующий тиоэфирную связь, впоследствии участвующую в образовании ковалентной связи с белками клеточной мембраны; г — из фрагмента C3b под влиянием фактора I (с участием кофакторов) вырезаются фрагменты C3dg и C3f; при этом C3dg сохраняет связь с мембраной благодаря наличию в нем тиоэфирной связи. Фрагмент C3c содержит то, что осталось от фрагмента C3b — 2 фрагмента α-цепи и всю β-цепь, соединенные интактными дисульфидными связями



**Рис. 2.41.** Схема структурной организации комплексов C1qrs и MBL-MASP

нативного пути активации связан с гидролизом вышеупомянутой тиоэфирной связи в молекуле C3, происходящим постоянно, но в очень немногих молекулах C3 (0,5% от числа молекул сывороточного C3). Эти молекулы спонтанно (стохастически) приобретают развернутую конформацию, при которой тиоэфирная связь становится доступной для H<sub>2</sub>O. После гидролиза тиоэфирной связи развернутая (денатурированная) конформация молекулы C3 стабилизируется. Образующийся при этом в малом количестве продукт C3(H<sub>2</sub>O) участвует в гидролизе фактора В (см. рис. 2.39), делая его доступным для расщепления сывороточной трипсиноподобной сериновой протеазой — фактором D. В результате образуется два продукта расщепления фактора В — Va (33 кДа) и Vb (60 кДа). Фрагмент Vb формирует комплекс с C3(H<sub>2</sub>O) — C3(H<sub>2</sub>O)Vb, обладающий активностью **C3-конвертазы**, т.е. способный расщеплять, а следовательно и активировать, фактор C3. Энзиматическая активность комплекса C3(H<sub>2</sub>O)Vb обусловлена фрагментом Vb.

Комплекс C3(H<sub>2</sub>O)Vb образуется в следовых количествах, но он запускает **фазу амплификации** (умножения). C3(H<sub>2</sub>O)Vb расщепляет α-цепи C3 компонента комплемента (напомним, что C3 состоит из двух полипептидных цепей — α и β). В результате действия на C3 «затравочных» количеств C3(H<sub>2</sub>O)Vb происходит расщепление дополнительных количеств C3. Малый фрагмент C3a (10 кДа) отщепляется от N-концевой части α-цепи. Большой фрагмент C3b (185 кДа) включает оставшуюся часть α-цепи и β-цепь (см. рис. 2.40). Дисульфидные связи в молекуле сохраняются без изменений. Фрагмент C3b обладает сродством к фактору В. При этом, как и при взаимодействии с C3(H<sub>2</sub>O), фактор В расщепляется фактором D на фрагменты Va и Vb. Это расщепление происходит уже в значительно большем масштабе. Фрагмент Vb связывается с C3b в присутствии ионов Mg<sup>2+</sup> с образованием комплекса C3bVb, также обладающего активностью C3-конвертазы. C3bVb называют амплифицирующей конвертазой, поскольку он значительно эффективнее осуществляет конверсию C3, чем C3(H<sub>2</sub>O)Vb. В формировании комплекса C3bVb может участвовать также фрагмент C3b, образующийся при активации комплемента по классическому пути (см. далее); в то же время C3b-фрагмент, образующийся по альтернативному пути, может входить в состав C3-конвертазы классического пути. Это означает возможность взаимодействия и взаимного усиления двух путей активации комплемента.

#### **Стабилизация C3-конвертазы альтернативного пути**

В растворе комплекс C3bVb быстро инактивируется, диссоциируя под действием фактора H (он вытесняет Vb из комплекса). Затем α-цепь C3b в составе комплекса C3bH расщепляется фактором I. Стабилизация комплекса C3bVb происходит только при его иммобилизации на клеточной мембране, с участием упоминавшейся выше тиоэфирной связи α-цепи C3b. Фактор H может атаковать и прикрепленный к мембране C3bVb, однако инактивация этого комплекса происходит только при наличии на поверхности клетки остатков сиаловых кислот. Поскольку эти остатки представлены на клетках макроорганизма, но не на поверхности микроорганизмов, комплекс C3bVb относительно стабилен только на поверхности микроорганизмов. На собственных клетках макроорганизма-хозяина комплекс разрушается

под действием факторов Н и I. В качестве кофакторов при этом выступают мембранные молекулы — рецептор комплемента CR1 (CD35) и DAF (*Decay-activating factor*; CD55). Некоторые бактериальные продукты [ЛПС (активна его сахаридная часть) и полисахаридные токсины], напротив, стабилизируют комплекс C3bBb. Аналогичной активностью обладают зимозан, полиэлектролиты и агрегированные иммуноглобулины (последние блокируют действие фактора Н). Таким образом, постоянно происходящая в организме активация комплемента по альтернативному пути не повреждает собственные клетки организма, но обеспечивает защиту от патогенов.

Исходным событием при обнаружении и дальнейшем изучении альтернативного пути активации комплемента стало открытие Л. Пиллемером пропердина. Пропердин, или белок Р, обеспечивает стабилизацию комплекса C3bBb за счет ослабления его спонтанной диссоциации. Под влиянием белка Р время полужизни комплекса увеличивается с 60 мкс до 90 с. Помимо этого, пропердин ускоряет сборку комплекса C3bBb и предотвращает действие на него фактора Н. Пропердин способен связываться с поверхностью бактериальной клетки и усиливать фиксацию на ней C3-конвертазы (C3bBb). При этом к комплексу могут присоединяться дополнительные молекулы C3b, что приводит к появлению на поверхности клетки избытка молекул C3b, важного для проявления опсонизирующего эффекта комплемента. Комплекс P(C3b)<sub>n</sub>Bb функционирует как C5-конвертаза (хотя сохраняет активность и в отношении компонента C3); при этом ферментативная активность этого комплекса, как и в C3-конвертазе, связана с Bb.

Первый этап активации комплемента по альтернативному пути на этом завершается. Рассмотрение его механизмов позволяет заключить, что сама по себе активация C3 и фактора В происходит спонтанно и непрерывно. Направленное действие комплемента как части иммунной системы реализуется при стабилизации комплекса C3bBb на мембране бактериальных клеток, но не собственных клеток организма. Результат первой фазы активации комплемента по альтернативному пути — образование C5-конвертазы и опсонизация клеток молекулами C3b.

### 2.5.1.3. Активация комплемента по классическому пути

Следующим этапом эволюции системы комплемента было становление лектинового пути активации. Однако в силу устойчивой традиции и связанной с ней терминологии удобнее вначале рассмотреть классический путь активации комплемента. Его кардинальное отличие от двух других путей состоит в зависимости от факторов адаптивного иммунитета, а именно — от антител и их комплексов с антигеном.

#### *Активация C1q и образование комплекса C1qrs*

Первый компонент комплемента при активации по классическому пути — C1q (см. рис. 2.39). Активация C1q происходит при его взаимодействии со связавшим антиген антителом. При связывании антигена конформация молекулы иммуноглобулина изменяется, в результате чего в ее константных доменах (Cγ2 и Cγ3, а также Cμ3 и Cμ4 — см. раздел 3.1.1.3) «открывается» участок, имеющий сродство к молекуле C1q. Подобный участок присутствует только в молекулах IgM, IgG1, IgG3 и (в меньшей степени) IgG2. C1q,

являясь 6-валентной молекулой, взаимодействует через С-концевые участки глобулярной части «ветвей букета» (см. выше) одновременно не менее чем с двумя С<sub>μ</sub>-доменами одной и той же молекулы IgM или с С<sub>γ</sub>2-доменами разных молекул IgG. Этот процесс зависит от присутствия ионов Ca<sup>2+</sup>. C1q может связываться также с другими молекулами, как эндогенными (С-реактивный белок, холестеринсодержащие липиды), так и экзогенными (липид А бактериального ЛПС, некоторые вирусные белки). Однако основные активаторы C1q — иммуноглобулины в составе иммунных комплексов.

При связывании C1q с перечисленными молекулами происходит его активация, благодаря чему C1q приобретает активность сериновой протеазы (эстеразы). Субстрат для C1q-протеазы — молекулы C1r и C1s, расщепляемые на контактный и каталитический фрагменты (удерживаются в составе комплекса за счет внутримолекулярных связей). При расщеплении происходит активация каталитического фрагмента. Сначала C1q расщепляет C1r. Затем активный C1r участвует в расщеплении C1s. В результате попарного взаимодействия контактных и каталитических фрагментов C1r и C1s образуется комплекс C1qrs, обладающий активностью трипсиноподобной протеазы/эстеразы. Сближение активных участков C1r и C1s способствует их активации. Формированием комплекса C1qrs завершается **фаза узнавания**. Компонент C1r расщепляет C1s, активированный C1s — факторы C4 и C2. Комплекс C1qrs может существовать в растворимой и связанной с мембраной формах. Мембранная форма образуется, если иммунный комплекс локализован на поверхности клетки (на ней же происходит фиксация компонентов комплемента).

#### **Формирование С3-конвертазы**

Следующая стадия активации состоит в образовании С3-конвертазы. C1qrs-эстераза расщепляет C4 и C2 на тяжелые (C4b и C2b) и легкие (C4a и C2a) фрагменты. C4b взаимодействует с комплексом C1qrs и затем, при участии ионов Mg<sup>2+</sup>, связывает C2b. Комплекс C4b2b обладает активностью С3-конвертазы. Ферментативная специфичность комплекса связана с C2b (подобно тому, как специфичность С3-конвертазы альтернативного пути связана с Bb).

В данном случае, как и при активации факторов В, С3 и С5 соблюдается общее правило активации системы комплемента: активация каждого очередного фактора системы комплемента происходит при его расщеплении на крупный и мелкий фрагменты. При этом крупные фрагменты («b») обладают ферментативной (протеазной/эстеразной) активностью и непосредственно участвуют в активации других компонентов комплемента. Мелкие фрагменты («a») лишены ферментативной активности и не участвуют в последующих реакциях каскада. Однако им свойственны сосудорасширяющая, хемотаксическая и другие формы биологической активности, что делает их важными факторами воспаления и реакции гиперчувствительности (см. разделы 2.3.2.1 и 4.6.1.3). Так, упоминавшийся выше пептид C4a обладает хемотаксической и кининовой (сосудорасширяющей) активностью.

При формировании мембранного комплекса C1qrs4b2b он связывается с поверхностью клетки не только через комплекс «мембранный антиген—антитело», но и ковалентно (что обеспечивается благодаря разрыву

тиоэфирной связи, присутствующей в составе молекулы C4b и взаимодействия COOH-группы остатка глутаминовой кислоты с NH<sub>2</sub>-группами мембранных белков). С этого момента комплекс обозначают как C4bC2b. Если комплекс остается в растворе, он быстро инактивируется. Даже связанный с мембраной комплекс подвергается атакам инактивирующих факторов — C4bp (C4b-связывающий белок), мембранных рецепторов CR1 (CD35) и DAF (CD55); все они способны вытеснять C2 из комплекса. Время полужизни комплекса C4bC2b — около 2 мин.

### **Расщепление C3**

Конвертаза C4bC2b (как и описанная выше конвертаза C3bBb) действует на α-цепь молекулы C3. Активный центр конвертазы локализован в молекуле C2b. Как и при альтернативном пути активации, C3 расщепляется на большой фрагмент C3b, участвующий в дальнейших реакциях каскада комплемента, и малый фрагмент C3a, обладающий хемотаксической и сильной анафилактической активностью. Рецепторы для C3a представлены на поверхности лимфоцитов, нейтрофилов, тучных и эндотелиальных клеток, что обуславливает его действие на эти клетки, проявляющееся, например, в повышении проницаемости сосудов и индукции дегрануляции.

C3b связывается с иммобилизованным на мембране комплексом C1qrs4b2b. При этом происходит фиксация на клетке значительно большего числа молекул C3b, чем необходимо для насыщения комплекса — часть молекул C3b формирует ковалентную связь непосредственно с молекулами клеточной мембраны (по тому же механизму, как C4b). Иммобилизованный комплекс C1qrs4b2b3b способен расщеплять компонент комплемента C5, т.е. обладает активностью C5-конвертазы. И в этом случае специфичность фермента связана с C2b. Таким образом, C3- и C5-конвертаза — фактически один и тот же фермент (иногда их обозначают как C3/C5-конвертаза). Однако на разных этапах формирования C2b-содержащего комплекса создаются оптимальные условия для связывания и расщепления разных субстратов — сначала C3, а затем C5.

Оставаясь в жидкой фазе, фрагмент C3b быстро расщепляется в двух точках фактором I в присутствии фактора H. В результате образуется фрагмент iC3b. Фактор I действует и на иммобилизованный C3b, но значительно слабее. Фрагмент iC3b далее расщепляется на C3c (содержит фрагменты α-цепи и связанную с ними через дисульфидные связи интактную β-цепь) и C3dg. Последний дополнительно расщепляется на фрагменты C3d и C3g (см. рис. 2.40). При деградации мембранного C3b фрагмент C3dg, а затем C3d остается связанным с мембраной, поскольку именно в них локализуются остатки, формирующие тиоэфирную связь. Перечисленные фрагменты лишены ферментативной активности, но фрагменты iC3b и C3d являются лигандами для рецепторов макрофагов и некоторых других фагоцитирующих клеток (см. раздел 2.3.4.2). Присутствие на фагоцитах рецепторов для этих фрагментов определяет значение опсонизации.

#### **2.5.1.4. Активация комплемента по лектиновому пути**

В сыворотке крови присутствует сложный белок, относящийся к семейству **коллектинов**, — маннозасвязывающий лектин (MBL — от *Mannosa-binding lectin*). MBL принадлежит к C-лектинам, т.е. связывается с полисахаридами

в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Он специфичен к остаткам маннозы (как следует из его названия) и N-ацетилглюкозамина. В зависимости от числа «жгутов», образованных полипептидными цепями 3 типов (см. выше), различают 2 разновидности MBL — MBL-I и MBL-II, содержащие соответственно 2 и 6 «жгутов». При связывании MBL с гликоконъюгатами клеточной мембраны он приобретает сродство к белкам MASP-1, MASP-2, MASP-3 (от англ. *MBL-associated serine proteases*) и MAP19 (*MBL-associated protein 19*). В результате образуется несколько типов комплексов — MBL-I–MASP-3 и MBL-II–MASP-1–MASP-2, а также комплексы, наряду с MASP содержащие и MAP19. Комплекс MBL-II–MASP-1–MASP-2 аналогичен по структуре комплексу C1qrs. При взаимодействии с MBL молекулы проферментов MASP активируются и приобретают способность расщеплять компоненты комплемента C4 и C2, проявляя полную функциональную аналогию с комплексом C1qrs. Дальнейшие реакции лектинового и классического путей активации полностью совпадают.

Запускать лектиновый путь комплемента способны также **фиколины**, сходные по структуре с коллектинами. В состав фиколинов входят домены двух типов — N-концевые коллагеновые и C-концевые фибриногеноподобные. Последние способны в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  связывать углеводы, прежде всего N-ацетилглюкозамин и маннозу. Таким образом, функционально (но не структурно) этот домен является C-лектином. Выделяют 3 вида фиколинов, обозначаемые буквами L (печеночный — от *liver*), H (от имени автора — *Hakata*) и M (моноцитарный — от *monocyte*). Два первых (L и H) присутствуют в плазме, фиколин M связан с мембраной моноцитов. L- и H-фиколины способны связывать и активировать протеазы группы MASP и, таким образом, запускать лектиновый путь активации каскада комплемента. Кроме того, L-фиколин обладает опсонизирующей активностью подобно сурфактантам A и D, относимым к группе коллектинов.

Коллектины и фиколины относят к растворимым патогенраспознающим рецепторам в связи с их способностью распознавать углеводные «образы патогенности» и запускать механизмы иммунной защиты (в рамках врожденного иммунитета).

#### 2.5.1.5. Атака клеточной мембраны

Формирование C5-конвертазы альтернативного  $[\text{P}(\text{C3b})_n\text{Bb}]$  и классического (C14b2b3b) путей активации комплемента служит основой для осуществления терминальных стадий каскада, завершающегося лизисом клетки. Результаты действия обеих C5-конвертаз идентичны: они расщепляют молекулу C5 на крупный (C5b) и мелкий (C5a) фрагменты. Специфичность действия конвертаз альтернативного и классического пути связана соответственно с Bb и C2b, тогда как C3b участвует в связывании с нативной молекулой C5. Образующийся C5b фрагмент связывается с комплексом компонентов комплемента, фиксированных на мембране клетки. Малый фрагмент C5a остается в жидкой фазе. Он обладает даже более выраженной хемотаксической и анафилактической активностью, чем C3a и C4a. Все упомянутые малые фрагменты факторов комплемента (C4a, C3a, C5a) инактивируются карбоксипептидазой N, но среди них C5a обладает наибольшей стабильностью.

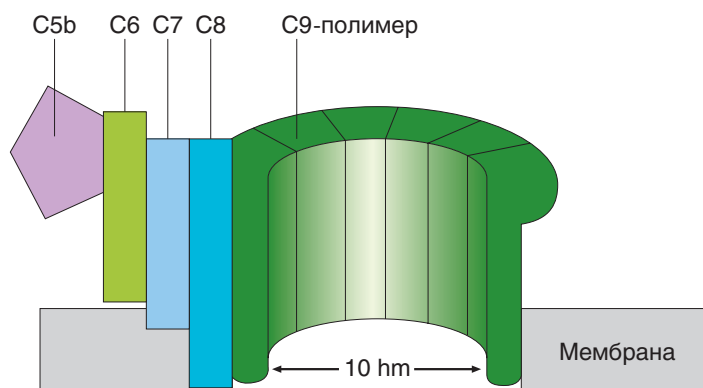


Рис. 2.42. Схема строения литического комплекса комплемента

Расщепление C5 запускает терминальный этап активации комплемента — формирование литического комплекса (рис. 2.42). Как на мембране, так и в растворе C5b обладает способностью связывать компонент C6 с образованием комплекса C5bC6. Компоненты C5b и C6 обладают довольно слабым сродством к фиксированным на мембране комплексам C5-конвертазы. Именно поэтому большинство комплексов C5bC6 оказывается в жидкой фазе и инактивируется. C6 в составе комплекса спонтанно связывает компонент C7. Формируемый комплекс C5bC6C7 связывает C8. Скорость взаимодействия компонентов комплемента обусловлена их доступностью: все компоненты в норме присутствуют в сыворотке крови в достаточно высоких концентрациях. Связывание каждого нового фактора (начиная с C6) повышает сродство комплекса к следующим компонентам; при этом комплекс становится все более прочным. Связь комплекса с мембраной усиливается благодаря наличию у C7 и более поздних компонентов гидрофобных (липофильных) участков.

C8 ограничивает образование новых комплексов C5bC5C7 и их прикрепление к мембране, т.е. является регулятором поздних стадий активации комплемента. Гидрофобный участок в молекуле C8 более протяженный, чем в C7. В связи с этим комплекс C5bC6C7C8 насквозь прошивает мембрану. Уже на этом этапе комплекс факторов комплемента способен формировать поры. Однако их диаметр слишком мал (3 мкм), чтобы нарушить изоляцию клеток от среды и вызвать ее гибель. Комплекс C5bC6C7C8 вызывает медленный лизис только эритроцитов. Возможно, этот слабовыраженный лизис клеток играет роль в защите от некоторых патогенов, поскольку генетические дефекты любого из факторов от C5 до C8 приводят к нарушению устойчивости к нейссериям, тогда как дефект C9 такого эффекта не вызывает.

Завершающий этап формирования литического комплекса состоит в присоединении к комплексу C5bC6C7C8 12–20 молекул C9, повышающих литическую активность комплекса в 1000 раз. Подобно родственному белку — перфору, C9 способен к полимеризации. Поскольку C9 имеет гидрофобный участок, он встраивается в мембрану и полимеризуется в ней с

образованием пронизывающего мембрану цилиндра, используя в качестве «строительного каркаса» комплекс C5bC6C7C8. Цилиндр, образуемый компонентами C9, может быть извлечен из мембраны только с помощью детергентов. Внутри цилиндра обращены гидрофильные участки молекулы, а гидрофобные участки — в сторону мембранного окружения. Молекулярная масса комплекса  $(1-1,7) \times 10^3$  кДа. Высота цилиндра — около 15 нм, диаметр — 8–12 нм. Формирующиеся поры обеспечивают возможность поступления в клетку протонов, ионов  $\text{Na}^+$  и молекул воды (но не белков), что может привести к разрыву мембраны и гибели клетки по механизму некроза. В то же время роль прямого повреждения мембраны очевидна только для эритроцитов, но не для бактериальных клеток.

Комплекс C5bC6C7C8C9<sub>n</sub> может сформироваться и в жидкой фазе, но он лишен активности из-за присутствия в его составе сывороточного белка — фактора S, препятствующего формированию литически активного димера C5bC6C7C8C9. Аналогичной ингибирующей активностью обладают липопротейны низкой плотности. Некоторые ингибирующие вещества (протектин, DAF, C4bp, гликофорин) взаимодействуют с атакующим комплексом в составе мембраны и препятствуют лизису клеток, в частности, аутолизу клеток хозяина.

#### 2.5.1.6. Факторы контроля системы комплемента

Уже упоминалось о факторах, инактивирующих и расщепляющих активные компоненты комплемента. Эти факторы играют важную роль в предотвращении повреждающего действия комплемента на собственные клетки организма, разрушая активные компоненты на клеточной мембране и в растворимой фазе. Компоненты комплемента, фиксированные на бактериальных клетках, расщепляются факторами рассматриваемой группы медленнее представленных в свободной форме.

При запуске классического пути активации комплемента действуют **C1-ингибитор** ( $\text{C1}_{\text{inh}}$ ).  $\text{C1}_{\text{inh}}$  относят к семейству антитрипсиновых протеаз (серпинов). Он специфически связывает C1r и C1s, блокируя их активность в отношении молекулы C4 и отщепляя их от комплекса C1qrs. Известен наследственный дефект  $\text{C1}_{\text{inh}}$ , называемый по главному клиническому проявлению **ангионевротический отек**. Причина такого отека, иногда представляющего угрозу жизни, состоит в чрезмерной активации калликреина (для которого  $\text{C1}_{\text{inh}}$  служит ингибитором) и образовании вследствие этого избыточных количеств кининов.

Большинство регуляторных факторов участвуют в контроле центрального звена активации комплемента, связанного с формированием и функционированием C3-конвертаз. **Фактор I** относят к нейтральным сериновым протеазам. Он обладает родством к фрагментам C4b и C3b. Для проявления своей активности **фактору I** необходимо наличие кофакторов: сывороточных белков — **фактора H** и **C4Br** (*C4 binding protein*), а также мембранных белков — C3-рецептора **CR1** (*Complement receptor 1*) и кофакторного белка **MCP** (*Membrane cofactor protein*). C4Br связывает сывороточный белок C4b. Затем C4b расщепляется фактором I. Факторы H, CR1 и MCP связывают C3b (как в растворимой фазе, так и на мембране) и облегчают взаимодействие с ним фактора I. Представленный почти на всех ядродержащих клетках фактор

**DAF** (*Decay-activating factor*, CD55) — мембранный ингибитор C3-конвертаз C4bC2b и C3bBb. DAF вызывает их распад и связывает фрагменты C3b или C4b. Факторы H и MCP отвечают преимущественно за контроль альтернативного, а C4Вр и DAF — классического пути активации комплемента.

На этапе литической атаки регулирующую роль выполняют **витронектин, протектин и белок C8Вр** (*C8-binding protein*). Адгезивный белок витронектин (S-протеин) связывается с комплексом C5bC6C7, препятствуя его взаимодействию с мембраной, и блокирует полимеризацию C9. C8Вр препятствует связыванию фактора C9 с C8, взаимодействуя с участком молекулы C8, к которому обладает родством молекула C9.

#### **2.5.1.7. Роль комплементзависимых процессов в иммунной защите и повреждении**

Комплементзависимый лизис бактериальных клеток — один из факторов противоинфекционной защиты, участвующий в повреждении микроорганизмов при инфекционном процессе. В то же время он обуславливает гемолиз при переливании несовместимой крови и анемии аутоиммунного генеза, участвует в повреждении ядросодержащих клеток при аутоиммунной патологии. Однако литическая функция комплемента в отношении ядросодержащих клеток, проявляется весьма слабо в связи с существованием на их поверхности белков, инактивирующих факторы комплемента. В настоящее время считают, что система комплемента вносит ограниченный вклад в защиту от патогенных микроорганизмов. В частности, комплемент эффективно уничтожает нессерий, поскольку, как уже отмечено, при наследственном дефекте компонентов литического комплекса снижается резистентность именно к этим возбудителям. При этом значимость C9 и, следовательно, комплементзависимого цитолиза, подвергается сомнению вследствие полной «безнаказанности» с клинической точки зрения инактивации его гена.

Роль системы комплемента в защите от патогенов заключается, по-видимому, в первую очередь в опсонизации клеток-мишеней, что делает их доступными для действия эффекторных клеток, имеющих рецепторы для компонентов комплемента, — прежде всего фагоцитов (макрофагов и нейтрофилов). Наиболее распространены рецепторы для C3b и его фрагментов C3d, C3bi (см. табл. 2.17), что свидетельствует об особой функциональной значимости избыточной фиксации C3b на поверхности клеток. Лимфоциты тоже имеют рецептор для фрагментов C3b (CR2, или CD21). Более того, CR2 в качестве корецептора входит в состав рецепторного комплекса В-лимфоцитов (см. раздел 3.1.2). Полагают, что распознавание опсонизированных клеток лимфоцитами (особенно В-клетками) является одним из механизмов, определяющих их активацию и участие в регуляции иммунных процессов. Иммунорегуляторная роль компонентов комплемента состоит и в солюбилизации (переводе в растворимую форму) иммунных комплексов.

Как уже упоминалось, освобождающиеся при активации комплемента фрагменты C4a, C3a и C5a — активные хемотаксические и сосудорасширяющие факторы, а C5a и C3a обладают анафилактической активностью и участвуют в реакциях воспаления и гиперчувствительности (отсюда их название — анафилатоксины). Рецепторы для этих фрагментов присутствуют на поверхности нейтрофилов и макрофагов, что обуславливает хемо-

таксический эффект названных фрагментов, а также на тучных клетках и базофилах, что определяет их анафилактические функции. С4а, С3а и С5а играют особую роль в системе комплемента, поскольку факторы, ограничивающие их действие, отсутствуют (у всех остальных компонентов системы комплемента ингибиторы имеются).

Система комплемента взаимодействует с другими гуморальными системами, активируемыми при воспалительных процессах и способствует вовлечению этих систем в реакцию иммунного воспаления. Наконец, отложение компонентов комплемента в составе иммунных комплексов на биологических мембранах инициирует развитие иммунопатологии в результате привлечения в очаг поражения макрофагов и других эффекторов иммунного воспаления.

### 2.5.2. Белки острой фазы воспаления. Пентраксины

Некоторые гуморальные реакции врожденного иммунитета по своему назначению аналогичны реакциям адаптивного иммунитета и могут рассматриваться как их эволюционные предшественники. Такие реакции врожденного иммунитета имеют преимущество перед адаптивным иммунитетом в скорости развития, однако недостаток их заключается в отсутствии специфичности в отношении антигенов. Пару сходных по результатам реакций врожденного и адаптивного иммунитета мы рассмотрели выше в разделе, посвященном комплементу (альтернативная и классическая активация комплемента). Другой пример будет рассмотрен в данном разделе: белки острой фазы в ускоренном и упрощенном варианте воспроизводят некоторые эффекты антител.

Белки (реактанты) острой фазы представляют группу протеинов, секретируемых гепатоцитами. При воспалении продукция белков острой фазы изменяется. При усилении синтеза белки называют положительными, а при понижении синтеза — отрицательными реактантами острой фазы воспаления. Перечень белков острой фазы, относящихся к этим двум группам, представлен в табл. 2.25. Динамика и выраженность изменений сывороточной концентрации различных белков острой фазы при развитии воспаления неодинакова: концентрация С-реактивного белка и сывороточного амилоида Р возрастает очень сильно (в десятки тысяч раз) — быстро и кратковременно (практически нормализуется к концу 1-й недели); уровни гаптоглобина и фибриногена возрастают слабее (в сотни раз) соответственно на 2-й и 3-й неделях воспалительной реакции. В данной главе будут рассмотрены только положительные реактанты, участвующие в иммунных процессах.

**Таблица 2.25.** Положительные и отрицательные реактанты острой фазы у человека

Группа белков	Положительные реактанты острой фазы	Отрицательные реактанты острой фазы
Пентраксины	С-реактивный белок, сывороточный амилоид А, пентраксин 3	Нет
Транспортные белки	Маннозасвязывающий белок, гаптоглобин, гемопексин, церулоплазмин, оромукоид, преальбумин, липокалины	Трансферрин, ретинолсвязывающий белок

Окончание табл. 2.25

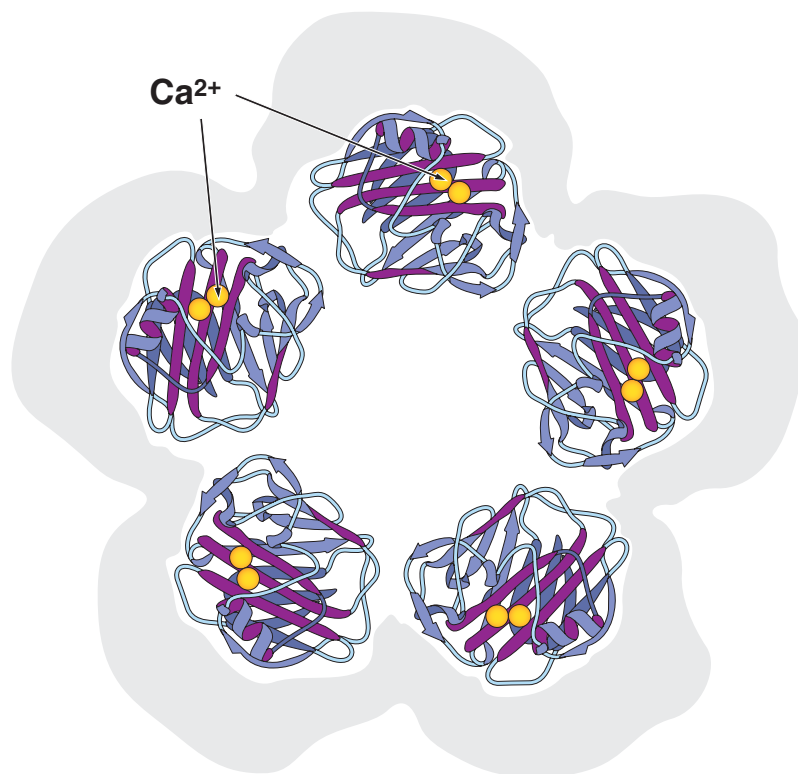
Группа белков	Положительные реактанты острой фазы	Отрицательные реактанты острой фазы
Протеазы	Трипсиноген, эластаза, катепсины, гранзимы, триптазы, химазы, металлопротеиназы	Нет
Ингибиторы протеаз	$\alpha_2$ -макроглобулин, $\alpha_1$ -антитрипсин, $\alpha_1$ -антихимотрипсин	Нет
Компоненты комплемента	C1-ингибитор, компоненты C2, C3, C4, фактор В	Пропердин
Факторы свертывания крови	Фибриноген, протромбин, фактор VIII, плазминоген	Фактор XII
Прочие белки	Ангиотензиноген, фибронектин, прокальцитонин, тенасцин С, ЛПС-связывающий белок	Альбумин, липопро-теиды низкой и очень низкой плотности

Согласно выполняемым функциям выделяют несколько групп белков острой фазы. К транспортным белкам относят преальбумин, альбумин, оромукоид, липокалина, гаптоглобин, трансферрин, маннозасвязывающий и ретинолсвязывающий белки и т.д. Они играют роль переносчиков метаболитов, ионов металлов, физиологически активных факторов. Роль факторов этой группы существенно возрастает и качественно изменяется при воспалении. Другую группу образуют протеазы (трипсиноген, эластаза, катепсины, гранзимы, триптазы, химазы, металлопротеиназы), активация которых необходима для формирования многих медиаторов воспаления, а также для осуществления эффекторных функций, в частности киллерной. Активация протеаз (трипсина, химотрипсина, эластазы, металлопротеиназ) уравнивается накоплением их ингибиторов.  $\alpha_2$ -Макроглобулин участвует в подавлении активности протеаз разных групп. Помимо перечисленных, к белкам острой фазы относят факторы коагуляции и фибринолиза, а также белки межклеточного матрикса (например, коллагены, эластины, фибронектин) и даже белки системы комплемента.

### **Пентраксины**

Наиболее полно проявляют свойства реактантов острой фазы белки семейства пентраксинов: в первые 2–3 сут развития воспаления их концентрация в крови повышается на 4 порядка.

Основа для выделения этого семейства белков — структурные особенности модуля, являющегося их обязательной составной частью. Пентраксиновый модуль представляет кольцевидный гомопентамер. Он состоит из 5 нековалентно связанных одинаковых субъединиц (рис. 2.43). Субъединица образована 206 аминокислотными остатками и имеет молекулярную массу около 20–23 кДа. Структура субъединицы стабилизируется дисульфидной связью, придающей ей форму глобулы, в которой преобладают  $\beta$ -слоистые структуры (примерно 50%), соединенные  $\alpha$ -спирализованными участками (12%). Сердцевину каждого мономера образуют 2 антипараллельных  $\beta$ -слоя. Такие структуры обозначают термином «желатиновый рулет» (*jelly roll*).

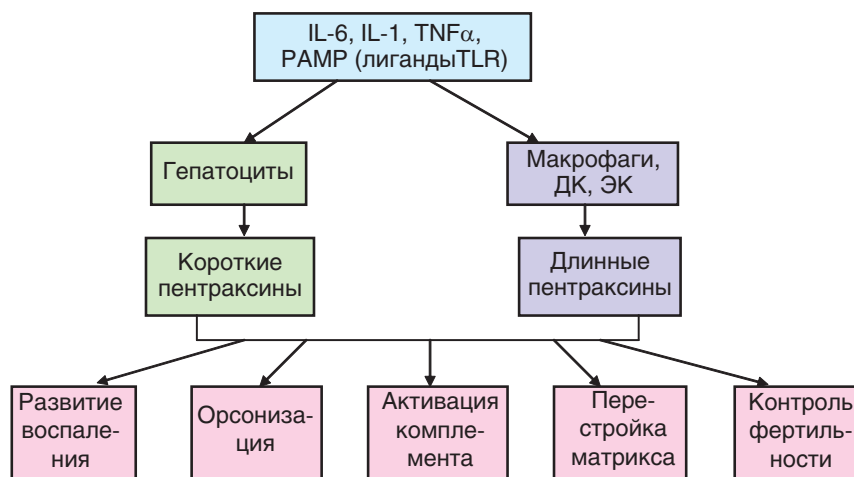


**Рис. 2.43.** Строение представителя семейства пентраксинов С-реактивного белка. Пять доменов объединены нековалентными связями в кольцевую структуру и формируют молекулу С-реактивного белка. Лигандсвязывающие сайты содержат по 2 иона кальция

Выделяют 2 группы пентраксинов — короткие и длинные (рис. 2.44). К коротким, содержащим только пентраксиновые домены, относят 2 острофазных реактанта — С-реактивный белок и сывороточный амилоид Р. К длинным пентраксинам относят белки, содержащие С-концевой пентраксиновый домен и N-концевой домен (тоже пятичленный, но имеющий другую структуру). Наиболее изучен в этой группе белок РТХ3 (пентраксин 3).

С-реактивный белок и сывороточный амилоид Р образуются и секретируются гепатоцитами. Основной индуктор их синтеза — IL-6. Белок РТХ3 вырабатывают миелоидные (макрофаги, дендритные клетки), эпителиальные клетки и фибробласты в ответ на стимуляцию через TLR, а также под действием провоспалительных цитокинов (например, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ). Концентрация пентраксинов в сыворотке резко возрастает при воспалении: С-реактивного белка и сывороточного амилоида Р — с 1 мкг/мл до 1–2 мг/мл (т.е. в 1000 раз), РТХ3 — с 25 до 200–800 нг/мл. Пик концентрации достигается через 6–8 ч после индукции воспаления.

Для пентраксинов характерна способность связываться с самыми разнообразными молекулами. С-реактивный белок был впервые идентифи-



**Рис. 2.44.** Происхождение и функции пентраксинов: ДК — дендритные клетки; ЭК — эндотелиальные клетки; PAMP — патогенассоциированные молекулярные паттерны («образы патогенности»)

цирован благодаря его способности связывать полисахарид С (*Streptococcus pneumoniae*), что и определило его название. Пентраксины взаимодействуют и с множеством других молекул: С1q, бактериальными полисахаридами, фосфорилхолином, гистонами, ДНК, полиэлектролитами, цитокинами, белками межклеточного матрикса, сывороточными липопroteинами, компонентами комплемента, друг с другом, а также с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и других металлов. Для всех рассматриваемых пентраксинов существуют высокоаффинные рецепторы на миелоидных, лимфоидных, эпителиальных и других клетках. Кроме того, эта группа белков острой фазы обладает достаточно высоким сродством к таким рецепторам, как FcγRI и FcγRII.

Многочисленность молекул, с которыми взаимодействуют пентраксины, определяет широкое разнообразие их функций. Распознавание и связывание пентраксинами PAMP дает основание рассматривать их как вариант растворимых патогенраспознающих рецепторов (см. раздел 2.2). К наиболее важным функциям пентраксинов относят их участие в реакциях врожденного иммунитета в качестве факторов, запускающих активацию комплемента через С1q и участвующих в опсонизации микроорганизмов. Комплемент-активирующая и опсонизирующая способность пентраксинов делает их своеобразными «протоантителами», частично выполняющими функции антител на начальном этапе иммунного ответа, когда истинные адаптивные антитела еще не успели выработаться. Роль пентраксинов во врожденном иммунитете заключается также в активации нейтрофилов и моноцитов/макрофагов, регуляции синтеза цитокинов и проявлении хемотаксической активности по отношению к нейтрофилам.

Помимо участия в реакциях врожденного иммунитета пентраксины регулируют функции межклеточного матрикса при воспалении, контроле апоптоза и элиминации апоптотических клеток.

### 2.5.3. Биогенные амины

К этой группе медиаторов относят **гистамин** и **серотонин**, содержащиеся в гранулах тучных клеток. Освобождаясь при дегрануляции (см. раздел 4.5.1.3), эти амины вызывают разнообразные эффекты, играющие ключевую роль в развитии ранних проявлений гиперчувствительности немедленного типа.

Гистамин (5-β-имидазолилэтиламин) — главный медиатор аллергии. Он образуется из гистидина под влиянием фермента гистидиндекарбоксилазы (рис. 2.45). Поскольку гистамин содержится в гранулах тучных клеток в готовом виде, а процесс дегрануляции происходит быстро, гистамин очень рано появляется в очаге аллергического поражения, причем сразу в большой концентрации, что определяет проявления немедленной гиперчувствительности. Гистамин-быстро метаболизируется (95% за 1 мин) с участием 2 ферментов — гистамин-N-метилтрансферазы и диаминооксидазы (гистаминазы); при этом образуется (в соотношении примерно 2:1) соответственно N-метилгистамин и имидазолацетат.

Известно 4 разновидности рецепторов для гистамина  $H_1$ - $H_4$ . При аллергических процессах гистамин действует преимущественно на гладкие мышцы и эндотелий сосудов, связываясь с их  $H_1$ -рецепторами. Эти рецепторы поставляют активационный сигнал, опосредованный превращениями фосфоинозитидов с образованием диацилглицерола и мобилизацией  $Ca^{2+}$ . Этот процесс в различных клетках проявляется по-разному, однако конечный результат его — расширение сосудов с усилением локального кровотока и повышением проницаемости капилляров. Указанные эффекты частично обусловлены образованием в клетках (мишенях гистамина) оксида азота и простаглицлина. Действуя на нервные окончания, гистамин вызывает ощущение зуда, характерного для аллергических проявлений в коже.

У человека гистамин играет важную роль в развитии кожной гиперемии и аллергического ринита. Менее очевидно его участие в развитии

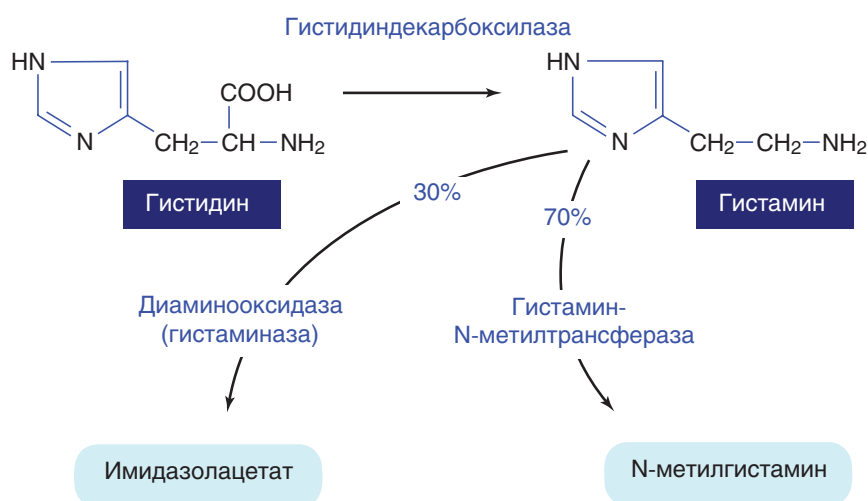


Рис. 2.45. Молекулярные превращения гистидина и гистамина

общих аллергических реакций и бронхиальной астмы. В то же время через  $H_2$ -рецепторы гистамин и родственные вещества оказывают регуляторное действие, иногда уменьшающее проявления воспаления, ослабляя хемотаксис нейтрофилов и выброс ими лизосомных ферментов, а также высвобождение самого гистамина. Через  $H_2$ -рецепторы гистамин действует на сердце, секреторные клетки желудка, подавляет пролиферацию и цитотоксическую активность лимфоцитов, а также секрецию ими цитокинов. Большинство этих эффектов опосредовано активацией аденилатциклазы и повышением внутриклеточного уровня цАМФ. Данные об относительной роли различных рецепторов гистамина в реализации его действия очень важны, поскольку многие антиаллергические препараты представляют собой блокаторы  $H_1$  (но не  $H_2$  и других) рецепторов гистамина.

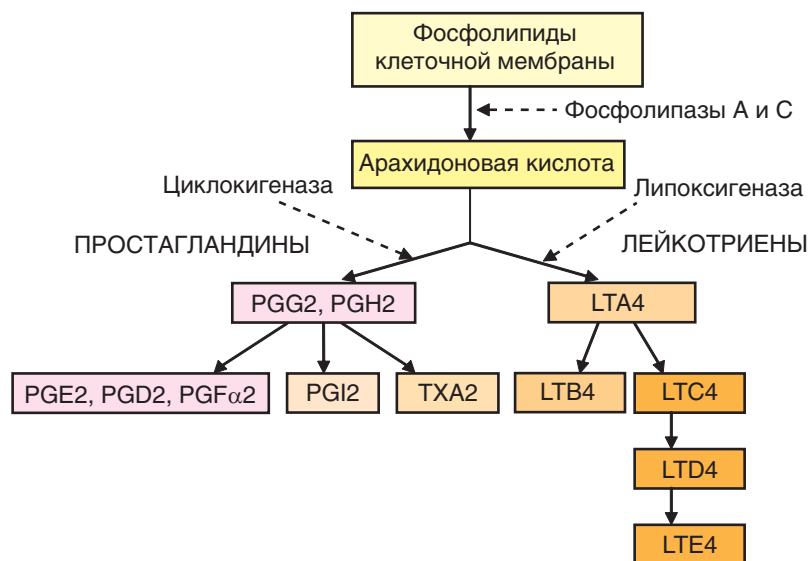
#### 2.5.4. Липидные медиаторы. Эйкозаноиды

Важную роль в регуляции иммунных процессов, а также в развитии аллергических реакций играют гуморальные факторы липидной природы. Наиболее многочисленны и важны из них эйкозаноиды.

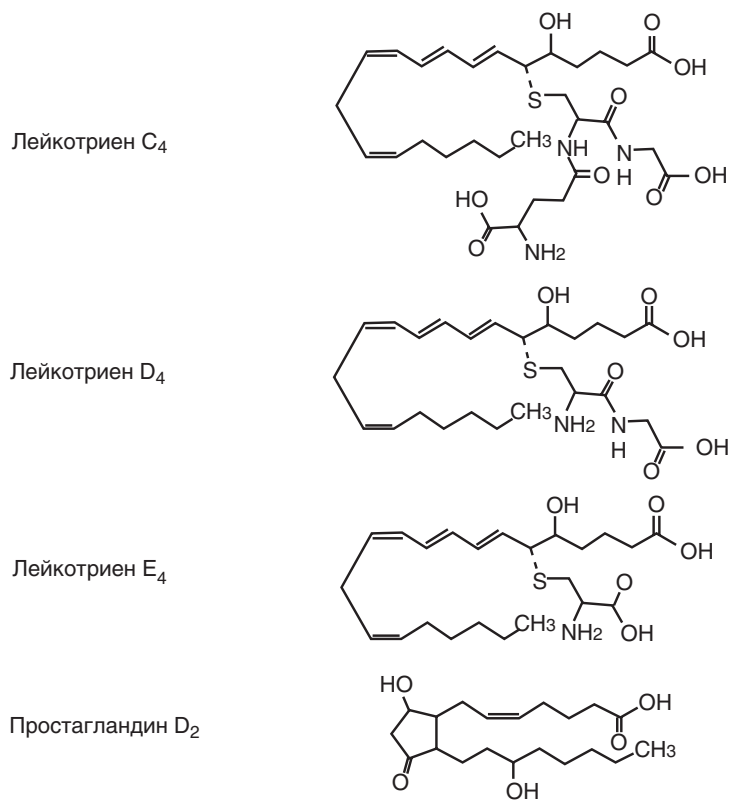
Эйкозаноиды — продукты метаболизма **арахидоновой кислоты** — жирной полиненасыщенной кислоты, молекула которой содержит 20 атомов углерода и 4 ненасыщенные связи. Арахидоновая кислота образуется из мембранных фосфолипидов как прямой продукт действия фосфолипазы А (PLA) или косвенный продукт превращений, опосредованных PLC. Образование арахидоновой кислоты или эйкозаноидов происходит при активации различных типов клеток, особенно участвующих в развитии воспаления, в частности аллергического: эндотелиальных и тучных клеток, базофилов, моноцитов и макрофагов. Схема превращений арахидоновой кислоты представлена на рис. 2.46, а структура и биологическая активность образующихся при этом продуктов — на рис. 2.47 и в табл. 2.26 соответственно. Метаболизм арахидоновой кислоты может проходить по 2 путям — катализироваться циклооксигеназой или 5'-липоксигеназой. Циклооксигеназный путь приводит к образованию **простагландинов** и **тромбоксанов** из нестабильных промежуточных продуктов — эндоперекисных простагландинов  $G_2$  и  $H_2$ , а липоксигеназный — к образованию **лейкотриенов** и 5-гидроксиэйкозатетраеноата через промежуточные продукты (5-гидроперокси-6,8,11,14-эйкозатетраеновую кислоту и лейкотриен  $A_4$ ), а также **липоксенов** — продуктов двойной липоксигенации (под действием двух липоксигеназ — см. далее).

Простагландины и лейкотриены во многих отношениях проявляют альтернативные физиологические эффекты, несмотря на то, что внутри этих групп существуют значительные различия в активности. Общее свойство этих групп факторов — преобладающее действие на стенку сосудов и гладкие мышцы, а также хемотаксический эффект. Эти эффекты реализуются при взаимодействии эйкозаноидов со специфическими рецепторами на поверхности клеток. Некоторые представители семейства эйкозаноидов усиливают действие других вазоактивных и хемотаксических факторов, например, анафилатоксинов ( $C_3a$ ,  $C_5a$ ).

Лейкотриены (LT) —  $C_{20}$ -жирные кислоты, молекула которых в положении 5 содержит ОН-группу, а в положении 6 — боковые серосодержащие



**Рис. 2.46.** Метаболизм арахидоновой кислоты: LT — лейкотриены; PT — простагландины; TX — тромбоксан



**Рис. 2.47.** Химическая структура иммунологически наиболее значимых эйкозаноидов

цепи, например глутатион. Выделяют 2 группы лейкотриенов: одна из них включает лейкотриены C4, D4 и E4, называемые цистеиниллейкотриенами (Cys-LT), во вторую входит один фактор — лейкотриен B4. Лейкотриены образуются и секретируются в течение 5–10 мин после активации тучных клеток или базофилов. Лейкотриен C4 присутствует в жидкой фазе в течение 3–5 мин, при этом он превращается в лейкотриен D4. Лейкотриен D4 существует в последующие 15 мин, медленно превращаясь в лейкотриен E4.

**Таблица 2.26.** Биологические эффекты эйкозаноидов

Название	Клетки-продуценты	Действие на сосуды	Действие на бронхи	Хемотаксическое действие	Активация клеток
<b>Лейкотриены</b>					
Лейкотриены D4, C4, E4	Макрофаги, тучные клетки	Расширяют, повышают проницаемость	Сильный спазм	+	Подавляют
Лейкотриен B4	Тучные клетки, нейтрофилы	Сильно расширяют	Спазм	++	Активирует макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, Т-клетки
<b>Простагландины</b>					
Простагландин E2	Макрофаги, нейтрофилы	Расширяет, усиливая эффект гистамина	Расширяет. На фоне действия лейкотриенов — спазм	+	Подавляет активность макрофагов, Т-клеток, агрегацию тромбоцитов
Простагландины F2 $\alpha$ , D2	Макрофаги, тучные клетки	Расширяют	Спазм	±	Подавляют агрегацию тромбоцитов
Простагландин I2	Эндотелий	Сильно расширяет, повышает проницаемость	Не влияет	—	То же
<b>Тромбоксаны</b>					
Тромбоксан A2	Макрофаги, тромбоциты	Суживает	Спазм	—	Вызывают агрегацию тромбоцитов

Лейкотриены оказывают свое действие через рецепторы, относящиеся к группе пуриновых рецепторов семейства родопсиноподобных рецепторов, 7-кратно пронизывающих мембрану и связанных с протеином G (см. раздел 2.3.2.2). Известны 2 группы рецепторов для лейкотриенов — CysLT-R и BLT-R соответственно для цистеиниллейкотриенов и лейкотриена B.

В каждую группу входят по 2 разновидности рецепторов (CysLT-R1, CysLT-R2, BLT-R1 и BLT-R2). Сродство лейкотриена E к CysLT-R выше, чем лейкотриенов D и C. CysLT-R1 имеет максимальное сродство к лейкотриену D, тогда как CysLT-R2 с одинаковой эффективностью связывает лейкотриены D и C. Рецепторы лейкотриенов экспрессируются на клетках селезенки, лейкоцитах крови, кроме того, CysLT-R1 представлен на макрофагах, клетках кишечника, воздухоносного эпителия, а CysLT-R2 — на клетках надпочечников и головного мозга.

Цистеиниловые лейкотриены (особенно лейкотриен D4) вызывают спазм гладкой мускулатуры и регулируют локальный кровоток, снижая артериальное давление. Активность лейкотриена D4 в отношении гладких мышц в 100 раз выше, чем у гистамина, и в 2–4 раза выше, чем лейкотриенов C4 и E4. Лейкотриены C4 и E4 также оказывают хемотаксическое действие, но более слабое, чем лейкотриен D4. Цистеиниловые лейкотриены — медиаторы аллергических реакций, в частности, медленной фазы бронхоспазма при бронхиальной астме. Кроме того, они подавляют пролиферацию лимфоцитов и способствуют их дифференцировке. Ранее комплекс этих факторов (лейкотриены C4, D4 и E4) называли медленно реагирующей субстанцией А. Лейкотриен B4 (дигидроксиэйкозатетраеновая кислота) проявляет хемотаксическое и активирующее действие преимущественно в отношении моноцитов, макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов и даже Т-клеток. Еще один продукт липоксигеназного пути — 5-гидроксиэйкозатетраеноат — менее активен, чем лейкотриены, но может служить хемоаттрактантом и активатором нейтрофилов и тучных клеток.

Простагландины (PG) — C<sub>20</sub>-жирные кислоты, молекула которых содержит цикlopентановое кольцо. Варианты простагландинов, отличающиеся по типу и положению замещающих групп (окси-, гидрокси-), обозначаются различными буквами; цифры в названии означают число ненасыщенных связей в молекуле. Простагландины накапливаются в очаге воспаления позже кининов и гистамина, несколько позже лейкотриенов, но одновременно с монокинами (через 6–24 ч после запуска воспаления). Помимо вазоактивного и хемотаксического эффекта, достигаемого в кооперации с другими факторами, простагландины (особенно простагландин E2) оказывают регулирующее действие при воспалительных и иммунных процессах. Экзогенный простагландин E2 вызывает некоторые проявления воспалительной реакции, но подавляет иммунный ответ и аллергические реакции. Так, простагландин E2 снижает цитотоксическую активность макрофагов, нейтрофилов и лимфоцитов, пролиферацию лимфоцитов, выработку этими клетками цитокинов. Он способствует дифференцировке незрелых лимфоцитов и клеток других кроветворных рядов. Некоторые эффекты простагландина E2 связаны с повышением уровня внутриклеточного цАМФ. Простагландины E2 и D2 подавляют агрегацию тромбоцитов; простагландины F2 и D2 вызывают сокращение гладкой мускулатуры бронхов, тогда как простагландин E2 расслабляет ее.

Тромбоксан A2 (TXA2) — C<sub>20</sub>-жирная кислота; в его молекуле есть 6-членное кислородсодержащее кольцо. Это очень нестабильная молекула (время полужизни — 30 с), превращающаяся в неактивный тромбоксан B2.

Тромбоксан А<sub>2</sub> вызывает сужение сосудов и бронхов, агрегацию тромбоцитов с высвобождением из них ферментов и других активных факторов, способствующих митогенезу лимфоцитов. Другой продукт циклоксигеназного пути — простагландин I<sub>2</sub> (простациклин) — тоже нестабилен. Он проявляет свое действие через цАМФ, сильно расширяет сосуды, увеличивает их проницаемость, ингибирует агрегацию тромбоцитов. Наряду с пептидным фактором брадикинином простациклин вызывает ощущение боли при воспалении.

Еще один липидный медиатор — **фактор, активирующий тромбоциты** (PAF — *Platelet activating factor*) имеет другое происхождение. Он синтезируется *de novo* из лизоглицеринового эфира фосфорилхолина в тучных клетках, базофилах, нейтрофилах и моноцитах при их активации. Вызывая агрегацию тромбоцитов, этот фактор способствует выбросу содержащихся в них ферментов и активных факторов. Он повышает проницаемость сосудов, вызывая сокращение эндотелиальных клеток, активирует нейтрофилы, вызывает спазм гладкой мускулатуры бронхов и расслабляет гладкие мышцы сосудистой стенки. В связи с коротким сроком жизни PAF играет ограниченную роль в развитии аллергических реакций.

Последними в ряду эйкозаноидов были открыты липоксины. Они образуются из арахидоновой кислоты в результате последовательного действия двух липоксигеназ. Одна из них — 5-липоксигеназа — катализирует синтез лейкотриенов. В качестве другой липоксигеназы при синтезе липоксинов могут выступать 15-липоксигеназа или 12-липоксигеназа. В результате образуются липоксины А<sub>4</sub> и В<sub>4</sub>. К сходному результату приводит действие циклоксигеназы 2 в присутствии аспирина. При этом образуется аспирин-стимулированный липоксин (*Aspirin-triggered lipoxin*), обладающий сходными эффектами с липоксинами А<sub>4</sub> и В<sub>4</sub>. Липоксины быстро метаболизируются моноцитами. Действие этих молекул реализуется через рецепторы, экспрессируемые лейкоцитами, эндотелиальными и некоторыми другими клетками. Рецепторы для липоксинов сходны по структуре с лейкотриеновыми и формилпептидными (родопсиноподобными) рецепторами. Биологическое действие липоксинов состоит в подавлении хемотаксиса и адгезии клеток. В результате липоксины подавляют транссосудистую миграцию лейкоцитов. В то же время *in vitro* они вызывают спазм гладкой мускулатуры бронхов и расширяют сосуды. *In vivo* липоксины отменяют эффекты лейкотриенов. Таким образом, суммарный эффект липоксинов — противовоспалительный, на чем основано использование препаратов липоксинов в клинической практике.

## 2.5.5. Цитокины

### 2.5.5.1. Общая характеристика цитокинов

Цитокины — самая многочисленная, наиболее важная и универсальная в функциональном отношении группа гуморальных факторов системы иммунитета, в равной степени важная для реализации врожденного и адаптивного иммунитета. Цитокины участвуют во многих процессах; их нельзя назвать факторами, относящимися исключительно к иммунной системе,

поскольку они играют важную роль в кроветворении, тканевом гомеостазе, межсистемной передаче сигналов.

Цитокины можно определить как белковые или полипептидные факторы, лишенные специфичности в отношении антигенов, продуцируемые преимущественно активированными клетками кроветворной и иммунной систем и опосредующие межклеточные взаимодействия при кроветворении, воспалении, иммунных процессах и межсистемных коммуникациях.

Существует несколько классификаций цитокинов, основанных на разных принципах. Традиционная классификация отражает историю изучения цитокинов. Идея о том, что цитокины играют роль факторов, опосредующих функциональную активность клеток иммунной системы, возникла после открытия гетерогенности популяции лимфоцитов и осмысления факта, что только некоторые из них — В-лимфоциты — ответственны за образование антител. Пытаясь выяснить, не играют ли гуморальные продукты Т-клеток роль в реализации их функций, начали изучать биологическую активность факторов, содержащихся в культуральной среде Т-лимфоцитов (особенно активированных). Решение этой задачи, а также возникшего вскоре вопроса о гуморальных продуктах моноцитов/макрофагов, привело к открытию цитокинов. Вначале их называли лимфокинами и монокинами, в зависимости от того, какие клетки их продуцировали — Т-лимфоциты или моноциты. Вскоре выяснилось, что четко разграничить лимфокины и монокины нельзя, и был введен общий термин — «цитокины». В 1979 г. на симпозиуме по лимфокинам в Интерлакене (Швейцария) установили правила идентификации факторов этой группы, которым присвоили групповое название «интерлейкины» (IL) (название не только отражает способность этих молекул опосредовать межклеточные взаимодействия, но и несет отзвук названия места, где родился этот термин). Тогда же свои названия получили два первых члена этой группы молекул — IL-1 и IL-2. С тех пор все новые цитокины (кроме хемокинов — см. далее) получали обозначение IL и порядковый номер. Сводные данные об интерлейкинах представлены в табл. 2.27.

Изучение биологической роли цитокинов показало, что некоторые цитокины и даже целые их группы уже давно открыты и получили другие названия (которые за ними были сохранены). Это касается цитокинов с противовирусной активностью — интерферонов (IFN), колониестимулирующих факторов — CSF (цитокины с гемопоэтической активностью, поддерживающие рост кроветворных клеток) и факторов некроза опухоли — TNF (медиатор ЛПС, вызывающий некроз опухолевых клеток). Наконец, после введения термина «интерлейкин» была описана еще одна группа цитокинов — хемокины (хемотаксические цитокины — см. раздел 2.3.2). Общим для всех перечисленных групп признано название «цитокины». Первоначально к цитокинам относили только растворимые факторы. Однако со временем выяснилось, что некоторые из них (например IL-1 $\alpha$  у человека) существуют в основном в связанной с мембранами форме. Затем оказалось, что целым семействам цитокинов (например, семейству TNF) больше свойственна мембранная, чем секретируемая форма.

Таблица 2.27. Сводная характеристика интерлейкинов

Название	Хромосома	Молекулярная масса, кДа	Число остатков	Клетки-продуценты	Клетки-мишени	Рецепторы, их субъединицы
IL-1	2q	17,5	153	Макрофаги, дендритные клетки, В-клетки, эндотелиальные клетки, стромальные клетки	Макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, эозинофилы, Т-клетки, В-клетки, NK-клетки, гемопоэтические клетки, эндотелиальные клетки	IL-1RI, IL-1RII, IL-1Ac
IL-2	4q	15	133	Th1-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты, NK-клетки	Макрофаги, Т-клетки, В-клетки, NK-клетки	IL-2 ( $\alpha\beta\gamma^*$ )
IL-3	5q	14	133	Th-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты, тучные клетки, эндотелиальные клетки, стромальные клетки	Гемопоэтические клетки, макрофаги, эозинофилы, В-клетки	IL-3R ( $\alpha\beta$ )
IL-4	5q	15	153	Дендритные клетки, Th2-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты, тучные клетки	Макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, эозинофилы, Т-клетки, В-клетки, NK-клетки, гемопоэтические клетки, эндотелиальные клетки	IL-4R ( $\alpha\gamma^*$ )
IL-5	5q	13 × 2	115 × 2	Th2-клетки, тучные клетки, эозинофилы	Эозинофилы, Т-клетки, В-клетки	IL-5R ( $\alpha\beta$ )
IL-6	7q	21	184	Макрофаги, дендритные клетки, Th2-клетки, эндотелиальные клетки, стромальные клетки	Макрофаги, Т-клетки, В-клетки, гемопоэтические клетки	IL-6R (gp80/gp130)
IL-7	8q	25	178	Эндотелиальные клетки, стромальные клетки	Т-клетки, В-клетки, NK-клетки	IL-7 ( $\alpha\gamma^*$ )
IL-8	4q	7,5	72	Макрофаги, эндотелиальные клетки	Нейтрофилы, Т-клетки	CXCR1, CXCR2
IL-9	5q	14	126	Th2-клетки, тучные клетки	Т-клетки, В-клетки, гемопоэтические клетки	IL-9R ( $\alpha\gamma^*$ )
IL-10	1q	19	160	Макрофаги, Th1-клетки, Th2-клетки	Макрофаги, дендритные клетки, Т-клетки, В-клетки, NK-клетки	IL-10R ( $\alpha\beta$ )
IL-11	19q	23	199	NK-клетки	Гемопоэтические клетки, нейтрофилы, В-клетки	IL-11 ( $\alpha$ /gp130)

Продолжение табл. 2.27

Название	Хромосома	Молекулярная масса, кДа	Число остатков	Клетки-продуценты	Клетки-мишени	Рецепторы, их субъединицы
IL-12	3p/5q	35/40	253/328	Макрофаги, дендритные клетки, цитотоксические Т-лимфоциты, В-клетки	Т-клетки, В-клетки, NK-клетки, гемопозитивные клетки, нейтрофилы, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, дендритные клетки	IL-12β1/ IL-12β2
IL-13	5q	10	132	Th2-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты, тучные клетки	Макрофаги, В-клетки, NK-клетки, гемопозитивные клетки, эпителиальные клетки	IL-13R (α/IL-4α)
IL-14	1p	61	546	Эндотелиальные и другие клетки мезенхимального происхождения	В-клетки	IL-4
IL-15	4q	14	114	Макрофаги, дендритные клетки, эндотелиальные клетки, стромальные клетки	NK-клетки, Т-клетки	IL-15 (αβγ*)
IL-16	15q	67	631	Эндотелиальные клетки, эозинофилы	Т-клетки, В-клетки	CD4
IL-17	A—6p; B—5q; C—16p; D—13q; F—6p	A—17; B—56; C—22; D—22; F—18	A—155; B—552; C—197; D—202; F—163	Th17-клетки, макрофаги	Нейтрофилы, эндотелиальные клетки	IL-17AR IL-17BR
IL-18	11q	22	193	Макрофаги, дендритные клетки	Макрофаги, Т-клетки, NK-клетки, дендритные клетки, эндотелиальные клетки	IL-18R1, IL-18R2
IL-19	1q	18	153	Макрофаги	Т-клетки	IL-20R (αβ)
IL-20	1q	18 × 2	152	Макрофаги	Т-клетки, нейтрофилы, фибробласты, эпителиальные клетки, гемопозитивные клетки	IL-20 (αβ)

Окончание табл. 2.27

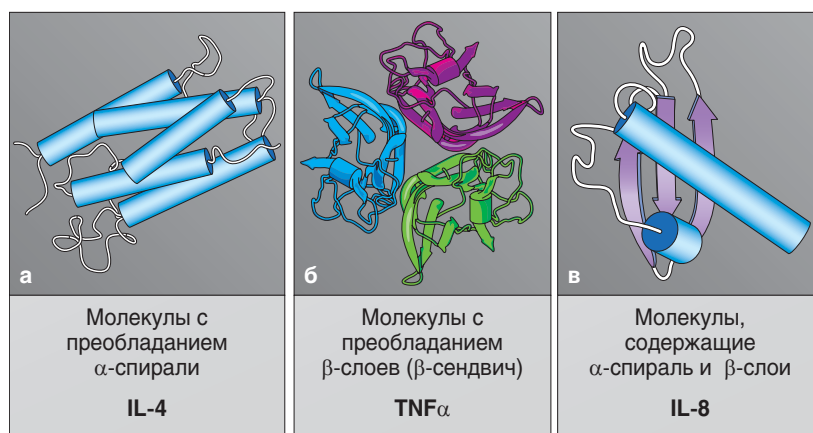
Название	Хромосома	Молекулярная масса, кДа	Число остатков	Клетки-продуценты	Клетки-мишени	Рецепторы, их субъединицы
IL-21	4q	15	55	CD4 <sup>+</sup> Т-клетки	Т-клетки, В-клетки, макрофаги, дендритные клетки, эпителиальные клетки	IL-21R ( $\alpha\gamma^*$ )
IL-22	12q	17 × 2	146	Т-клетки, В-клетки, NK-клетки, макрофаги	Т-клетки, эпителиальные клетки	IL-22R ( $\alpha\beta$ ), IL-10R2
IL-23	12q	19/41	189	Дендритные клетки, макрофаги	Th17-клетки, Т-клетки памяти, дендритные клетки, NK-клетки, NKT-клетки, гемопоэтические клетки	IL-12R $\beta$ 1/IL-23R
IL-24	1q	24	161	Макрофаги, Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки	Опухолевые клетки	IL-20RA/IL-22R
IL-25 (IL-17E)	14q	20	177	Макрофаги, эозинофилы, базофилы	Дендритные клетки, Т-клетки, эпителиальные клетки	IL-17RB
IL-26	12q	19	171	Т-клетки	Макрофаги, эпителиальные клетки	IL-20R $\alpha$
IL-27	16p	25/23	243/229	Макрофаги, дендритные клетки	CD4 <sup>+</sup> Т-клетки,	WSX-1/ TCCR
IL-28	19q	A – 22; B – 22	A – 200; B – 200	Дендритные клетки, макрофаги	Макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, Т-клетки, В-клетки, NK-клетки, фибробласты	IFN $\lambda$ -R (IL-28R1/IL-10R $\beta$ )
IL-29	19q	22	200	Дендритные клетки, макрофаги	Макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, Т-клетки, В-клетки, NK-клетки, фибробласты	IFN $\lambda$ -R (IL-28R1/IL-10R $\beta$ )
IL-30	16	28	243	Макрофаги, дендритные клетки	Т-клетки	WSX1/TCRR
IL-31	12q	18	164	Th2-клетки	Эпителиальные клетки	IL-31RA/OSMR
IL-32	16p	21	188	Активированные Т-клетки, NK-клетки	Макрофаги, дендритные клетки	
IL-33	9p	18	270	Эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, макрофаги	Т-клетки, тучные клетки	IL-1R ST2
IL-34	16q	27	244	Не установлены	Макрофаги	CFR1R

$\gamma^*$  — общая  $\gamma$ -цепь группы рецепторов.

Понятие «цитокины» достаточно трудно отграничить от понятия «ростовые факторы». Более точному пониманию понятия «интерлейкин» (фактически совпадающего с понятием «цитокин») способствовало введение Номенклатурным комитетом Международного союза иммунологических обществ в 1992 г. критериев, регламентирующих присвоение новым интерлейкинам очередного номера: для этого требуется молекулярное клонирование, секвенирование и экспрессия гена интерлейкина, удостоверяющие уникальность его нуклеотидной последовательности, а также получение нейтрализующих моноклональных антител. Для установления отличий между интерлейкинами и сходными факторами важны данные о выработке этой молекулы клетками иммунной системы (лейкоцитами) и доказательство ее роли в регуляции иммунных процессов. Таким образом, подчеркивается обязательное участие интерлейкинов в функционировании иммунной системы. Если считать, что интерлейкинами называют все открытые после 1979 г. цитокины (кроме хемокинов) и, следовательно, эти понятия фактически тождественны, то можно считать, что такие ростовые факторы, как эпидермальный, фибробластный, тромбоцитарный не являются цитокинами, а из трансформирующих факторов роста (TGF) по признаку функциональной причастности к иммунной системе лишь TGF $\beta$  может быть отнесен к цитокинам. Однако этот вопрос в международных научных документах строго не регламентирован.

Четкая структурная классификация цитокинов отсутствует. Тем не менее по особенностям их вторичной структуры выделяют несколько групп (рис. 2.48).

- **Молекулы с преобладанием  $\alpha$ -спирализованных тяжей.** Они содержат 4  $\alpha$ -спиральных домена (2 пары  $\alpha$ -спиралей, расположенных под углом друг к другу). Выделяют короткий и длинный (по протяженности  $\alpha$ -спиралей) варианты. К первому относят большинство цитокинов-гемопоэтинов — IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-13, IL-21, IL-27, IFN $\gamma$  и M-CSF; ко второму — IL-6, IL-10, IL-11 и GM-CSF.



**Рис. 2.48.** Трехмерная структура некоторых цитокинов. Приведены трехмерные модели IL-4, TNF $\alpha$  и IL-8 (CXCL8), отражающие особенности строения цитокинов, различающихся по вкладу в их структуру  $\alpha$ -спирализованных участков и  $\beta$ -слоев

- **Молекулы с преобладанием  $\beta$ -складчатых структур.** К ним относят цитокины семейства фактора некроза опухоли и лимфотоксины (« $\beta$ -трилистник»), семейство IL-1 ( $\beta$ -сендвич), семейство TGF (цитокиновый узел).
- Короткая  $\alpha/\beta$ -цепь ( $\beta$ -пласт с прилежащими  $\alpha$ -спиралями) — **хемокины**.
- Смешанные мозаичные структуры, например, IL-12.

В последние годы в связи с идентификацией большого числа новых цитокинов, иногда родственных ранее описанным, и образующих с ними единые группы, стали широко использовать классификацию, основанную на принадлежности цитокинов к структурно-функциональным семействам (табл. 2.28).

**Таблица 2.28.** Основные семейства интерлейкинов

Семейство	Цитокины	Биологические функции
Факторы гемопоэтических клеток	SCF, Flt3-L, IL-3, эритропоэтин, тромбопоэтин, GM-CSF, G-CSF, M-CSF,	Поддержание жизнеспособности и пролиферации кроветворных клеток
Интерфероны I и III типов	IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\delta$ , IFN $\kappa$ , IFN $\tau$ , IFN $\omega$ , IFN $\lambda$ (IL-28, IL-29)	Противовирусная, антипролиферативная, иммунорегуляторная активность
Семейство IL-1	IL-1 (F1-F11): IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , raIL-1, IL-18, IL-33	Провоспалительная активность, участие в развитии иммунного ответа
Семейство фактора некроза опухолей	TNF $\alpha$ , Lta, LT $\beta$ , а также мембранные молекулы (см. табл. 2.31)	Провоспалительная активность, медиаторы межклеточных взаимодействий, индукция апоптоза, участие в морфогенезе
Семейство IL-6	IL-6, IL-11, IL-31, OSM, LIF	Провоспалительное и иммунорегуляторное действие
Хемокины	Группы: CC, CXC, CX3C, C	Хемотаксис и активация клеток иммунной системы
Семейство TGF	TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , морфогенетические факторы	Регуляция воспаления, ангиогенеза, морфогенетических процессов
Семейство IL-10	IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26	Иммуносупрессивное действие
Семейство IL-12	IL-12, IL-23, IL-27	Определение направления иммунного ответа путем выбора пути дифференцировки Т-хелперов
Th1-цитокины	IFN $\gamma$ , IL-2, IL-21	Индукция Т-клеточного ответа воспалительного типа
Th2-цитокины	IL-4, IL-5, IL-9, IL-13	Индукция гуморального и антипаразитарного иммунного ответа
Семейство IL-17	IL-17A-F	Медиаторы хронического воспаления. Привлекают нейтрофилы

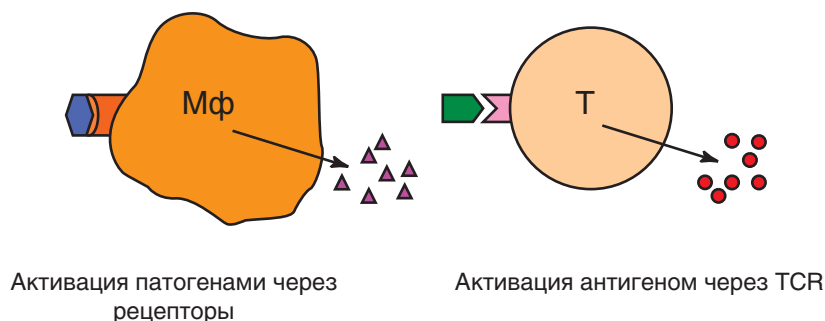
В таблицу включены только факторы, имеющие прямое отношение к развитию и функционированию клеток иммунной и кроветворной систем.

Еще одна классификация цитокинов (основана на структурных особенностях их рецепторов) будет приведена при описании цитокиновых рецепторов.

Гены цитокинов расположены в самых разных хромосомах, однако в некоторых случаях выявляется определенная закономерность. Так, 6 генов — *IL3*, *IL4*, *IL5*, *IL9*, *IL13*, *GMCSF* — формируют кластер в длинном плече хромосомы 5 человека (сегмент 5q23–33). В длинном плече хромосомы 2 локализованы гены, кодирующие несколько представителей семейства IL-1. Полагают, что это отражает происхождение разнообразия этих генов за счет дупликаций. Гены цитокинов семейства фактора некроза опухоли (*TNF*, *LTA* и *LTB*) расположены в пределах МНС (короткое плечо хромосомы 6); формально их относят к молекулам МНС класса III.

Подавляющее большинство генов цитокинов индуцибельные. Это означает, что без специального стимулирующего воздействия ген не экспрессируется и белковый продукт не образуется. Однако существует ряд исключений, например, гомеостатические цитокины (IL-7, IL-15 и некоторые другие), образуются спонтанно, однако и их выработка, как правило, при активации усиливается. Спонтанная экспрессия цитокиновых генов характерна на определенных стадиях эмбриогенеза, а также для некоторых типов клеток (в частности, для эпителиальных клеток тимуса, кератиноцитов). Индукторами цитокинов служат, как правило, естественные лиганды клеток. Для моноцитов/макрофагов — это ЛПС и другие бактериальные продукты, действующие через TLR (рис. 2.49), для лимфоидных клеток — антигены (в экспериментальных условиях также митогены), действующие через антигенраспознающие рецепторы.

Хотя разделение на монокины и лимфокины уже не применяют, необходимо признать, что существует 2 основных типа клеток-продуцентов цитокинов, отличающиеся кинетикой экспрессии генов и выработки белковых продуктов (цитокинов) — миелоидные и лимфоидные клетки. Наиболее активные продуценты — соответственно моноциты/макрофаги и Т-лимфоциты хелперной (CD4<sup>+</sup>) субпопуляции. В миелоидных клетках процессы



**Рис. 2.49.** Активация макрофагов и Т-лимфоцитов через физиологически значимые рецепторы как условие индукции синтеза цитокинов этими клетками

активации цитокиновых генов и секреции цитокинов происходят быстрее, чем в лимфоидных. Однако даже в клетках одного типа различия в кинетике экспрессии генов и синтеза различных цитокинов могут быть существенными. Так, экспрессия гена *IL-1 $\beta$*  (появление мРНК) в моноцитах человека регистрируют через 15 мин после стимуляции ЛПС, она достигает максимума через 3–4 ч, в то время как экспрессия гена *IL-1 $\alpha$*  в тех же условиях начинается через 3–4 ч и достигает максимума только через 11–12 ч. Преобладающее количество белка *IL-1 $\alpha$*  синтезируется в мембраносвязанной форме. У Т-лимфоцитов экспрессию мРНК *IL-2* регистрируют через 1 ч после стимуляции клеток митогеном, и она достигает максимума через 4–6 ч, а белковый продукт появляется в секрете через 6–10 ч, достигая максимальной концентрации к 24 ч, после чего секреция ослабевает. Экспрессия генов *IFNG* и *IL4* и синтез соответствующих цитокинов происходит медленнее. Причины кратковременности экспрессии генов индуцибельных цитокинов — регуляторные механизмы, быстро ограничивающие экспрессию гена, а также короткий срок жизни мРНК.

#### 2.5.5.2. Рецепторы для цитокинов

Действие цитокинов осуществляется через рецепторы. По особенностям структуры полипептидных цепей выделяют несколько групп цитокиновых рецепторов. Приводимую классификацию применяют именно к полипептидным цепям. В состав одного рецептора могут входить цепи, относящиеся к разным семействам. Важность этой классификации обусловлена тем, что для разных типов полипептидных цепей рецепторов характерен определенный сигнальный аппарат, состоящий из тирозинкиназ, адапторных белков и транскрипционных факторов.

В табл. 2.29 представлено 6 структурных вариантов цитокиновых рецепторов, из которых 5 отображено на рис. 2.50. Наиболее многочисленный тип — цитокиновые гемопозитиновые рецепторы. Для их внеклеточных доменов характерно наличие 4 остатков цистеина и присутствие последовательности, содержащей остатки триптофана и серина — *WSXWS*. Домены семейства фибронектина, содержащие 4 остатка цистеина, составляют основу рецепторов интерферонов. Характерная черта доменов, образующих внеклеточную часть рецепторов семейства *TNFR*, — высокое содержание остатков цистеина («богатые цистеином домены»). Эти домены содержат 6 остатков цистеина. Группа рецепторов, внеклеточные домены которых относят к суперсемейству иммуноглобулинов, включает две группы — рецепторы для *IL-1* и несколько рецепторов, цитоплазматическая часть которых обладает тирозинкиназной активностью. Тирозинкиназная активность свойственна цитоплазматической части практически всех ростовых факторов (*EGF*, *PDGF*, *FGF* и т.д.). Наконец, особую группу образуют родопсиноподобные рецепторы хемокинов, 7-кратно пронизывающие мембрану, которые были описаны выше (см. раздел 2.3.2.2). Однако не все полипептидные цепи рецепторов соответствуют этой классификации. Так, ни  $\alpha$ -, ни  $\beta$ -цепи рецептора *IL-2* не относят к семействам, представленным в табл. 2.29 ( $\alpha$ -цепь содержит домены контроля комплемента). В основные группы также не входят рецепторы *IL-12*, общая  $\beta$ -цепь рецепторов *IL-3*, *IL-5*, *GM-CSF* и некоторые другие полипептидные цепи рецепторов.

Таблица 2.29. Классификация цитокиновых рецепторов

Название групп рецепторов	Число внеклеточных доменов	Характеристика	Цитокины-лиганды
I. Гемопоэтиновые рецепторы	2–7	4 остатка Cys и наличие последовательности WSXWS	IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, G-CSF и GM-CSF, EPO
II. Рецепторы интерферонов	1–2	4 остатка Cys	IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-10
III. Рецепторы фактора некроза опухоли	1	При взаимодействии с лигандами образуют тример	TNF $\alpha$ , лимфотоксин $\alpha$
IV. Рецепторы интерлейкина-1	3	Внеклеточные домены суперсемейства иммуноглобулинов, внутриклеточный (TIR) сходен с TIR доменом TLR	IL-1, IL-18
V. Иммуноглобулиноподобные рецепторы	5	Внеклеточные домены — суперсемейства иммуноглобулинов, внутриклеточные — тирозинкиназы	M-CSF, SCF (c-kitL), Flt3L
VI. Рецепторы хемокинов	Внеклеточные домены отсутствуют	Родопсиноподобные рецепторы, 7-кратно пронизывающие мембрану. Связаны с G-белком	Хемокины
VII. Другие	Обычно 1	Различные типы структуры	IL-2, IL-15, TGF $\beta$

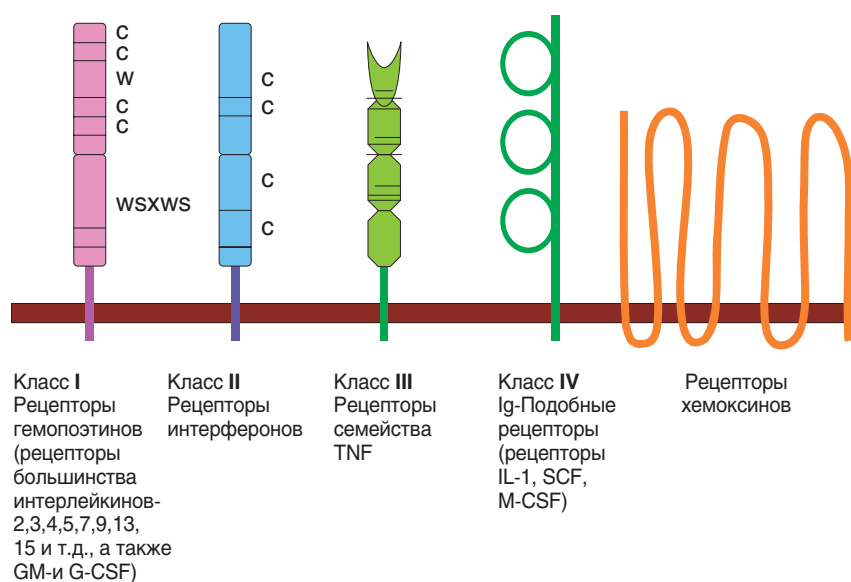
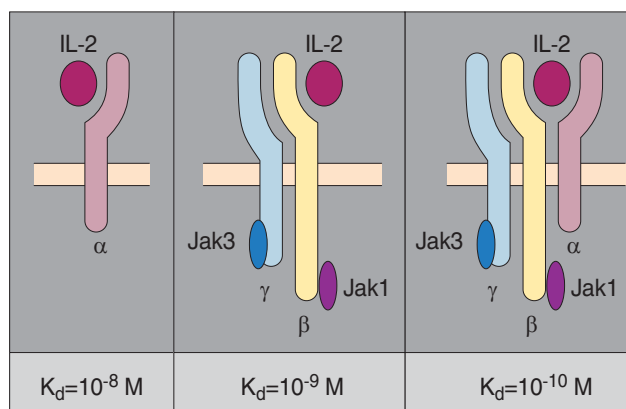


Рис. 2.50. Основные типы цитокиновых рецепторов



**Рис. 2.51.** Разновидности рецепторов для IL-2. Связь аффинности с субъединичным составом. Указаны цепи ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), лиганд (IL-2) и Jak-киназы, связанные с полипептидными цепями

Практически все цитокиновые рецепторы (кроме иммуноглобулиноподобных, обладающих киназной активностью) состоят из нескольких полипептидных цепей. Нередко разные рецепторы содержат общие цепи. Наиболее яркий пример —  $\gamma$ -цепь, общая для рецепторов IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21, обозначаемая как  $\gamma(c)$ . Дефекты этой цепи играют важную роль в развитии иммунодефицитной патологии (см. раздел 4.7.1.5). Общая  $\beta$ -цепь входит в состав рецепторов GM-CSF, IL-3 и IL-5. Общие цепи имеют IL-7 и TSLP ( $\alpha$ -цепь), а также IL-2 и IL-15, IL-4 и IL-13 (в обоих случаях —  $\beta$ -цепь).

Роль субъединичного состава в формировании аффинности рецептора удобно иллюстрировать на примере рецептора для IL-2. Все полипептидные цепи, входящие в его состав, участвуют в формировании связывающего участка для IL-2 — 3 варианта этого рецептора с разным сродством к IL-2 (низким, промежуточным и высоким) различаются по «степени укомплектованности» полипептидными цепями (рис. 2.51). Так, отдельно экспрессируемая  $\alpha$ -цепь способна связывать IL-2 с низким сродством ( $K_d = 10^{-8}$  M), но не способна передавать сигнал в клетку. Димер  $\beta\gamma$  обладает промежуточным сродством к IL-2 ( $K_d = 10^{-9}$  M); этот вариант рецептора присутствует на поющих клетках и естественных киллерах, причем на последних он передает сигнал. Активированные Т-клетки, а также регуляторные Т-клетки и некоторые естественные киллеры экспрессируют высокоаффинный тримерный рецептор состава  $\alpha\beta\gamma$  с  $K_d = 10^{-10}$  M.

Как правило, рецепторы представлены на поверхности поющих клеток в небольшом количестве и нередко в неполном субъединичном составе. Обычно в таком состоянии рецепторы обеспечивают адекватный ответ только при действии очень высоких доз цитокинов. При активации клеток число мембранных рецепторов цитокинов увеличивается на порядки, более того, эти рецепторы «доукомплектовываются» полипептидными цепями, как это было показано выше на примере рецептора для IL-2. Под влиянием активации число молекул этого рецептора значительно возрастает и в их составе появляется  $\alpha$ -цепь, ген которой экспрессируется в процессе акти-

вазии. Благодаря таким изменениям лимфоцит приобретает способность пролиферировать в ответ на действие IL-2.

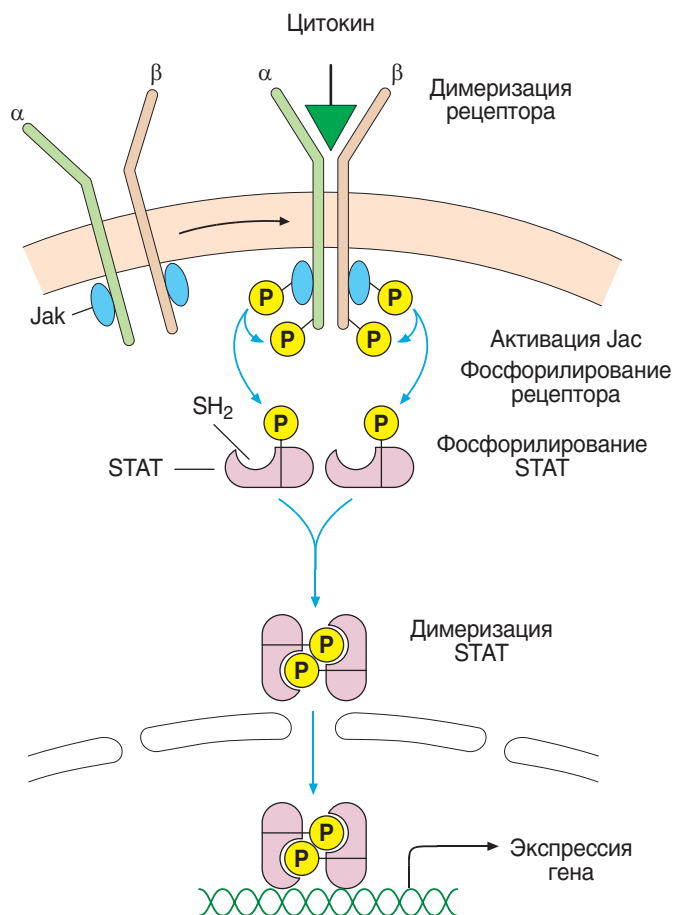
#### 2.5.5.3. Внутриклеточная передача сигнала при действии цитокинов

В состав С-концевой цитоплазматической части некоторых цитокиновых рецепторов (относящихся к суперсемейству иммуноглобулинов) входит домен, обладающий активностью тирозинкиназы. Все эти киназы относятся к разряду протоонкогенов, т.е. при изменении генетического окружения становятся онкогенами, обеспечивая бесконтрольную пролиферацию клетки. Эти киназы имеют собственное название. Так, киназу, входящую в состав рецептора M-CSF, обозначают как c-Fms; киназу SCF — c-Kit; известна киназа гемопоэтического фактора — Flt-3 (*Fms-like tyrosine kinase 3*). Рецепторы, обладающие собственной киназной активностью, запускают передачу сигнала непосредственно, поскольку их киназа обуславливает фосфорилирование как самого рецептора, так и прилежащих к нему молекул.

Передача сигнала через домен TIR, общий для рецептора IL-1 и TLR, рассмотрена выше (см. раздел 2.2.4). Сходный путь передачи сигнала от TNF будет рассмотрен далее. Наиболее типичный вариант проявления активности характерен для рецепторов гемопоэтинового (цитокинового) типа, содержащих 4  $\alpha$ -спиральных домена. К цитоплазматической части таких рецепторов примыкают молекулы тирозинкиназ группы Jak-киназ (*Janus-associated family kinases*). В цитоплазматической части цепей рецепторов есть специальные участки для связывания этих киназ (проксимальный и дистальный боксы). Всего известно 5 Janus-киназ — Jak1, Jak2, Jak3, Tyk1 и Tyk2. Они в различных комбинациях кооперируются с разными цитокиновыми рецепторами, обладая сродством к конкретным полипептидным цепям. Так, киназа Jak3 взаимодействует с  $\gamma$ (с)-цепью; при дефектах гена, кодирующего эту киназу, развивается комплекс нарушений в иммунной системе сходный с наблюдаемым при дефектах гена полипептидной цепи рецептора (см. раздел 4.7.1.5).

При взаимодействии цитокина с рецептором происходит генерация сигнала, приводящего к формированию транскрипционных факторов и активации генов, определяющих реакцию клетки на действие цитокина. Одновременно происходит поглощение клеткой комплекса цитокина с рецептором и расщепление его в эндосомах. Сама по себе интернализация этого комплекса к передаче сигнала отношения не имеет. Она необходима для утилизации цитокина, предотвращающей его накопление в месте активации клеток-продуцентов. Большую роль в регуляции этих процессов играет сродство рецептора к цитокину. Только при достаточно высокой степени сродства (порядка  $10^{-10}$  М) генерируется сигнал и происходит поглощение комплекса цитокина с рецептором.

Индукция сигнала начинается с аутокаталитического фосфорилирования связанных с рецептором Jak-киназ, запускаемого конформационными изменениями рецептора, которые происходят в результате его взаимодействия с цитокином. Активированные Jak-киназы фосфорилируют цитоплазматические факторы STAT (*Signal transducers and activators of transcription*), присутствующие в цитоплазме в неактивной мономерной форме.



**Рис. 2.52.** Принципиальная схема передачи сигнала от цитокинов. Показана ключевая роль тирозинкиназ Jak и транскрипционных факторов STAT в передаче сигнала

Фосфорилированные мономеры приобретают сродство друг к другу и димеризуются. Димеры STAT перемещаются в ядро и выступают в качестве транскрипционных факторов, связываясь с промоторными участками генов-мишеней (рис. 2.52). При действии провоспалительных цитокинов активируются гены молекул адгезии, самих цитокинов, ферментов окислительного метаболизма и др. При действии факторов, вызывающих пролиферацию клеток, происходит индукция генов, ответственных за прохождение клеточного цикла и т.д.

Выделяют 6 разновидностей факторов STAT. В передаче сигналов от разных цитокинов принимают участие разные молекулы STAT. Так, в ответе на цитокины, рецепторы которых содержат  $\gamma(c)$ -цепь, связанную с киназой Jak3, участвуют факторы STAT5a и STAT5b. В передаче сигнала при действии цитокинов семейства IL-6 участвует фактор STAT3, IFN $\gamma$  — STAT1, IL-12 — STAT4, IL-4 — STAT6 и т.д. (табл. 2.30).

**Таблица 2.30.** Участие Jak-киназ и транскрипционных факторов STAT в передаче сигналов от цитокинов

Цитокины	Jak	STAT
IL-2	Jak1, Jak3	STAT1, STAT3, STAT5
IL-4	Jak1, Jak3	STAT6
IL-3, IL-5, GM-CSF	Jak2	STAT5, STAT6
IL-6, LIF, OSM	Jak1, Jak2, TYK2	STAT1, STAT3, STAT5
IL-7	Jak1, Jak3	STAT5
IL-10	Jak1, TYK2	STAT1, STAT3, STAT5
IL-11	Jak1, Jak2	STAT1, STAT3
IL-12	Jak2, TYK2	STAT4
IL-13	Jak1, TYK2	STAT6
IL-15	Jak1, Jak3	STAT3, STAT5
G-CSF	Jak1, Jak2	STAT3
IFN $\alpha$ , IFN $\beta$	Jak1, TYK2	STAT1, STAT2, STAT3, STAT4
IFN- $\gamma$	Jak1, Jak2	STAT1

Jak/STAT-опосредованный путь передачи сигналов от цитокинов — основной, но не единственный. С рецептором связаны не только Jak-киназы, но и киназы семейства Src, а также PI<sub>3</sub>K. Их активация запускает дополнительные сигнальные пути, приводящие к активации AP-1 и других транскрипционных факторов. Активируемые транскрипционные факторы участвуют не только в передаче сигнала от цитокинов, но и в других сигнальных путях.

Существуют сигнальные пути, участвующие в контроле биологических эффектов цитокинов. Такие пути связаны с факторами группы SOCS (*Suppressors of cytokine signaling*), содержащей фактор SIC и 7 факторов SOCS (SOCS-1 — SOCS-7). Включение этих факторов происходит при активации цитокиновых сигнальных путей, что приводит к образованию петли отрицательной обратной связи. Факторы SOCS содержат домен SH2 (см. раздел 3.5.2.1), участвующий в реализации одного из следующих процессов:

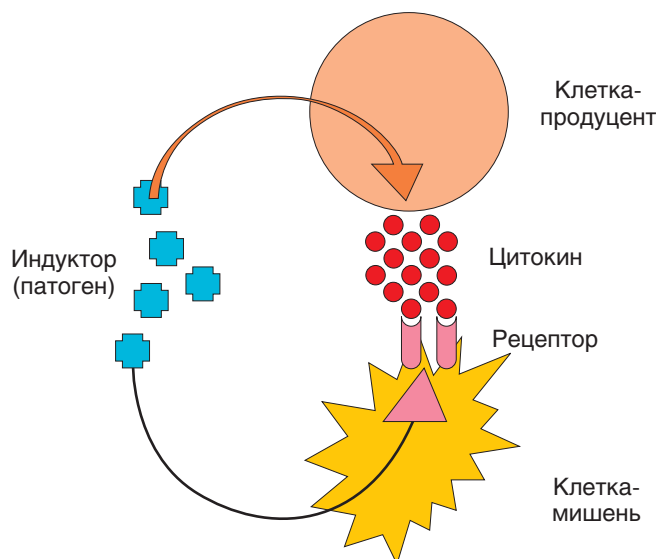
- прямого ингибирования Jak-киназ в результате связывания с ними и индукции их дефосфорилирования;
- конкуренции с факторами STAT за связывание с цитоплазматической частью цитокиновых рецепторов;
- ускорения деградации сигнальных белков по убиквитиновому пути.

Выключение генов SOCS приводит к нарушению баланса цитокинов с преобладанием синтеза IFN $\gamma$  и сопутствующей этому лимфопенией и усилением апоптоза.

#### 2.5.5.4. Особенности функционирования системы цитокинов.

##### Цитокиновая сеть

Из сказанного выше следует, что при активации клеток чужеродными агентами (носителями PAMP при активации миелоидных клеток и антиге-



**Рис. 2.53.** Иллюстрация скоординированной индукции выработки цитокинов и экспрессии их рецепторов под влиянием одного и того же индуктора

нами при активации лимфоцитов) индуцируется (или усиливается до функционально значимого уровня) как синтез цитокинов, так и экспрессия их рецепторов. Это создает условия для **локального проявления** эффектов цитокинов. Действительно, если один и тот же фактор активирует и клетки-продуценты цитокинов, и клетки-мишени, создаются оптимальные условия для локального проявления функций этих факторов (рис. 2.53). Обычно цитокины связываются, подвергаются интернализации и расщеплению клеткой-мишенью, практически не диффундируя от секретируемых клеток-продуцентов. Нередко цитокины бывают трансмембранными молекулами (например, IL-1 $\alpha$  и TNF $\alpha$ ) или представляются клеткам-мишеням в связанном с пептидогликанами межклеточного матрикса состоянии (IL-7 и ряд других цитокинов), что также способствует локальному характеру их действия.

В норме цитокины если и содержатся в сыворотке крови, то в концентрациях, недостаточных для проявления их биологических эффектов. Далее на примере воспаления мы рассмотрим ситуации, в которых цитокины оказывают системное действие (см. раздел 2.5.5.5). Однако эти случаи всегда являются проявлением патологии, иногда очень серьезной. По-видимому, локальный характер действия цитокинов имеет для нормального функционирования организма принципиальное значение. Об этом свидетельствует высокая скорость их выведения через почки. Обычно кривая выведения цитокинов состоит из двух компонент — быстрой и медленной.  $T_{1/2}$  быстрой компоненты для IL-1 $\beta$  составляет 1,9 мин, для IL-2 — 5 мин ( $T_{1/2}$  медленной составляет 30–120 мин). Свойство **близкодействия** отличает цитокины от гормонов — далекодействующих факторов (поэтому утверждение «цитокины — это гормоны иммунной системы» принципиально неверно).

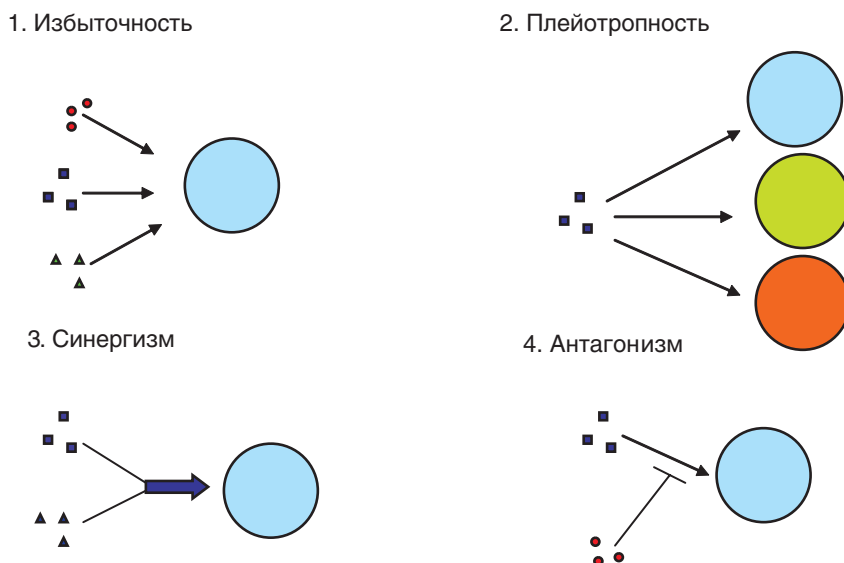


Рис. 2.54. Некоторые особенности взаимодействия компонентов цитокиновой сети

Для системы цитокинов характерна **избыточность** (рис. 2.54). Это означает, что практически любую выполняемую конкретным цитокином функцию дублируют другие цитокины. Именно поэтому выключение отдельного цитокина, например, вследствие мутации его гена, не вызывает фатальных последствий для организма. Действительно, мутация гена конкретного цитокина практически никогда не приводит к развитию иммунодефицита. Например, IL-2 известен как фактор роста Т-клеток; при искусственном удалении (путем генетического нокаута) кодирующего его гена существенного нарушения пролиферации Т-клеток не выявляют, однако регистрируют изменения, обусловленные дефицитом регуляторных Т-клеток (см. раздел 4.7.1.5). Это связано с тем, что пролиферацию Т-клеток в отсутствие IL-2 обеспечивают IL-15, IL-7, IL-4, а также комбинации нескольких цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ ). Точно так же дефект гена **IL4** не приводит к значительным нарушениям в системе В-клеток и переключении изотипов иммуноглобулинов, поскольку сходные эффекты проявляет IL-13. В то же время некоторые цитокины не имеют функциональных аналогов. Наиболее известный пример незаменимого цитокина — IL-7, лимфопоэтическое действие которого, по крайней мере на определенных этапах Т-лимфопоэза уникально, в связи с чем дефекты генов самого IL-7 или его рецептора приводят к развитию тяжелой комбинированной иммунной недостаточности (ТКИН) (см. раздел 4.7.1.5).

Помимо избыточности, в системе цитокинов проявляется и другая закономерность: цитокины плейотропны (действуют на различные мишени) и полифункциональны (вызывают различные эффекты). Так, число клеток-мишеней IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  с трудом поддается учету. Столь же разнообразны вызываемые ими эффекты, участвующие в формировании комплексных

реакций: воспаления, некоторых этапов гемопоэза, нейротропных и других реакций.

Еще одна важная черта, свойственная системе цитокинов, — взаимосвязь и взаимодействие цитокинов. С одной стороны, это взаимодействие заключается в том, что одни цитокины, действуя на фоне индукторов или самостоятельно, вызывают или усиливают (реже подавляют) выработку других цитокинов. Наиболее яркие примеры усиливающего действия — активность провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ , усиливающих собственную выработку и образование других провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, других хемокинов). IL-12 и IL-18 являются индукторами IFN $\gamma$ . TGF $\beta$  и IL-10, наоборот, подавляют выработку различных цитокинов. IL-6 проявляет ингибирующую активность в отношении провоспалительных цитокинов, а IFN $\gamma$  и IL-4 взаимно подавляют выработку друг друга и цитокинов соответствующих (Th1 и Th2) групп. Эти взаимоотношения цитокинов будут подробнее рассмотрены при описании субпопуляций Т-хелперных клеток (см. раздел 3.5.3.1). Взаимодействие между цитокинами проявляется и на функциональном уровне: одни цитокины усиливают или подавляют действие других цитокинов. Описаны синергизм (например, внутри группы провоспалительных цитокинов) и антагонизм цитокинов (например, между Th1- и Th2-цитокинами).

Суммируя полученные данные, можно заключить, что ни один из цитокинов не существует и не проявляет своей активности изолированно — на всех уровнях цитокины испытывают влияние других представителей этого класса молекул. Результат такого многообразного взаимодействия иногда может быть неожиданным. Так, при использовании в лечебных целях высоких доз IL-2 возникают опасные для жизни побочные эффекты, некоторые из которых (например, шок, подобный токсическому, без бактериемии) удается снять антителами, направленными не против IL-2, а против TNF $\alpha$ . Наличие множественных перекрестных взаимодействий в системе цитокинов послужило причиной создания понятия «**цитокиновая сеть**», достаточно четко отражающего суть явления.

Для цитокиновой сети характерны следующие свойства:

- индуцибельность синтеза цитокинов и экспрессии их рецепторов;
- локальность действия, обусловленная скоординированной экспрессией цитокинов и их рецепторов под влиянием одного и того же индуктора;
- избыточность, объясняющаяся перекрыванием спектров действия разных цитокинов;
- взаимосвязи и взаимодействие, проявляющиеся на уровне синтеза и реализации функций цитокинов.

#### 2.5.5.5. Провоспалительные цитокины

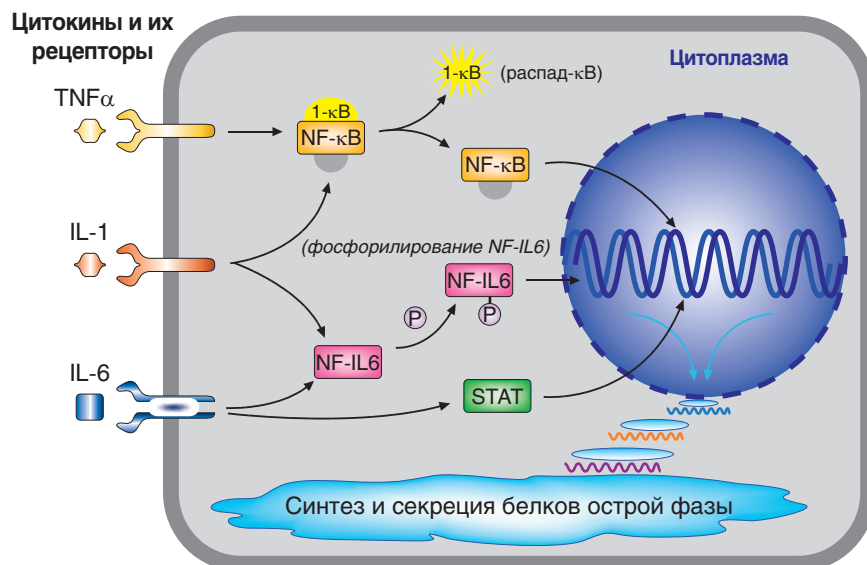
Цитокины — ключевые гуморальные факторы воспаления, необходимые для реализации защитных функций врожденного иммунитета. В развитии воспаления участвуют три группы цитокинов — воспалительные, или провоспалительные цитокины, хемокины, колониестимулирующие факторы, а также функционально связанные факторы IL-12 и IFN $\gamma$ . Цитокинам также принадлежит важная роль в подавлении и сдерживании воспалительной

реакции. К противовоспалительным цитокинам относят трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF $\beta$ ), IL-10; часто роль противовоспалительного фактора играет IL-4.

Выделяют 3 основных представителя группы провоспалительных цитокинов — TNF $\alpha$ , IL-1 и IL-6; относительно недавно к ним были добавлены IL-17 и IL-18. Эти цитокины продуцируются в основном активированными моноцитами и макрофагами преимущественно в очаге воспаления. Провоспалительные цитокины могут вырабатываться также нейтрофилами, дендритными клетками, активированными В-, NK- и Т-лимфоцитами. В очаге проникновения патогенов цитокины первыми начинают синтезировать немногочисленные местные воспалительные макрофаги. Затем в процессе эмиграции лейкоцитов из кровотока численность клеток-продуцентов возрастает и их спектр расширяется. В частности, к синтезу провоспалительных цитокинов подключаются стимулированные продуктами микроорганизмов и факторами воспаления эпителиальные, эндотелиальные, синовиальные, глиальные клетки, фибробласты. Гены цитокинов относят к индуцибельным. Естественные индукторы их экспрессии — патогены и их продукты, действующие через TLR и другие патогенраспознающие рецепторы. Классический индуктор — бактериальный ЛПС. В то же время некоторые провоспалительные цитокины (IL-1, TNF $\alpha$ ) сами способны индуцировать синтез провоспалительных цитокинов.

Провоспалительные цитокины синтезируются и секретируются достаточно быстро, хотя кинетика синтеза различных цитокинов этой группы неодинакова. В типичных случаях (быстрый вариант) экспрессию их мРНК отмечают через 15–30 мин после индукции, появление белкового продукта в цитоплазме — через 30–60 мин, содержание его во внеклеточной среде достигает максимума через 3–4 ч. Синтез цитокинов конкретной клеткой продолжается довольно непродолжительное время — обычно немногим больше суток. Не весь синтезируемый материал секретируется. Некоторое количество цитокинов экспрессируется на поверхности клетки или содержится в цитоплазматических гранулах. Выброс гранул могут вызывать те же активирующие сигналы, что и продукция цитокинов. Это обеспечивает быстрое (в течение 20 мин) поступление цитокинов в очаг поражения.

Провоспалительные цитокины выполняют многие функции. Основная их роль — «организация» воспалительной реакции (рис. 2.55). Один из наиболее важных и ранних эффектов провоспалительных цитокинов — усиление экспрессии молекул адгезии на эндотелиальных клетках, а также на самих лейкоцитах, что приводит к миграции в очаг воспаления лейкоцитов из кровяного русла (см. раздел 2.3.3). Кроме того, цитокины индуцируют усиление кислородного метаболизма клеток, экспрессии ими рецепторов для цитокинов и других факторов воспаления, стимуляцию выработки цитокинов, бактерицидных пептидов и т.д. Провоспалительные цитокины оказывают преимущественно местное действие. Попадание избыточно секретируемых провоспалительных цитокинов в циркуляцию способствует проявлению системных эффектов воспаления, а также стимулирует выработку цитокинов клетками, отдаленными от очага воспаления. На системном уровне провоспалительные цитокины стимулируют продукцию белков острой фазы, вызывают повышение температуры тела, действуют на



**Рис. 2.55.** Внутриклеточная передача сигнала, запускаемая провоспалительными цитокинами и механизмы активации провоспалительных генов

эндокринную и нервную системы, а в высоких дозах приводят к развитию патологических эффектов (плоть до шока, подобного септическому).

**IL-1** — собирательное обозначение семейства белков, включающего более 11 молекул. Функция большинства из них неизвестна, однако 5 молекул — IL-1 $\alpha$  (по современной классификации — IL-1F1), IL-1 $\beta$  (IL-1F2), IL-1RA (IL-1F3), IL-18 (IL-1F4) и IL-33 (IL-1F11) — активные цитокины.

IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$  традиционно называют IL-1, поскольку они взаимодействуют с одним и тем же рецептором и их эффекты неразличимы. Гены этих цитокинов локализованы в длинном плече хромосомы 2 человека. Гомология между ними на нуклеотидном уровне составляет 45%, на аминокислотном — 26%. Обе молекулы имеют  $\beta$ -складчатую структуру: они содержат 6 пар антипараллельных  $\beta$ -слоев и имеют форму трилистника. Клетки синтезируют молекулу-предшественник с молекулярной массой около 30 кДа, лишенную сигнальных пептидов, что свидетельствует о необычном пути процессинга молекулы IL-1. Молекулярная масса зрелых белков — около 18 кДа.

IL-1 $\alpha$  существует в трех формах — внутриклеточной (растворимая молекула присутствует в цитозоле и выполняет регуляторные функции), мембранной (молекула доставляется на поверхность клетки за счет механизма, аналогичного рециклингу рецепторов и заякоривается в мембране) и секретуремой (молекула секретируется в первоначальном виде, но подвергается процессингу — расщеплению внеклеточными протеазами с образованием активного цитокина массой 18 кДа). Основной вариант молекулы IL-1 $\alpha$  у человека — мембранный. В такой форме действие цитокина более выражено, но проявляется только локально.

Процессинг IL-1 $\beta$  происходит внутри клетки с участием специализированного фермента — IL-1-конвертазы (каспазы 1), находящегося в лизосомах.

Активация этого фермента осуществляется в составе инфламмосомы — временной надмолекулярной структуры, включающей, кроме неактивной каспазы 1, внутриклеточные рецепторы семейства NLR (см. раздел 2.2.3) — NOD1, NOD2, IPAF и др. Для активации каспазы 1 необходимо распознавание названными рецепторами PAMP, что вызывает развитие активационного сигнала. В результате происходит образование транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B и индукция провоспалительных генов, а также активация инфламмосомы и содержащейся в ней каспазы 1. Активированный фермент расщепляет молекулу-предшественницу IL-1 $\beta$ , и образовавшийся зрелый цитокин с молекулярной массой 18 кДа секретируется клеткой.

IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , а также рецепторный антагонист IL-1 имеют общие рецепторы, экспрессируемые спонтанно на многих типах клеток. При активации клеток на них возрастает число мембранных рецепторов для IL-1. Основной из них — IL-1RI — во внеклеточной части содержит 3 иммуноглобулиноподобных домена. Его внутриклеточная часть представляет TIR-домен, структурно сходный с аналогичными доменами TLR и запускающий те же сигнальные пути (см. раздел 2.2.1). Число этих рецепторов невелико (200–300 на клетку), но они обладают высоким сродством к IL-1 (Kd равен  $10^{-11}$  М). Другой рецептор — IL-1RII — лишен сигнальной составляющей в цитоплазматической части, не передает сигнал и служит рецептором-ловушкой. В передаче сигнала от IL-1RI принимают участие те же факторы, что и для TLR (например, MyD88, IRAK и TRAF6), что приводит к аналогичным результатам — образованию транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B и AP-1, вызывающих экспрессию одного и того же набора генов (см. рис. 2.12). Эти гены отвечают за синтез провоспалительных цитокинов, хемокинов, молекул адгезии, ферментов, обеспечивающих бактерицидность фагоцитов, и других генов, продукты которых участвуют в развитии воспалительной реакции. К продуктам, секрецию которых индуцируют IL-1, принадлежит и сам IL-1, т.е. в данном случае срабатывает петля положительной обратной связи.

Мишенями IL-1 потенциально могут быть любые клетки организма. В наибольшей степени его действие затрагивает эндотелиальные клетки, все виды лейкоцитов, клетки хрящевой и костной тканей, синовиальные и эпителиальные клетки, многие разновидности нервных клеток. Под влиянием IL-1 происходит индукция экспрессии больше 100 генов; с его участием реализуется больше 50 различных биологических реакций. Основные эффекты IL-1 вызывают эмиграцию лейкоцитов и активацию их фагоцитарной и бактерицидной активности. Они влияют также на свертывающую систему и сосудистый тонус, определяя особенности гемодинамики в очаге воспаления. IL-1 оказывает многоплановое действие на клетки не только врожденного, но и адаптивного иммунитета, обычно стимулируя проявления и того, и другого.

IL-1 обладает множеством системных эффектов. Он стимулирует выработку гепатоцитами белков острой фазы, при действии на центр терморегуляции гипоталамуса вызывает развитие лихорадки, участвует в развитии системных проявлений воспалительного процесса (например, в недомогании, снижении аппетита, сонливости, адинамией), что связано с действием IL-1 на ЦНС. Усиливая экспрессию рецепторов для колониестимулирующих факторов, IL-1 способствует усилению гемопоэза, с чем связано его радио-защитное действие. IL-1 стимулирует выход из костного мозга лейкоцитов,

в первую очередь нейтрофилов, в том числе незрелых, что приводит к появлению при воспалении лейкоцитоза и сдвигу лейкоцитарной формулы влево (накопление незрелых форм клеток). Эффекты IL-1 влияют на вегетативные функции и даже на высшую нервную деятельность (изменение поведенческих реакций и т.д.). Мишенями IL-1 могут быть также хондроциты и остециты, с чем связана способность IL-1 вызывать разрушение хряща и кости при их вовлечении в воспалительный процесс и наоборот, гиперплазия патологических тканей (паннус при ревматоидном артрите). Повреждающее действие IL-1 проявляется и при септическом шоке, повреждении суставов при ревматоидном артрите и ряде других патологических процессов.

Дублирование IL-1 эффектов бактериальных продуктов связано с потребностью в многократном воспроизведении активирующего эффекта патогенов без их диссеминации. Микроорганизмы стимулируют только клетки, находящиеся в непосредственной близости от места проникновения, прежде всего локальные макрофаги. Затем тот же эффект многократно воспроизводится молекулами IL-1 $\beta$ . Выполнение IL-1 указанной функции облегчается экспрессией их рецепторов почти всеми клетками организма при активации (происходит прежде всего в очаге воспаления).

**Рецепторный антагонист IL-1 (IL-1RA)** гомологичен IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$  (гомология составляет соответственно 26% и 19%). Он взаимодействует с рецепторами IL-1, но не способен передавать в клетку сигнал. В результате IL-1RA выступает в роле специфического антагониста IL-1. IL-1RA секретируют те же клетки, что и IL-1, этот процесс не требует участия каспазы 1. Выработку IL-1RA индуцируют те же факторы, что и синтез IL-1, однако некоторое его количество спонтанно продуцируют макрофаги и гепатоциты. В результате этот фактор постоянно присутствует в сыворотке крови. Вероятно, это необходимо для предотвращения негативных последствий системного действия IL-1, вырабатываемого в значительных количествах при остром воспалении. В настоящее время проводят испытания рекомбинантного IL-1RA в качестве лекарственного препарата при лечении хронических воспалительных заболеваний (ревматоидный артрит и т.д.)

**IL-18** — провоспалительный цитокин, родственный IL-1 $\beta$ : он также синтезируется в виде предшественника, конвертируемого с участием каспазы 1; взаимодействует с рецептором, цитоплазматическая часть которого содержит домен TIR и передает сигнал, приводящий к активации NF- $\kappa$ B. В результате происходит активация всех провоспалительных генов, однако она выражена слабее, чем при действии IL-1. Отдельное свойство IL-18 — индукция (особенно в сочетании с IL-12) синтеза клетками IFN $\gamma$ . В отсутствие IL-12 IL-18 индуцирует синтез антагониста IFN $\gamma$  — IL-4 и способствует развитию аллергических реакций. Действие IL-18 ограничивает растворимый антагонист, связывающий его в жидкой фазе.

**IL-33** структурно очень близок IL-18. Процессинг IL-33 тоже происходит с участием каспазы 1. Однако этот цитокин отличается от других представителей семейства IL-1 выполняемыми функциями. Своеобразие действия IL-33 значительной степени обусловлено тем, что его рецептор экспрессируется избирательно на Th2-клетках. В связи с этим IL-33 способствует секреции Th2-цитокинов IL-4, IL-5, IL-13 и развитию аллергических процессов. Он не оказывает существенного провоспалительного действия.

**Фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$  или TNF $\alpha$ )** — представитель другого семейства иммунологически значимых белков. Это провоспалительный цитокин с широким спектром активности. TNF $\alpha$  имеет  $\beta$ -складчатую структуру. Он синтезируется в виде функционально активной мембранной молекулы про-TNF $\alpha$  с молекулярной массой 27 кДа, представляющей трансмембранный белок II типа (т.е. его N-концевая часть направлена внутрь клетки). В результате протеолиза во внеклеточном домене формируется растворимый мономер с молекулярной массой 17 кДа. Момеры TNF $\alpha$  спонтанно формируют тример с молекулярной массой 52 кДа, представляющий основную форму этого цитокина. Тример имеет колоколовидную форму, причем субъединицы соединяются своими C-концами, содержащими по 3 участка связывания с рецептором, тогда как N-концы друг с другом не связаны и не участвуют во взаимодействии с рецепторами (а следовательно, и в выполнении цитокином своих функций). При кислых значениях pH TNF $\alpha$  приобретает  $\alpha$ -спиральную структуру, что обуславливает изменение некоторых его функций, в частности, усиление цитотоксичности. TNF — прототипический член большого семейства молекул суперсемейства TNF (табл. 2.31). К нему относят лимфотоксины  $\alpha$  и  $\beta$  (в растворимой форме существует только первый), а также многие мембранные молекулы, участвующие в межклеточных взаимодействиях (CD154, FasL, BAFF, OX40-L, TRAIL, APRIL, LIGHT), которые будут упоминаться далее в различных контекстах. Согласно современной номенклатуре, название членов суперсемейства состоит из сокращения TNFSF и порядкового номера (для TNF $\alpha$  — TNFSF2, для лимфотоксина  $\alpha$  — TNFSF1).

**Таблица 2.31.** Основные представители семейств фактора некроза опухоли и его рецепторов

Фактор (лиганд)	Хромосома	Молекулярная масса, кДа	Рецептор
TNF $\alpha$ (TNFSF2)	6p	17; тример — 52; гликозилированная форма — 25,6	TNF-R1, TNF-R2 (TNFRSF1, TNFRSF2)
Лимфотоксина $\alpha$ (TNFSF1)	6p	22,3	TNF-R1, TNF-R2
Лимфотоксин $\beta$ (TNFSF3)	6p	25,4	LT $\beta$ -R (TNFRSF3)
OX-40L (TNFSF4)	1q	34,0	OX-40 (TNFRSF4; CD134)
CD40L (TNFSF5; CD154)	Xp	39,0	CD40 (TNFRSF5)
FasL (TNFSF6; CD178)	1q	31,5	Fas/APO-1 (CD95) (TNFRSF6)
CD27L (TNFSF7, CD70)	19p	50,0	CD27 (TNFRSF7)
CD30L (TNFSF8)	9q	40,0	CD30 (TNFRSF8)
4-1BBL (TNFSF9)	19p	27,5	4-1BB (TNFRSF9; CD137)
TRAIL (TNFSF10)	3q	32,0	BK46 BK5
APRIL (TNFSF13)	17p	27,0	BCMA, TACI
LIGHT (TNFSF14)	16q	26,0	HVEM (TNFRSF14)
GITRL (TNFSF18)	1p	22,7	GITR (TNFRSF18)
BAFF (TNFSF20)	13	31,2	BAFFR, TACI, BCMA

Основные продуценты  $\text{TNF}\alpha$ , как и  $\text{IL-1}$ , — моноциты и макрофаги. Его секретируют также нейтрофилы, эндотелиальные и эпителиальные клетки, эозинофилы, тучные клетки, В- и Т-лимфоциты при их вовлечении в воспалительный процесс.  $\text{TNF}\alpha$  выявляют в кровотоке раньше других провоспалительных цитокинов — уже через 20–30 мин после индукции воспаления, что связано со «сбрасыванием» клетками мембранной формы молекулы, а возможно также с выбросом  $\text{TNF}\alpha$  в составе содержимого гранул.

Есть 2 типа рецепторов  $\text{TNF}$ , общие для  $\text{TNF}\alpha$  и лимфотоксина  $\alpha$  —  $\text{TNFRI}$  (от *tumor necrosis factor receptor I*) и  $\text{TNFRII}$  с молекулярной массой соответственно 55 и 75 кДа.  $\text{TNFRI}$  присутствует практически на всех клетках организма, кроме эритроцитов, а  $\text{TNFRII}$  — преимущественно на клетках иммунной системы.  $\text{TNFR}$  образуют большое семейство, в которое входят молекулы, участвующие во взаимодействии клеток и индукции клеточной гибели — апоптоза. Сродство  $\text{TNF}\alpha$  к  $\text{TNFRI}$  ниже, чем к  $\text{TNFRII}$  (соответственно около  $5 \times 10^{-10}$  М и  $55 \times 10^{-11}$  М. При связывании  $\text{TNF}\alpha$ -тримера происходит необходимая для передачи сигнала тримеризация его рецепторов.

Особенности передачи сигнала от этих рецепторов во многом определяются структурой их внутриклеточной части. Цитоплазматическая часть  $\text{TNFRI}$  представлена так называемым доменом смерти, от которого поступают сигналы, приводящие к включению механизма апоптоза;  $\text{TNFRII}$  лишен домена смерти. Передача сигнала от  $\text{TNFRI}$  происходит с участием адапторных белков  $\text{TRADD}$  (*TNFR-associated death domain*) и  $\text{FADD}$  (*Fas-associated death domain*), тоже содержащих домены смерти. Помимо пути, приводящего к развитию апоптоза (через активацию каспазы 8 или синтез церамида), выделяют еще несколько сигнальных путей, включаемых с участием факторов  $\text{TRAF2/5}$  и  $\text{RIP-1}$ . Первый из названных факторов передает сигнал по пути, приводящему к активации фактора  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , т.е. по классическому пути индукции провоспалительных генов (см. рис. 2.55). Сигнальный путь, активируемый фактором  $\text{RIP-1}$ , приводит к активации  $\text{MAP}$ -каскада с конечным продуктом — транскрипционным фактором  $\text{AP-1}$ . Этот фактор включает гены, обеспечивающие активацию клетки и предотвращающие развитие апоптоза. Судьбу клетки, таким образом, определяет баланс про- и антиапоптотических механизмов, запускаемых при связывании  $\text{TNF}\alpha$  с  $\text{TNFRI}$ .

Реализация функций  $\text{TNF}\alpha$  связана преимущественно с действием через  $\text{TNFRI}$  — выключение соответствующего гена приводит к развитию тяжелого иммунодефицита, тогда как последствия инактивации гена  $\text{TNFRII}$  незначительны. На пике воспалительной реакции рецепторы  $\text{ФНО}\alpha$  могут «сбрасываться» с мембраны и выходить в межклеточное пространство, где они связывают  $\text{ФНО}\alpha$ , оказывая противовоспалительное действие. В связи с этим растворимые формы  $\text{TNFR}$  используют при лечении хронических воспалительных заболеваний. При этом оказалось, что препарат на основе растворимого  $\text{TNFRII}$  оказался клинически наиболее эффективным.

Как и  $\text{IL-1}$ ,  $\text{TNF}\alpha$  усиливает экспрессию молекул адгезии, синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов, белков острой фазы, ферментов фагоцитарных клеток и т.д. Наряду с  $\text{IL-1}$ ,  $\text{TNF}\alpha$  участвует в формировании всех основных местных, а также некоторых системных проявлений воспали-

ния. Он активирует эндотелиальные клетки, стимулирует ангиогенез, усиливает миграцию и активирует лейкоциты.  $\text{TNF}\alpha$  в большей степени, чем  $\text{IL-1}$ , влияет на активацию и пролиферацию лимфоцитов. В комбинации с  $\text{IFN}\gamma$   $\text{TNF}\alpha$  индуцирует активность NO-синтазы фагоцитов, что значительно усиливает их бактерицидный потенциал.  $\text{TNF}\alpha$  стимулирует пролиферацию фибробластов, способствуя заживлению ран. При повышенной локальной выработке  $\text{TNF}\alpha$  преобладают процессы повреждения тканей, проявляющиеся развитием геморрагического некроза. Помимо этого  $\text{TNF}\alpha$  подавляет активность липопротеиновой липазы, что ослабляет липогенез и приводит к развитию кахексии (одно из первоначальных названий  $\text{TNF}\alpha$  — кахексин). Повышенное высвобождение  $\text{TNF}\alpha$  и его накопление в циркуляции, например при действии высоких доз бактериальных суперантигенов, вызывает развитие тяжелой патологии — септического шока. Таким образом, действие  $\text{TNF}\alpha$ , направленное на выполнение защитной функции и поддержание гомеостаза, может сопровождаться тяжелыми токсическими эффектами (местными и системными), нередко служащими причиной смерти.

**IL-6** — провоспалительный цитокин широкого действия. Он также служит прототипическим фактором семейства цитокинов, включающего, кроме собственно IL-6, онкостатин М (OSM), лейкемия-ингибирующий фактор (LIF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), кардиотропин-1 (CT-1), а также IL-11 и IL-31. Молекулярная масса IL-6 — 21 кДа. IL-6 вырабатывают моноциты и макрофаги, эндотелиальные, эпителиальные, глиальные, гладкомышечные клетки, фибробласты, Т-лимфоциты типа Th2, а также многие опухолевые клетки. Выработка IL-6 миелоидными клетками индуцируется при взаимодействии их TLR с микроорганизмами и их продуктами, а также под влиянием IL-1 и  $\text{TNF}\alpha$ . При этом в течение 2 ч содержание IL-6 в плазме крови возрастает в 1000 раз.

Рецепторы всех факторов семейства IL-6 содержат общий компонент — цепь gp130, присутствующую практически на всех клетках организма. Второй компонент рецептора индивидуален для каждого цитокина. Специфическая цепь рецептора IL-6 (gp80) отвечает за связывание этого цитокина, тогда как gp130 участвует в передаче сигнала, поскольку связана с тирозинкиназами Jak1 и Jak2. При взаимодействии IL-6 с рецептором запускается следующая последовательность событий: IL-6-мономер взаимодействует с цепью gp80, происходит димеризация комплексов (2 молекулы цитокина — 2 цепи gp80), после чего к комплексу присоединяется 2 цепи gp130, что приводит к фосфорилированию Jak-киназ. Последние фосфорилируют факторы STAT1 и STAT3, которые димеризуются, перемещаются в ядро и связывают промоторы генов-мишеней. Цепь gp80 легко «смывается» с клетки; в свободной форме она взаимодействует с цитокином, инактивируя его, т.е. выступает в качестве специфического ингибитора IL-6.

IL-6 участвует в индукции практически всего комплекса местных проявлений воспаления. Он влияет на миграцию фагоцитов, усиливая выработку СС-хемокинов, привлекающих моноциты и лимфоциты, и ослабляя продукцию СХС-хемокинов, привлекающих нейтрофилы. Провоспалительные эффекты IL-6 выражены слабее, чем у IL-1 и  $\text{TNF}\alpha$ , в противополож-

ность которым он не усиливает, а угнетает выработку провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF $\alpha$  и IL-6) и хемокинов клетками, вовлеченными в воспалительный процесс. Таким образом, IL-6 сочетает свойства про- и противовоспалительных цитокинов и участвует не только в развитии, но и в ограничении воспалительной реакции.

IL-6 — основной фактор, индуцирующий в гепатоцитах экспрессию генов белков острой фазы. IL-6 влияет на различные этапы гемопоэза, в том числе на пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток. Он служит ростовым фактором незрелых плазматических клеток, существенно усиливая гуморальный иммунный ответ. IL-6 влияет также на Т-лимфоциты, повышая активность цитотоксических Т-клеток.

**IL-17 и связанные с ним цитокины.** Группа цитокинов, включающая разновидности IL-17, привлекла всеобщее внимание в связи с открытием особой разновидности Т-хелперов — Th17, участвующей в развитии некоторых повреждающих форм воспалительных реакций, в частности, при аутоиммунных процессах (см. раздел 3.4.3.2). Роль этих цитокинов в реакциях адаптивного иммунного ответа будет рассмотрена далее. Здесь приведем только общую характеристику цитокинов и кратко рассмотрим их роль в реакциях врожденного иммунитета.

Семейство IL-17 включает 6 белков, обозначаемых буквами от А до F. Свойствами провоспалительных цитокинов из них обладают IL-17A и IL-17F. Они представляют собой гомодимеры, скрепленные дисульфидной связью; их молекулярная масса — 17,5 кДа. Эти цитокины продуцируются упомянутыми Th17, а также CD8<sup>+</sup> Т-клетками, эозинофилами, нейтрофилами. IL-23 стимулирует развитие Th17-клеток и выработку IL-17.

Рецепторы для IL-17 экспрессируются многими клетками — эпителиальными, фибробластами, клетками иммунной системы, в частности, нейтрофилами. Основным результатом взаимодействия IL-17 с рецептором состоит, как и при действии других провоспалительных цитокинов, в индукции фактора NF- $\kappa$ B и экспрессии многочисленных NF- $\kappa$ B-зависимых генов воспаления.

Один из важных биологических эффектов IL-17 (наряду с IL-23) — поддержание гомеостаза нейтрофилов. Эти цитокины усиливают образование нейтрофилов, стимулируя выработку G-CSF. При этом усиление или ослабление выработки IL-17 и IL-23 регулируется численностью нейтрофилов в периферических тканях: снижение числа этих клеток в результате апоптоза приводит к усилению выработки цитокинов.

Провоспалительное действие IL-17 реализуется главным образом через усиление выработки других цитокинов (IL-8, IL-6,  $\gamma$ -CSF, ряд хемокинов) и экспрессии молекул адгезии. У мышей, трансгенных по IL-17 или по IL-23, развивается системное хроническое воспаление, имеющее интерстициальный характер, с инфильтрацией нейтрофилами, эозинофилами, макрофагами и лимфоцитами различных органов. За этими цитокинами признают ведущую роль в развитии хронических аутоиммунных заболеваний.

### ***Семейство IL-12***

IL-12 был идентифицирован по способности активировать NK-клетки, вызывать пролиферацию Т-лимфоцитов и индуцировать синтез IFN $\gamma$ . IL-12

занимает особое место в ряду цитокинов, вырабатываемых клетками системы врожденного иммунитета, поскольку он (как и его главные продуценты — дендритные клетки) служит связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом. С другой стороны, IL-12 входит в tandem IL-12–IFN $\gamma$ , которому принадлежит ключевая роль в осуществлении иммунной защиты от внутриклеточных патогенов.

IL-12 представляет димер, состоящий из субъединиц p40 и p35. Его суммарная молекулярная масса — 75 кДа. Функциональная активность IL-12 связана с его субъединицей p40. «Полномасштабный» IL-12 секретируют активированные моноциты, макрофаги, миелоидные дендритные клетки, нейтрофилы, эпителиальные клетки барьерных тканей (они продуцируют и IL-12p35 и IL-12p40 субъединицы цитокина). Большинство же клеток организма синтезирует только функционально неактивную субъединицу IL-12p35. Количество гетеродимера IL-12, секретируемого клеткой, ограничено субъединицей p35. IL-12p40 синтезируется в избытке и может димеризоваться с образованием гомодимера, выступающего в качестве антагониста IL-12, а также хемоаттрактанта. Индукторы выработки IL-12 — прежде всего патогены, распознаваемые TLR и другими паттернраспознающими рецепторами. Выработку IL-12 усиливают IL-1, IFN $\gamma$ , а также межклеточные взаимодействия, опосредованные CD40–CD154 и другими парами молекул семейств — TNFR.

Рецептор IL-12 сильнее всего экспрессирован на NK-клетках, активированных Th1-клетках и цитотоксических Т-лимфоцитах и в меньшей степени — на дендритных клетках. Экспрессия рецептора IL-12 активированными Т-клетками усиливается под влиянием IL-12, IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$  и при костимуляции через рецептор CD28. Рецептор для IL-12 представляет димер, образованный субъединицами IL-12R $\beta$ 1 (100 кДа), и IL-12R $\beta$ 2 (130 кДа, CD212), с которым ассоциирован белок с молекулярной массой 85 кДа. В связывании IL-12 участвуют и  $\beta$ <sub>1</sub> и  $\beta$ <sub>2</sub> цепи, тогда как в передаче сигнала задействована преимущественно субъединица IL-12R $\beta$ 2. Внутриклеточный домен  $\beta$ <sub>1</sub>-цепи ассоциирован с киназой JAK2, внутриклеточный домен  $\beta$ <sub>2</sub>-цепи — с киназой Tyk2. Киназы фосфорилируют транскрипционные факторы STAT1, STAT3, STAT4 и STAT5.

Главная функция IL-12, обусловленная его способностью стимулировать цитотоксические лимфоциты (NK и Т) и индуцировать дифференцировку Th1-клеток (см. раздел 3.4.3.1), — запуск клеточных механизмов защиты от внутриклеточных патогенов. IL-12 действует на NK- и NKT-клетки уже на ранних стадиях иммунных процессов, усиливая пролиферацию и цитотоксическую активность NK-клеток, а позже — цитотоксических Т-лимфоцитов и синтез всеми этими клетками IFN $\gamma$ . Несколько позже IL-12 индуцирует дифференцировку Th1-клеток, тоже продуцирующих IFN $\gamma$ . Условие индукции Th1-клеток — предварительная экспрессия активированными CD4<sup>+</sup> Т-клетками субъединицы рецептора IL-12R $\beta$ 2. После этого клетки приобретают способность связывать IL-12, что приводит к активации фактора STAT4, регулирующего экспрессию генов, характерных для Th1-клеток (для экспрессии гена *IFNG* более важно действие транскрипционного фактора T-bet). Одновременно IL-12 подавляет дифференцировку Th2-клеток и ослабляет выработку клетками

В-ряда антител классов IgE и IgA. Действуя на дендритные и другие АПК IL-12 индуцирует экспрессию костимулирующих молекул (CD80/86, и др.), а также продуктов МНС-II АПК. Таким образом, IL-12 играет связующую роль между врожденным и адаптивным иммунитетом и усиливает иммунные механизмы, ответственные за защиту от внутриклеточных патогенов и опухолей.

К семейству IL-12 относят IL-23, IL-27 и IL-35. Эти цитокины представляют гетеродимеры: **IL-23** образован двумя субъединицами — IL-23p19 и IL-12p40 (идентична соответствующей субъединице IL-12), **IL-27** — субъединицами Ebi3 и IL-27p28, **IL-35** — субъединицами Ebi3 и IL-12p35. Эти цитокины продуцируются преимущественно дендритными клетками. Выработку цитокинов семейства IL-12 запускают представленные на патогенах PAMP и цитокины, в особенности GM-CSF.

Рецепция IL-23 осуществляется двумя разными структурами: субъединицу IL-12p40 распознает  $\beta_1$ -цепь рецептора для IL-12, а субъединицу IL-23p19 — особый рецептор — IL-23R. Основную роль в передаче сигнала от IL-23 играет STAT4. Рецептор для IL-27 активирует молекулы WSX-1 (гомолог  $\beta_2$ -субъединицы IL-12R) и gp130 (полипептидная цепь, входящая в состав рецепторов для цитокинов семейства IL-6).

Подобно IL-12, IL-23 и IL-27 действуют преимущественно на CD4<sup>+</sup> Т-клетки, способствуя их дифференцировке по Th1-пути. Особенности IL-23 — преимущественное действие на Т-клетки памяти, а также способность поддерживать развитие Т-хелперов типа Th17. IL-27 отличается от двух других цитокинов семейства способностью вызывать пролиферацию не только активированных, но и покоящихся CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Недавно было показано, что IL-27 и IL-35 могут выступать в качестве регуляторных (супрессорных) факторов, поскольку их субъединица Ebi3 — мишень ключевого фактора регуляторных Т-клеток FOXP3.

**Колонистимулирующие факторы (CSF)** (табл. 2.32) или гемопоэтины представлены тремя цитокинами — **GM-CSF**, **G-CSF** и **M-CSF**. К ним функционально близок **IL-3** (Multi-CSF). Эти факторы называют колонистимулирующими, поскольку впервые были идентифицированы по способности поддерживать рост *in vitro* колоний гемопоэтических клеток соответствующего состава. IL-3 обладает наиболее широким спектром действия, поскольку поддерживает рост любых колоний гемопоэтических клеток, кроме лимфоидных. GM-CSF поддерживает рост как смешанных гранулоцитарно-моноцитарных колоний, так и отдельно колоний гранулоцитов и моноцитов/макрофагов. G-CSF и M-CSF специализируются на поддержании роста и дифференцировки соответствующих колоний. Эти факторы не только обеспечивают выживаемость и пролиферацию кроветворных клеток указанных типов, но и способны активировать уже зрелые дифференцированные клетки (M-CSF — макрофаги, G-CSF — нейтрофилы). M-CSF участвует в дифференцировке моноцитов в макрофаги и подавляет дифференцировку моноцитов в дендритные клетки. G-CSF, помимо действия на гранулоцитарный ветвь гемопоэза, вызывает мобилизацию кроветворных стволовых клеток из костного мозга в кровотоки.

Таблица 2.32. Характеристика колониестимулирующих факторов

Название	Хромосома	Молекулярная масса, кДа	Клетки-продуценты	Клетки-мишени	Рецепторы
GM-CSF	5q	22	Макрофаги, Т-клетки, НК-клетки, стромальные клетки, эпителиальные клетки	Макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, Т-клетки, дендритные клетки, гемопоэтические клетки	GM-CSFR $\alpha/\beta$
G-CSF	17q	18-22	Макрофаги, стромальные клетки, эпителиальные клетки	Нейтрофилы, эозинофилы, Т-клетки, гемопоэтические клетки	G-CSFR (1 цепь)
M-CSF	5q	45/70 (димер)	Макрофаги, стромальные клетки, эпителиальные клетки	Макрофаги, гемопоэтические клетки	c-Fms
Фактор стволовых клеток	12q	32	Стромальные клетки	Гемопоэтические клетки, В-клетки, тучные клетки	c-Kit
Flt-3-лиганд	19q	26,4	Стромальные клетки	Гемопоэтические клетки, тучные клетки	Flt-3

G-CSF, GM-CSF и IL-3 структурно характеризуются как гемопоэтины, содержащие 4  $\alpha$ -спиральных домена. Их рецепторы содержат по 2 полипептидные цепи, их относят к семейству гемопоэтиновых рецепторов. M-CSF отличается от остальных CSF. Он представляет собой димерную молекулу и существует как в растворимой, так и в мембраносвязанной формах. Его рецептор имеет внеклеточные Ig-подобные домены и внутриклеточный домен, обладающий активностью тирозинкиназы (наименование этой киназы-протоонкогена — c-Fms — иногда переносят на весь рецептор). При связывании M-CSF с рецепторами происходит их димеризация и активация киназы.

Колониестимулирующие факторы продуцируются эндотелиальными клетками и фибробластами а также моноцитами/макрофагами. GM-CSF и IL-3, кроме того, синтезируются Т-лимфоцитами. Под влиянием бактериальных продуктов (через паттернраспознающие рецепторы) и провоспалительных цитокинов синтез и секреция колониестимулирующих факторов значительно возрастает, что приводит к усилению миелопоэза. Особенно сильно стимулируется гранулоцитопоэз, что сопровождается ускоренной эмиграцией клеток, в том числе незрелых, на периферию. Это создает картину нейтрофильного лейкоцитоза со сдвигом формулы вправо, весьма характерным для воспаления. Препараты на основе GM- и G-CSF применяют в клинической практике для стимуляции гранулоцитопоэза, ослабленного цитотоксическими воздействиями (облучение, прием химио-

препаратов при лечении опухолевых заболеваний и т.д.). G-CSF применяют для мобилизации стволовых кроветворных клеток с последующим использованием индуцированной лейкомаcсы для восстановления нарушенного гемопоэза.

**Фактор стволовых клеток (SCF** — *stem cell factor, c-kit ligand*) секретируют клетки стромы костного мозга (фибробласты, эндотелиальные клетки), а также разные типы клеток в период эмбрионального развития. SCF существует в виде трансмембранной и растворимой молекул (последняя образуется в результате протеолитического отщепления внеклеточной части). SCF выявляют в плазме крови. Его молекула имеет две дисульфидные связи. Рецептор SCF — c-Kit — обладает тирозинкиназной активностью и по своей структуре близок к Flt-3 и c-Fms (рецептор M-CSF). При связывании SCF происходят димеризация рецепторов и их фосфорилирование. Передача сигнала происходит с участием PI<sub>3</sub>K и MAP-каскада.

Мутации гена SCF и его рецептора описаны давно (мутации *steel*); у мышей они проявляются изменением окраски шерсти и нарушением гемопоэза. Мутации, нарушающие синтез мембранной формы фактора, вызывают грубые дефекты развития эмбриона. Совместно с другими факторами SCF участвует в поддержании жизнеспособности стволовых кроветворных клеток, обеспечивает их пролиферацию, поддерживает ранние этапы гемопоэза. SCF особенно важен для эритропоэза и развития тучных клеток, а также служит ростовым фактором для тимоцитов на стадиях DN1 и DN2.

По структуре и биологической активности сходными с SCF свойствами обладает фактор **Flt-3L** (*Fms-like tyrosinkinase 3-ligand*), в сочетании с другими факторами поддерживающий ранние этапы миелопоэза и развитие В-лимфоцитов. SCF играет роль фактора роста лейкозных миелобластов.

**Хемокины**, представляющие важный гуморальный фактор воспаления и врожденного иммунитета, рассмотрены выше при описании хемотаксиса лейкоцитов (см. раздел 2.3.2).

### 2.5.6. Интерфероны

Интерфероны образуют автономную группу цитокинов. Общее свойство интерферонов — наличие у них противовирусной активности. В то же время, подобно другим цитокинам, они участвуют в регуляции иммунных процессов. Сочетание этих свойств делает интерфероны важными факторами врожденного (а в случае IFN $\gamma$  еще и адаптивного) иммунитета и служит основанием для широкого применения интерферонов в качестве лечебных препаратов.

Интерфероны были открыты в 1957 г. А. Исааксом (*A. Isaacs*) и Дж. Линдемманом (*J. Lindemann*) как гуморальные факторы, опосредующие интерференцию вирусов — индуцируемую вирусами неспецифическую резистентность, распространяющуюся не только на вирус-индуктор, но и на другие вирусы. В 70-е годы были описаны варианты интерферонов — типы I и II, продуцируемые разными клетками под влиянием различных стимулов. Тогда же были обнаружены регуляторные функции интерферонов, что послужило основанием для причисления этой группы факторов к цитокинам. Клонирование генов интерферонов и получение рекомбинантных продуктов дало начало биотехнологическому производству этих молекул

и значительно расширило возможности их использования в клинической практике. Интерфероны оказались первыми описанными цитокинами и первыми цитокинами, применяемыми в практике.

В настоящее время выделяют 12 (у человека — 9) видов интерферонов, обозначаемых греческими буквами (табл. 2.33). По способности взаимодействовать с 3 типами рецепторов их объединяют в 3 семейства. Больше всего видов принадлежит к интерферонам I типа:  $IFN\alpha$ ,  $IFN\beta$ ,  $IFN\delta$ ,  $IFN\epsilon$ ,  $IFN\kappa$ ,  $IFN\tau$ ,  $IFN\omega$ , а также лимитин (у человека  $IFN\delta$ ,  $IFN\tau$  и лимитин не обнаружены). Тип II, ранее обозначавшийся как иммунный интерферон, включает единственный член —  $IFN\gamma$ . Описанный недавно тип III содержит 3 представителя —  $\lambda 1$ ,  $\lambda 2$  и  $\lambda 3$ , называемые также IL-29, IL-28A и IL-28B соответственно.  $IFN\alpha$  имеет 13 разновидностей, обозначаемых цифрами (1, 2, 4–8, 10, 13, 14, 16, 17, 21) или латинскими буквами. Каждый вид и разновидность интерферонов кодируются отдельным геном. Некоторые гены существуют в нескольких аллельных вариантах, которым соответствуют изоформы  $IFN\alpha$  (например,  $\alpha 2a$ ,  $\alpha 2b$ ,  $\alpha 2c$ ). Таким образом, в настоящее время всего выделяют 49 вариантов молекул интерферонов. Интерфероны типов I и III различаются по локализации генов (у человека — соответственно в хромосомах 9p и 19q), наличию интронов в генах интерферонов III, но не I типа и, что особенно существенно, по действию на разные рецепторы.  $IFN$  II типа ( $IFN\gamma$ ) отличается от других интерферонов по всем показателям; спектр его биологической активности коренным образом отличается от таковой интерферонов I и III типов.

Таблица 2.33. Характеристика интерферонов

Название	Хромосома	Молекулярная масса, кДа	Клетки-продуценты	Клетки-мишени	Рецепторы
<b>Тип I</b>					
$IFN\alpha$ (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 17, 21)	9p (23 гена)	19–26	Плазмцитоподобные дендритные клетки, макрофаги, стромальные клетки	Макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, эозинофилы, Т-клетки, В-клетки, НК-клетки, фибробласты, инфицированные клетки	$IFNAR$ ( $\beta_1/\beta_2$ )
$IFN\beta$	9p	20	Плазмцитоподобные дендритные клетки, фибробласты, макрофаги, стромальные клетки, эпителиальные клетки	Макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, Т-клетки, В-клетки, НК-клетки, фибробласты	
$IFN\epsilon$	9p	24,4	Клетки плаценты		
$IFN\kappa$	9p	25,2	Кератиноциты		
$IFN\omega$	9p	22,3	Плазмцитоподобные дендритные клетки, макрофаги		

Окончание табл. 2.33

Наз-вание	Хро-мо-сома	Молеку-лярная масса, кДа	Клетки-продуценты	Клетки-мишени	Рецеп-торы
<b>Тип II</b>					
IFN $\gamma$	12q	20–23	Th1-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты, $\gamma\delta$ T-клетки, NK-клетки, NKT-клетки	Макрофаги, нейтрофилы, В-клетки, эндотелиальные клетки, Th2-клетки	IFNGR1/IFNGR2
<b>Тип III</b>					
IFN $\lambda$ 1 (IL-28A)	19q	22,3	Плазмациитоидные дендритные клетки, макрофаги	Макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, Т-клетки, В-клетки, NK-клетки, фибробласты	IFN $\alpha$ -R (IL-28R1/IL-10R2)
IFN $\lambda$ 2 (IL-28B)	19q	22,2			
IFN $\lambda$ 3 (IL-29)	19q	21,9			

В таблицу не включены IFN $\delta$ , IFN $\tau$  и лимитин, отсутствующие у человека.

### 2.5.6.1. Интерфероны типов I и III

Интерфероны I типа — мономерные молекулы массой 19–26 кДа. В структуре интерферонов, как и интерлейкинов, преобладают  $\alpha$ -спирализованные участки (в интерферонах I типа — 5  $\alpha$ -спиралей). Структура IFN $\alpha$  скреплена двумя, а IFN $\beta$  — одной дисульфидной связью. Несмотря на наличие сайтов гликозилирования, молекулы интерферонов I типа обычно не гликозилированы. Гомология внутри группы интерферонов I типа составляет 40–60%, а между интерферонами I и III типов — 15–20%. Интерфероны III типа имеют структурное сходство как с интерферонами I типа, так и с IL-10.

Ранее считали, что IFN $\alpha$  — продукт моноцитов/макрофагов, IFN $\beta$  — фибробластов, а IFN $\gamma$  — Т-клеток. В настоящее время показано, что спектры клеток, продуцирующих интерфероны, значительно шире и для разных интерферонов они сильно перекрываются. Основным источником интерферонов I типа — плазмациитоидные предшественники дендритных клеток — естественные интерферон-продуцирующие клетки (IPC — *interferon-producing cells*) (рис. 2.56). Как упоминалось выше (см. раздел 2.1.6), они циркулируют в кровотоке, составляя 0,2–0,8% от числа мононуклеаров крови. Другой важный источник IFN $\alpha$  — моноциты/макрофаги. Кроме того, IFN $\alpha$  секретируют эпителиальные клетки, фибробласты, а при вирусной инфекции — все инфицированные ядросодержащие клетки. Фибробласты и эпителиальные клетки — основные продуценты IFN $\beta$ . Его вырабатывают также моноциты и макрофаги. Интерфероны III типа продуцируются, по-видимому, всеми перечисленными типами клеток. Высокую способность к выработке IFN $\lambda$  имеют активированные эпителиальные клетки слизистых оболочек.

Поскольку гены интерферонов относят к индуцибельным, для запуска синтеза и секреции этих факторов требуется активация клеток. Индукторы

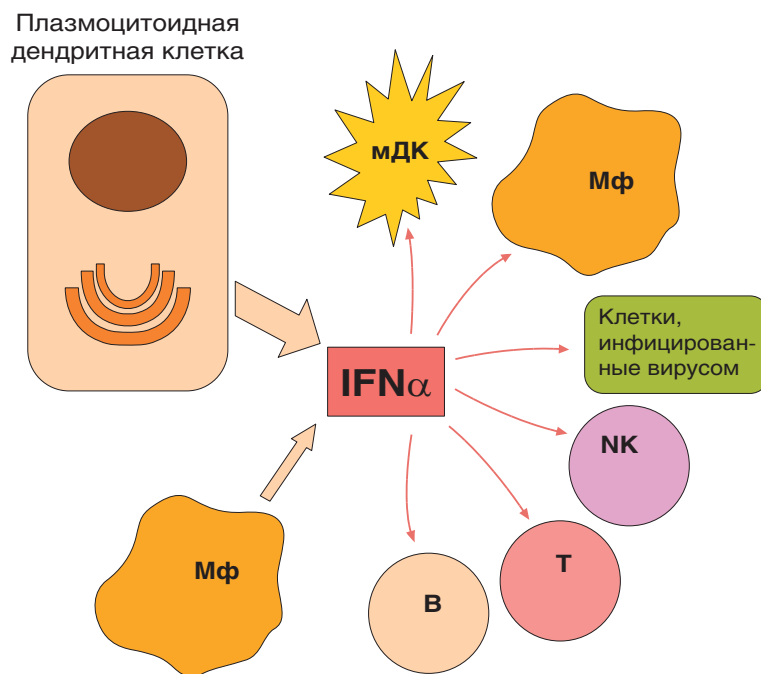


Рис. 2.56. Основные клетки-продуценты и клетки-мишени интерферона  $\alpha$

интерферонов разных типов — прежде всего физиологические активаторы клеток-продуцентов, т.е. молекулы, связывающиеся с мембранными рецепторами макрофагов, фибробластов и других клеток, что в норме вызывает активацию клеток. Например, в макрофагах и фибробластах в индукции синтеза интерферонов главную роль играет связывание TLR со своими лигандами.

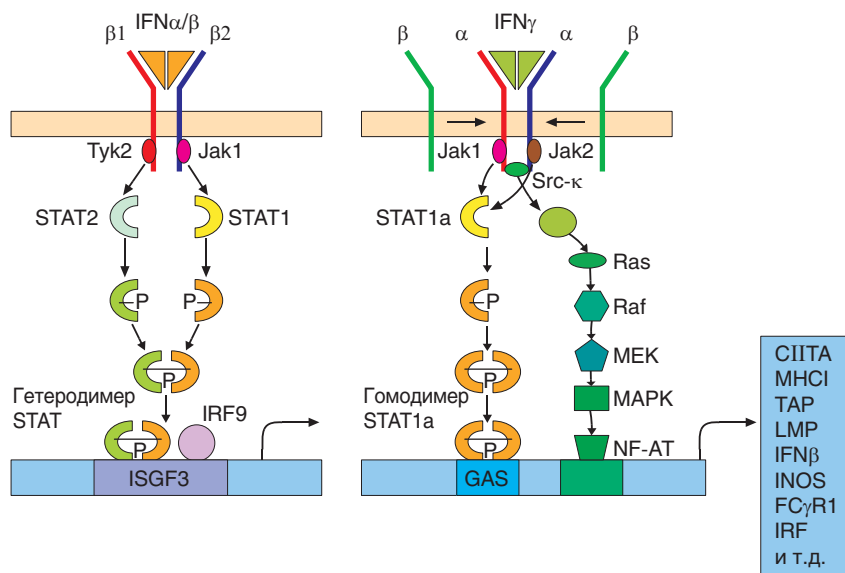
Основные индукторы интерферонов I типа — двуспиральная и односпиральная РНК вирусов, действующие соответственно через TLR-3 и комбинацию TLR-7/TLR-8, а также бактериальная ДНК, содержащая неметилированные мотивы CpG, служащая лигандом для TLR-9. Индукторами интерферонов I типа могут быть также некоторые бактериальные молекулы, в частности ЛПС, рецептором для которого служит комплекс TLR-4/CD14. Синтетические индукторы интерферонов действуют также преимущественно через TLR. В индукции генов интерферонов I типа принимают участие как MyD88-, так и TRIP-зависимые сигнальные пути (см. раздел 2.2.1). Ключевая роль при этом принадлежит интерфероновым регуляторным факторам (IRF — *interferon-regulatory factor*), особенно IRF3 (для IFN $\beta$ ) и IRF7 (для IFN $\alpha$ ). Показана роль сигналов, поступающих в клетки через TLR-3, TLR-7, TLR-8 и TLR-9, в экспрессии генов интерферонов III типа. Интерфероны этой группы (в отличие от интерферонов I типа) могут быть индуцированы действием IFN $\alpha$  и IFN $\beta$ .

Кинетику образования интерферонов разных типов определяют временные параметры активации клеток продуцентов. Индукция генов IFN $\alpha$

и  $\text{IFN}\beta$  при активации макрофагов и особенно фибробластов происходит достаточно быстро, однако медленнее индукции классических провоспалительных цитокинов (пик выработки интерферонов I класса регистрируют через 6–12 ч).

Интерфероны I и III семейств имеют общие для каждого типа рецепторы. Рецептор для интерферонов I типа (IFNAR) содержит 2 молекулы (IFNAR1 и IFNAR2, или  $\beta_1$  и  $\beta_2$ ), действующие согласованно. Молекула интерферона I типа связывается одновременно с 2 молекулами, встраиваясь между ними (рис. 2.57). IFNAR1 содержит 4, а IFNAR2 — 2 внеклеточных домена. Механизм, в соответствии с которым связывание интерферонов I типа (в частности,  $\alpha$  и  $\beta$ ) с одним и тем же рецептором приводит к разным последствиям, до конца не выяснен. Полагают, что это обусловлено различным средством к рецептору, а также особенностями внутриклеточной передачи сигнала, которые, в свою очередь, определяются типом реагирующих клеток. Рецепторы интерферонов III типа представлены 2 молекулами — IFNAR1 и IL10R2 (содержит цепь, общую с рецептором для IL-10). Рецепторы для интерферонов I типа экспрессирует большинство клеток организма, включая лейкоциты, эпителиальные и эндотелиальные клетки, фибробласты.

Перекрестное связывание рецепторов молекулой интерферона вызывает их олигомеризацию, что приводит к передаче в клетку сигнала. Как и в случае интерлейкинов, основные факторы внутриклеточной передачи сигнала от рецепторов интерферонов — непосредственно связанные с рецептором тирозинкиназы семейства Jak и транскрипционные факторы STAT. В передаче сигнала от интерферонов I и III типов участвуют киназы Jak1 и Tyk2 (они связаны соответственно с  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -цепями рецептора).



**Рис. 2.57.** Структура рецепторов интерферонов I и II типов и их взаимодействие с лигандами

Активация этих киназ приводит к фосфорилированию факторов STAT1 и STAT2 соответственно, а также STAT3. Фосфорилирование необходимо для гомо- и гетеродимеризации молекул STAT и их последующей миграции в ядро, где молекулы STAT связываются с ДНК промоторных участков генов-мишеней и индуцируют экспрессию этих генов. Передача сигнала от рецепторов интерферонов типа III сходна с таковой для рецепторов интерферонов типа I.

Важную роль в регуляции индукции генов интерферонов, и генов-мишеней интерферонов (при ответе клеток на действие интерферона) играют транскрипционные факторы, называемые интерфероновыми регуляторными факторами. Для структуры этих факторов характерно образование «спираль–изгиб–спираль». Интерфероновые регуляторные факторы, действуя на промоторы различных генов, участвуют в передаче сигнала от TLR и некоторых цитокинов (табл. 2.34). Доказано, что 3 фактора этой группы (IRF3, IRF5 и IRF7) непосредственно участвуют в индукции генов интерферонов типа I при активации клеток через TLR. Комплекс IRF-3 с гетеродимером STAT1/STAT2 взаимодействует с участком ISRE (*IFN-stimulated regulatory element*), связывание которого необходимо для экспрессии большинства интерферонзависимых генов. Соотношение IRF3 и IRF7 при этом влияет на соотношение экспрессии IFN $\alpha$  и IFN $\beta$ . О выраженной полифункциональности этих факторов свидетельствуют разнообразные последствия «выключения» их генов, приводящие к нарушению дифференцировки и гомеостаза лимфоцитов, возникновению проявлений врожденного иммунитета (воспаления), ослаблению адаптивного иммунного ответа.

**Таблица 2.34.** Транскрипционные факторы семейства интерфероновых регуляторных факторов (IRF)

Фактор	Индукцирующие факторы, рецепторы	Мишени (гены)	Последствия нокаута генов
IRF1	Интерфероны типов I и II	Гены интерферонов типа I	Дефект образования iNOS и IL-12. Снижение содержания $\gamma\delta$ -, CD8 $^{+}$ $\alpha\beta$ Т-клеток, нарушение Th1-ответа. Устойчивость к аутоиммунитету
IRF2	Интерфероны типов I и II	Гены интерферонов типа I, антагонист IRF-1	Нарушение развития NK- и Т-клеток, повышение уровня интерферонов типа I, воспалительное поражение кожи
IRF3	TLR, вирусы	Интерфероны типа I	Нарушена индукция IFN $\beta$ , резистентность к шоку, индуцированному липополисахаридом
IRF4	Т-клеточный рецептор, В-клеточный рецептор, TLR, цитокины	Гены L-цепи иммуноглобулинов, CD20, CD23, IL-4, ISRE	Лимфопролиферация, аномалии гомеостаза Т- и В-клеток, снижение уровня иммуноглобулинов, ослабление гуморального ответа

Окончание табл. 2.33

Фактор	Индукцирующие факторы, рецепторы	Мишени (гены)	Последствия нокаута генов
IRF5	IFN $\alpha$ , вирусы, p53	Гены интерферонов типа I, хемокинов, факторов, контролирующих клеточный цикл и апоптоз	Ослаблены воспалительная реакция и противовирусная защита
IRF6	Нет данных	Нет данных	Нет данных
IRF7	IFN $\alpha$ , TLR-, УФ, EBV	Гены интерферонов типов I и II	Понижена экспрессия генов <i>IFNA</i> и <i>IFNB</i> ; ослаблена защита от вирусной инфекции
IRF8	IFN $\gamma$	ISRE	Отсутствие плазматоидных дендритных клеток, снижение содержания CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоцитов, ослабление ответа на TLR-3, TLR-9
IRF9	Интерфероны типов I и II	STAT2, STAT2	Нарушена передача сигнала через рецепторы интерферонов

Наиболее важное свойство интерферонов — их способность оказывать прямое противовирусное действие (табл. 2.35, рис. 2.58). Противовирусная активность наиболее высока у интерферонов типа I ( $\alpha$ ,  $\omega$ ,  $\beta$ ); она сильно выражена, хотя и развивается несколько медленнее у интерферонов типа III. У IFN $\gamma$  этот тип активности выражен значительно слабее. Для реализации противовирусного действия интерферонов необходима экспрессия ряда генов. Один из эффектов интерферонов типов I и III состоит в индукции экспрессии гена протеинкиназы R — серинтреониновой киназы, контролирующей процессы транскрипции и трансляции. Синтезируемый профермент активируется при взаимодействии с двуспиральной РНК вирусов и фосфорилирует фактор eIF2 $\alpha$  (*Eukariotic initiation factor 2 $\alpha$* ). Это приводит к формированию комплекса eIF2 $\alpha$ –GDP–eIF1 $\beta$ , ингибирующего транскрипцию РНК в инфицированной вирусом клетке.

Другой механизм противовирусного действия интерферонов связан с экспрессией генов, кодирующих 2'5'-олигонуклеотидсинтетазу, — мультиферментную систему, катализирующую синтез 2'5'-олигоаденилатов. При связывании 2'5'-олигоаденилатов с неактивной РНКазой L происходит димеризация этого фермента, сопровождающаяся его активацией. Активная РНКазы L обладает эндонуклеазной активностью: она расщепляет одноцепочечную вирусную РНК. Третий путь реализации противовирусного действия интерферонов связан с индукцией белков МхА. Эти белки семейства динаминов обладают активностью ГТФазы. МхА способен к самосборке в олигомерные комплексы, ингибирующие транскрипцию вирусных белков и другие этапы жизненного цикла вирусов. Вирусы обладают рядом механизмов, блокирующих или подавляющих активность интерферонов.

Таблица 2.35. Биологические эффекты интерферонов типа I

Влияние на иммунную защиту	Механизмы	Практическое применение
Прямое противовирусное действие	Индукция 2'5'-олигоаденилатсинтетазы, приводящая к деградации вирусной РНК. Индукция Р1-киназы, подавляющая репликацию вируса. Индукция белка Мх, вызывающая резистентность к инфицированию вирусом	Профилактика и лечение вирусных инфекционных заболеваний
Усиление защиты от внутриклеточных патогенов	Активация метаболической, фагоцитарной и бактерицидной активности макрофагов. Стимуляция дифференцировки и повышение активности дендритных клеток и экспрессии ими костимулирующих молекул. Усиление выработки провоспалительных цитокинов, IL-12, IFN $\gamma$ . Усиление дифференцировки Т-хелперов типа Th1, стимуляция клеточного иммунного ответа	Дополнительные эффекты при противовирусном лечении
Противоопухолевое действие	Активация естественных киллеров. Усиление экспрессии МНС-I и презентации опухолевого антигена Т-клеткам. Подавление пролиферации. Индукция дифференцировки клеток. Антиангиогенное действие	Лечение иммунозависимых опухолей, лейкозов

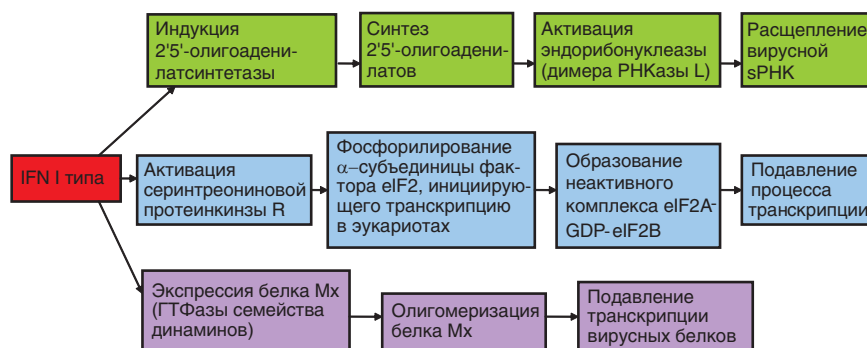


Рис. 2.58. Механизмы прямого противовирусного действия интерферонов I типа

Интерфероны I и III типов способны усиливать защиту от внутриклеточных патогенов (не только вирусов, но и микобактерий, грибов, одноклеточных паразитов). К числу патогенов, в защите от которых показана роль интерферонов I типа, относят микобактерии, хламидии, токсоплазмы, лейшмании, кандиды, листерии, трипаномы. В основе защитных свойств интерферонов, а также их противоопухолевой активности лежит способность интерферонов I типа (особенно  $IFN\alpha$ ) усиливать активность клеток врожденного иммунитета. Не являясь классическими провоспалительными цитокинами, интерфероны I типа способствуют развитию воспаления, усиливая экспрессию молекул адгезии, фагоцитарную и бактерицидную активность макрофагов. Они стимулируют активность дендритных клеток, естественных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов. Важную роль играет также иммунорегуляторная активность интерферонов, проявляющаяся преимущественно в усилении Th1-зависимого клеточного иммунитета. Как часть цитокиновой сети, интерфероны I типа влияют на экспрессию ряда цитокинов (например, IL-12,  $IFN\gamma$ , IL-15), а также их рецепторов; причем характер действия (усиление/ослабление) может варьировать в зависимости от дозы интерферона или исходного уровня выработки цитокина. Важно отметить, что интерфероны I типа усиливают экспрессию продуктов генов МНС-I. Это свойство необходимо учитывать при использовании  $IFN\alpha$  для лечения вирусных заболеваний и опухолей, поскольку усиление экспрессии МНС-I повышает эффективность цитотоксических Т-лимфоцитов, но подавляет активность НК-клеток. На иммунорегуляторном действии  $IFN\beta$  основан его положительный терапевтический эффект при аутоиммунном заболевании Т-клеточной природы — рассеянном склерозе. Наконец, важный защитный эффект интерферонов I типа при опухолях — их антипролиферативное действие, реализуемое при активации протеинкиназы А и аденилатциклазы и накоплении в клетке цАМФ. Все проявления активности интерферонов I типа видоспецифичны.

#### 2.5.6.2. Интерферон $\gamma$

$IFN\gamma$  (см. табл. 2.31) занимает в семействе интерферонов особое место. Его противовирусная активность выражена слабо, однако он обладает сильным иммунорегуляторным действием и занимает одно из центральных мест в регуляции адаптивного иммунного ответа.

Ген  $IFN\gamma$  расположен в 12-й хромосоме. Молекулярная масса мономера  $IFN\gamma$  составляет 18 кДа. В зависимости от степени гликозилирования молекула может изменять массу на 20 и 25 кДа. Дисульфидные связи в составе молекулы  $IFN\gamma$  отсутствуют. Активная форма  $IFN\gamma$  представлена в виде димера. Гомология между  $IFN\gamma$  и другими типами интерферонов не прослеживается, хотя есть сходство в пространственной организации молекул. В структуре  $IFN\gamma$  преобладают  $\alpha$ -спиральные участки (6  $\alpha$ -спиралей).

$IFN\gamma$  образуют преимущественно лимфоидные клетки (рис. 2.59). В отсутствие иммунного ответа основные его продуценты — НК- и NKT-клетки, при иммунном ответе главным источником  $IFN\gamma$  становятся Т-лимфоциты — цитотоксические  $CD8^+$  Т-клетки и особенно Th1-клетки. Показано, что  $IFN\gamma$  могут синтезировать и миелоидные клетки, в том числе

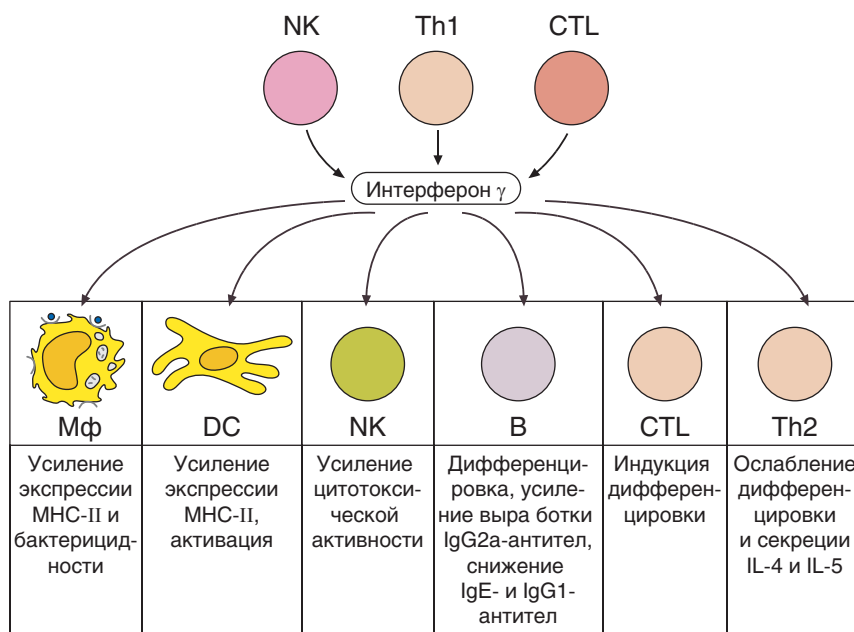
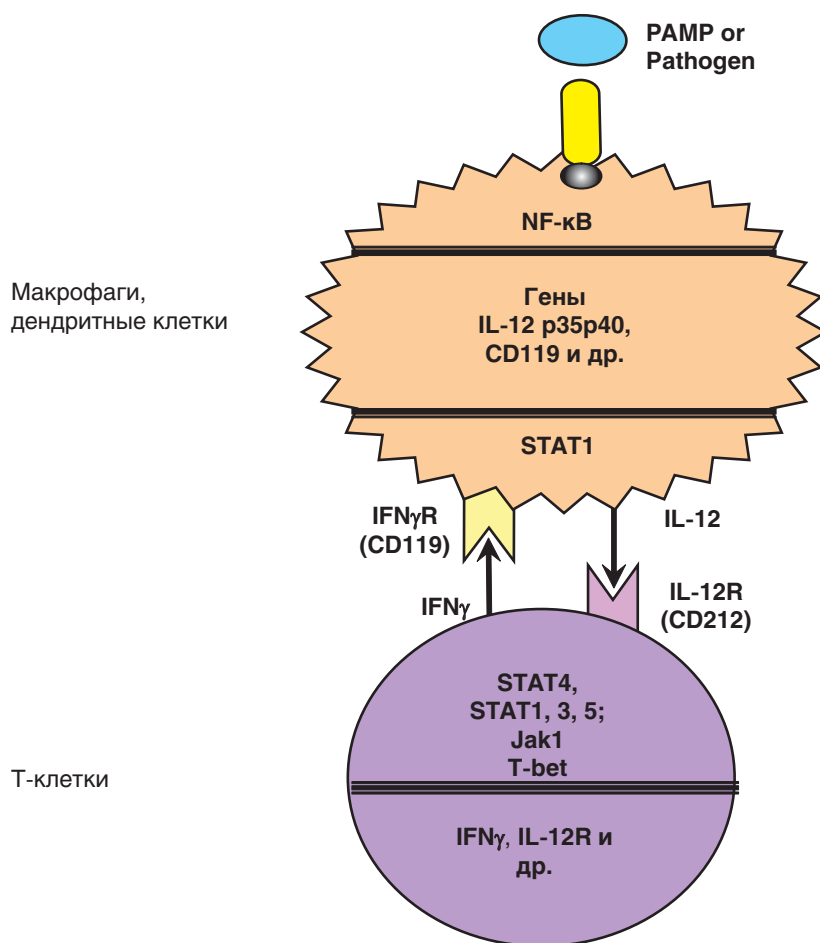


Рис. 2.59. Основные клетки-продуценты и клетки-мишени IFN $\gamma$

макрофаги и дендритные клетки. Активация Т-клеток через TCR требует значительно больше времени, в результате чего максимум обусловленной ею выработки IFN $\gamma$  достигается через 48–72 ч после стимуляции клеток.

Поскольку IFN $\gamma$  — основной продукт Th1-клеток, все факторы, направляющие дифференцировку Т-хелперов по пути Th1, прямо или косвенно способствуют экспрессии гена *IFNG*. Среди цитокинов экспрессию этого гена в наибольшей степени стимулируют IL-12 и IL-18, наиболее эффективно действующие в комбинации. Экспрессию гена *IFNG* индуцируют или усиливают также IL-23 и IL-27. К внутриклеточным факторам, определяющим включение гена *IFNG*, относят транскрипционные факторы STAT-4, через которые реализуется действие IL-12, и особенно T-bet. Экспрессия T-bet, в свою очередь, зависит от IFN $\gamma$ , в результате чего формируется петля положительной обратной связи, стабилизирующая выработку IFN $\gamma$  Th1-клетками. Кроме того, IFN $\gamma$  стимулирует выработку макрофагами и дендритными клетками IL-12. Таким образом происходит формирование функционального тандема IL-12–IFN $\gamma$  (рис. 2.60). Поскольку в основе защиты от многих патогенов лежит активная воспалительная реакция, нарушение этого тандема приводит к развитию иммунодефицитов.

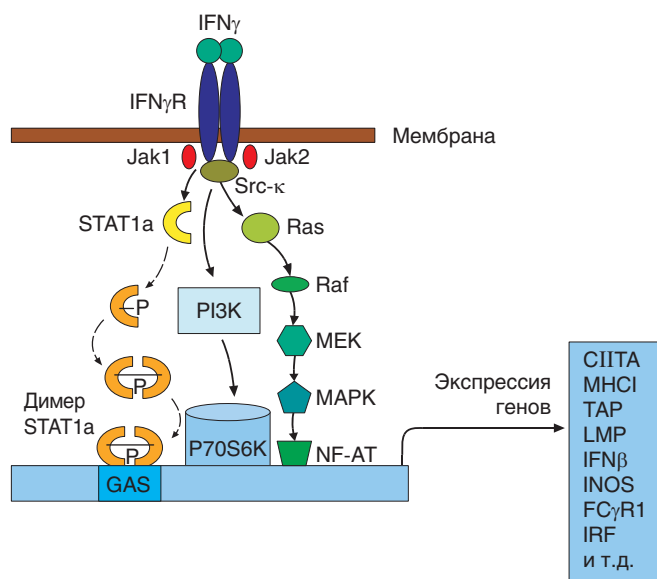
Рецептор IFN $\gamma$  принадлежит к семейству интерфероновых рецепторов. Он имеет 2  $\alpha$  (IFNGR1) и 2  $\beta$  (IFNGR2) цепи. Молекула IFN $\gamma$  реагирует с 2  $\alpha$ -цепями, не взаимодействующими между собой. Затем к  $\alpha$ -цепям присоединяются  $\beta$ -цепи (см. рис. 2.57). В результате связывания с IFN $\gamma$  двух димеров  $\alpha\beta$  происходит активация тирозинкиназ Jak1 и Jak2, связанных с цепями рецептора. В передаче сигнала от IFN $\gamma$  принимает участие фактор



**Рис. 2.60.** Роль IL-12 и IFN $\gamma$  в функциональном взаимодействии миелоидных клеток и Т-лимфоцитов

STAT1, фосфорилируемый Jak-киназами при прямом контакте с рецептором и подвергающийся димеризации. Димерный STAT1 мигрирует в ядро и взаимодействует с участками GAS (*gamma-interferon activated sequence*) и ISRE (см. выше) промоторных фрагментов генов-мишеней. Дополнительную роль в передаче сигнала от рецепторов IFN $\gamma$  играют факторы STAT-3 и STAT-5, а также факторы, которые запускают дополнительные сигнальные пути, в том числе MAP-каскад, приводящий к формированию транскрипционного фактора, участвующего в активации лимфоцитов — NF-AT. Всего при действии IFN $\gamma$  на клетки активируется больше 200 IFN $\gamma$ -зависимых генов. Некоторые из этих генов указаны на рис. 2.61.

Рецепторы для IFN $\gamma$  экспрессируют практически все популяции лейкоцитов, а также эндотелиальные, эпителиальные и некоторые другие клетки. Основные мишени действия IFN $\gamma$  — моноциты и макрофаги. При помощи IFN $\gamma$  Th1-клетки активируют макрофаги. Это приводит к активации экс-



**Рис. 2.61.** Передача внутриклеточных сигналов при действии на клетки IFN $\gamma$

прессии макрофагами некоторых ферментов, в том числе ответственных за формирование активных форм кислорода и, что особенно важно, за экспрессию индуцибельной NO-синтазы и образование NO. Комплекс радикалов кислорода и нитрита натрия необходим для внутриклеточного киллинга наиболее резистентных микроорганизмов, таких, как микобактерии. Эти события определяют роль IFN $\gamma$  в реализации клеточного иммунного ответа воспалительного типа, т.е. функция этого цитокина проявляется в большей степени в рамках адаптивного, чем врожденного иммунитета.

## РЕЗЮМЕ

Важное проявление активности  $\text{IFN}\gamma$  — усиление экспрессии молекул МНС-I и особенно МНС-II на поверхности дендритных клеток, макрофагов и других АПК, а также стимуляция процессинга антигенов путем индукции иммунопротеасом, что особенно важно для эффективной презентации антигена — пускового события адаптивного иммунного ответа. Таким образом,  $\text{IFN}\gamma$  можно рассматривать как фактор, действующий на стыке врожденного и адаптивного иммунитета.

Естественный иммунитет — филогенетически древний вариант иммунитета, основанный на распознавании чужеродных и опасных организмов, их разрушении и удалении из организма.

Эффекторные клетки врожденного иммунитета — лейкоциты миелоидного ряда (нейтрофилы, моноциты и их тканевые формы — макрофаги, дендритные клетки, а также эозинофилы, базофилы и тучные клетки) и некоторые лимфоидные клетки. Реакции врожденного иммунитета тесно связаны с воспалением, на фоне которого они осуществляются.

Чужеродные и опасные организмы (патогены) распознаются по молекулам, характерным для разных групп возбудителей. Иногда эти молекулы непосредственно связаны с патогенностью микроорганизмов. Эти молекулы — РАРР распознаются рецепторами нескольких групп, расположенными на поверхности клеток (TLR, лектиновые рецепторы), внутри клеток (NOD и другие рецепторы) или в тканевых жидкостях (комплеммент, пентраксины и т.д.). Рецепторы детерминированы генетически, их число относительно невелико (десятки).

Главный механизм врожденного иммунитета при защите от про- и эуэриотических патогенов — фагоцитоз с внутриклеточным разрушением. Фагоциты целенаправленно мигрируют к патогенам за счет хемотаксиса, распознают РАРР или опсонины — белки, вырабатываемые клетками организма и фиксирующиеся на патогенах (компоненты комплемента, естественные антитела, пентраксины) и поглощают возбудителя. В формирующейся фаголизосоме происходит лизис фагоцитированной клетки. Механизмы лизиса включают закисление среды, действие активных форм кислорода и азота, бактерицидных пептидов, катионных белков и других факторов. Погибшие клетки расщепляются ферментами.

Защита от вирусов основана на подавлении репликации их нуклеиновых кислот интерферонами и разрушении инфицированных клеток. Основной продуцент интерферонов — плазмочитоидные дендритные клетки. Киллинг инфицированных клеток осуществляют естественные киллеры (разновидность лимфоцитов, распознающих стрессорные молекулы).

Важный вклад в защиту от патогенов в системе врожденного иммунитета вносят гуморальные факторы системы комплемента, пентраксины, бактерицидные пептиды и т.д. В интеграции врожденного иммунитета основная роль принадлежит цитокинам.

Врожденный иммунитет не имеет механизмов индукции иммунологической памяти.

## Глава 3

### Адаптивный иммунитет

Основные особенности адаптивного иммунитета, отличающие его от врожденного иммунитета:

- адаптивный иммунитет узкоспецифичен, поскольку он направлен против индивидуальных чужеродных молекул — антигенов;
- в адаптивном иммунитете эффекторные клетки не преобразованы, а формируются в процессе иммунного ответа на антиген *de novo*;
- в результате адаптивного иммунного ответа формируется иммунологическая память (память о встрече с антигеном), ускоряющая и усиливающая ответ на повторное поступление антигена.

#### 3.1. МОЛЕКУЛЫ, РАСПОЗНАЮЩИЕ АНТИГЕНЫ

Основой для понимания природы адаптивного иммунитета являются знания о молекулах, специфически распознающих чужеродные субстанции. Существует три разновидности антигенраспознающих молекул: иммуноглобулины/антитела и TCR двух типов —  $\alpha\beta$  и  $\gamma\delta$ . Все они существуют в форме мембранных рецепторов лимфоцитов, а антитела — также в виде свободных растворимых молекул.

##### 3.1.1. Иммуноглобулины/антитела

Первыми из антигенраспознающих молекул были открыты **антитела**, которые к настоящему времени изучены полнее других молекул этой группы. Свойствами антител обладают белковые молекулы, называемые **иммуноглобулинами**. Таким образом, термин «иммуноглобулин» отражает химическую структуру молекулы без учета ее специфичности к конкретному антигену, а термин «антитело» определяет функциональные свойства молекулы и учитывает специфичность конкретного иммуноглобулина в отношении антигенов (обычно уточняют, к какому антигену направлены антитела, например антитела к бычьему сывороточному альбумину). Как уже отмечалось в главе 1, иммуноглобулины/антитела существуют в 2 формах: мембранной (в составе BCR) и растворимой (собственно антитела).

Антитела были открыты в 1890 г., когда Э. Беринг (*E. Behring*) и С. Китасато (*S. Kitasato*) установили, что сыворотки кроликов, которым вводили дифтерийный токсин, приобретали способность нейтрализовать этот токсин и оказывать лечебное действие при дифтерийной инфекции. Иммуноглобулины как разновидность белков были первоначально выявлены методом электрофореза во фракциях сывороточных  $\gamma$ - и  $\beta$ -глобулинов [А. Тизелиус (*A. Tiselius*), 1937]. Позже они были очищены методами хроматографии и подвергнуты структурному изучению с помощью ограниченного протеолиза [Р. Поттер (*R. Potter*)] и восстановления дисульфидных связей [Дж. Эдельман (*G. Edelman*)]. Большой вклад в изучение антител внесли исследования гомогенных опухолевых (миеломных) иммуноглобулинов

[С. Мильштейн (*C. Milstein*)], которые в конечном счете привели к созданию гибридомной технологии [Г. Кехлер (*G. Kohler*), С. Мильштейн, 1975], позволившей получать моноклональные антитела заданной специфичности. При помощи гибридом можно получать моноклональные антитела необходимой специфичности. Наконец, в конце 1970-х годов С. Тонегавы (*S. Tonegawa*) открыл молекулярные основы формирования разнообразия антигенраспознающей способности антител и описал явление соматической перестройки иммуноглобулиновых генов.

### 3.1.1.1. Строение иммуноглобулинов. Полипептидные цепи

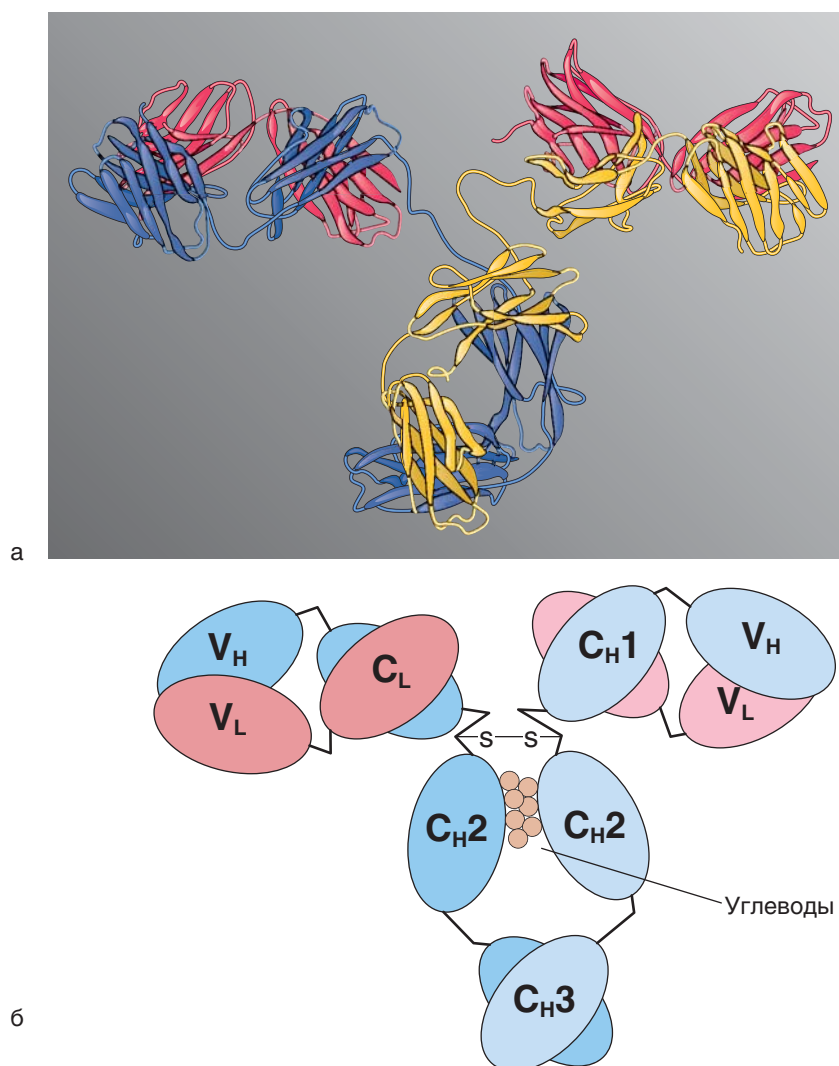
Растворимые антитела и мембранные иммуноглобулиновые рецепторы различаются только строением своей С-концевой части. В этой главе рассмотрим общие структурные особенности мембранных и растворимых молекул иммуноглобулинов.

Молекулы иммуноглобулинов состоят из двух типов полипептидных цепей — **тяжелых** (**H** — *heavy*) и **легких** (**L** — *light*). Так называемый мономерный иммуноглобулин содержит две Н- и две L-цепи, расположенные симметрично и соединенные дисульфидными связями (рис. 3.1). Единственная дисульфидная связь, соединяющая Н- и L-цепи, локализуется недалеко от С-конца легкой цепи. Н-цепи скрепляются различным числом дисульфидных связей, о чем будет сказано ниже. Молекулу иммуноглобулина можно разрушить до отдельных полипептидных цепей восстановлением дисульфидных связей дитиотреитолом или меркаптопурином. Легкие цепи содержат 2, а тяжелые — 4–5 гомологичных сегмента — **домена**. Эти сегменты образованы примерно 110 аминокислотными остатками и имеют сходную пространственную организацию, стабилизированную одной дисульфидной связью, но различные функции. Молекулярная масса L-цепей — 50–60 кДа, Н-цепей — 100–120 кДа, мономера иммуноглобулина — 150–170 кДа.

Во всех цепях N-концевой домен участвует в распознавании антигена. Главную роль при этом играет пространственное соответствие, или комплементарность, антигенраспознающей части молекулы иммуноглобулина с распознаваемым эпитопом. Специфичность иммуноглобулинов определяется первичной структурой антигенраспознающих доменов, называемых **вариабельными**, или **V-доменами** (от *variable*). V-домены тяжелых и легких цепей ( $V_H$  и  $V_L$ ) участвуют в формировании антигенсвязывающего участка, или активного центра антител.

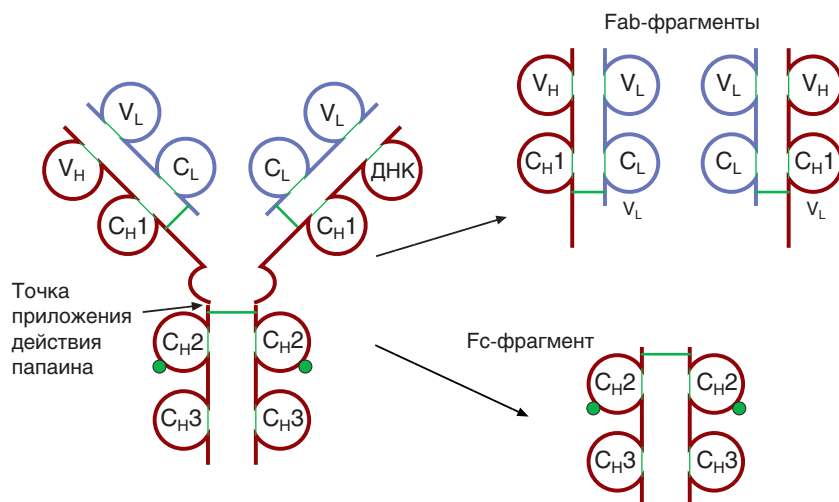
Структура остальных доменов молекулы иммуноглобулина постоянна. Поэтому их называют **константными**, или **С-доменами** (от *constant*). В состав L-цепи входит 1 С-домен ( $C_L$ ), Н-цепей — 3 или 4 С-домена ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и т.д.). С-домены определяют эффекторные функции иммуноглобулинов, не связанные с распознаванием антигена, а предназначенные для взаимодействия с рецепторами клеток, активации комплемента и т.д., что необходимо для реализации эффекторных функций антител.

Протеазы расщепляют молекулы иммуноглобулинов на фрагменты, при этом под воздействием разных протеаз можно получить различные продукты (рис. 3.2). Так, папаин расщепляет молекулы иммуноглобулинов на 2 типа **фрагментов** — **Fab** (*Fragment antigen binding*) и **Fc** (*Fragment cristallizable*). Из молекулы выщепляется два Fab-фрагмента и один Fc-фрагмент. Как сле-



**Рис. 3.1.** Структура иммуноглобулина на примере IgG1. Представлена модель молекулы по *E.V. Silvertov et al.*, 1977 (а) и ее схематическое изображение с указанием доменов (б)

дует из названия, Fab-фрагмент сохраняет способность связывать антиген, поскольку содержит активный центр антител (V-домены обеих цепей,  $C_L$ - и  $C_{H1}$ -домены). Fc-фрагмент включает остальные  $C_H$ -домены, скрепленные дисульфидными связями. Название Fc-фрагмента определило обозначение рецепторов, распознающих «хвостовую» часть антител — Fc-рецепторы. Другой протеолитический фермент — пепсин — расщепляет молекулу ближе к С-концу Н-цепей, чем папаин, — «ниже» дисульфидных связей, скрепляющих Н-цепи. В результате при действии пепсина образуется двухвалентный антигенсвязывающий  $F(ab')_2$ -фрагмент и укороченный Fc'-фрагмент.



**Рис. 3.2.** Фрагментация молекулы IgG с помощью папаина. Схематически представлено формирование протеолитических фрагментов Fab и Fc

Выделяют два типа L-цепей —  $\kappa$  и  $\lambda$ , различающиеся строением  $C_L$ -домена. Строение  $C_H$ -доменов обуславливает разделение H-цепей и молекул иммуноглобулинов на **изотипы**, или **классы**, первоначально идентифицированные серологически (т.е. с помощью сывороточных антител к различным изотипам). Выделяют 5 основных изотипов H-цепей —  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  и  $\epsilon$ . Каждая молекула иммуноглобулина может содержать H-цепи только одного изотипа. В зависимости от структуры H-цепей выделяют 5 классов молекул иммуноглобулинов — **IgM**, **IgG**, **IgA**, **IgD** и **IgE** (латинские буквы в названии иммуноглобулинов соответствуют греческим в обозначении изотипов H-цепей). Иммуноглобулины классов IgG и IgA разделяют на подклассы (субтипы), также в зависимости от особенностей H-цепей. У человека выделяют 4 подкласса IgG — **IgG1**, **IgG2**, **IgG3**, **IgG4** (у мышей — **IgG1**, **IgG2a**, **IgG2b**, **IgG3**) и 2 подкласса IgA — **IgA1** и **IgA2**. H-цепи этих подклассов иммуноглобулинов обозначают соответствующими греческими буквами с цифрой ( $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ). Иммуноглобулины всех классов могут принадлежать к K- и L-типам в зависимости от присутствия в их составе L-цепей  $\kappa$ - или  $\lambda$ -типов соответственно. У человека соотношение K- и L-типов составляет 3:2. Данные о свойствах иммуноглобулинов разных классов и подклассов представлены в табл. 3.1 и отражены на рис. 3.3.

**Таблица 3.1.** Свойства иммуноглобулинов

Свойство	IgM	IgG	IgA	IgD	IgE
Молекулярная масса, кДа	950	150; IgG3 — 165	150; димер — 300	185	190
Число мономеров	5	1	1 или 2	1	1

Окончание табл. 3.1

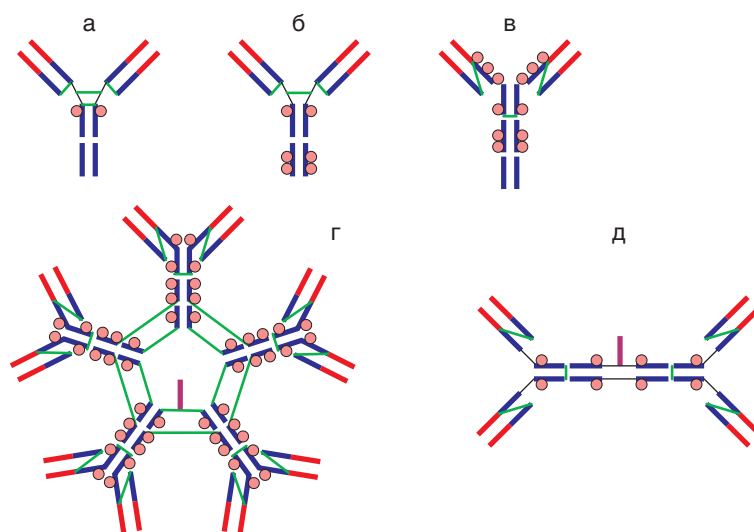
Свойство	IgM	IgG	IgA	IgD	IgE
Валентность	5	2	2 или 4	2	2
Изотип Н-цепи	$\mu$	$\gamma$	$\alpha$	$\delta$	$\epsilon$
Число С-доменов в Н-цепи	5	4	4	4	5
Число S-S связей между Н-цепями	4	3–12*	4 или 5	1	3
Содержание углеводов, %	12	3	8	13	12
Содержание в сыворотке, мг/мл	1,5	13–14**	3,5***	0,03	0,00002–0,0005
Срок полужизни, сут	5–10	23; IgG3 — 7	6	3	2
Скорость синтеза, мг/кг в сутки	7,9	34	66	0,4	0,0016
Активация комплемента	Классический путь	Классический путь (кроме IgG4)	—	—	—
Клетки, связывающие иммуноглобулин через FcR	—	Макрофаги/моноциты, нейтрофилы	Макрофаги/моноциты, нейтрофилы (слабо)	—	Тучные клетки, базофилы
Функции	Мембранный рецептор. Первичный иммунный ответ	Вторичный иммунный ответ; защита от бактерий и вирусов	Преобладающий класс в секретах слизистых оболочек	Мембранный рецептор	Реагины; защита от паразитов

\* — IgG1 — 3; IgG2 — 5; IgG3 — 13; IgG4 — 3.

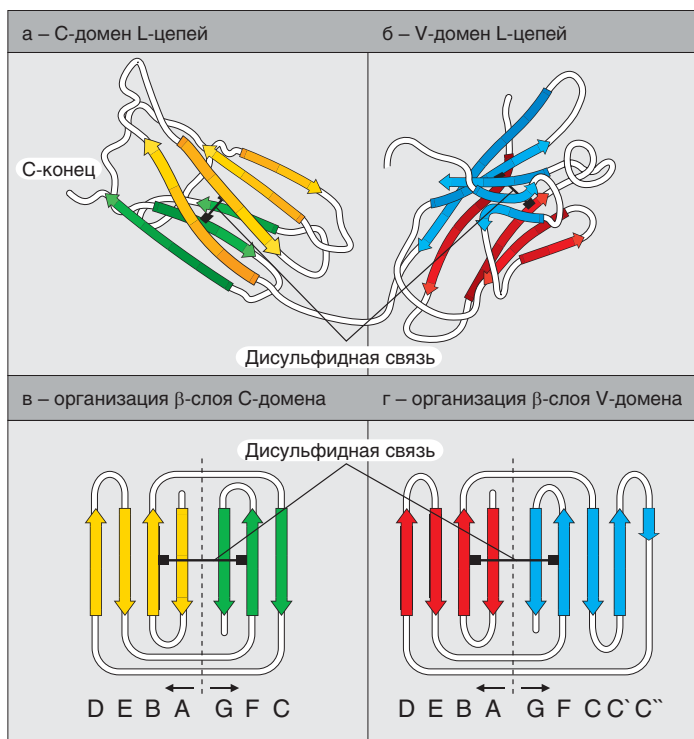
\*\* — IgG1 — 9; IgG2 — 3; IgG3 — 1; IgG4 — 0,5.

\*\*\* — IgA1 — 3; IgA2 — 0,5.

Домены иммуноглобулинов представляют собой глобулы, образованные двумя слоями, содержащими несколько  $\beta$ -складок. В С-домене  $\beta$ -слои содержат 4 и 3  $\beta$ -складки, в V-домене — оба слоя состоят из 4  $\beta$ -складок. Схема взаимного расположения  $\beta$ -складок отражена на рис. 3.4. Между слоями есть дисульфидная связь, соединяющая складки В и F и стабилизирующая структуру домена. Аналогичные домены парных полипептидных цепей повернуты на  $180^\circ$  относительно друг друга. Противоположную ориентацию имеют также соответствующие домены Н- и L-цепей. Домены контактируют друг с другом при помощи гидрофобных взаимодействий.



**Рис. 3.3.** Изотипы (классы) иммуноглобулинов: а — IgG; б — IgD; в — IgE; г — IgM; д — IgA. Синими линиями отмечены константные, красными — переменные домены, фиолетовыми — J-цепь, зелеными — дисульфидные связи. Розовые круги обозначают участки гликозирования

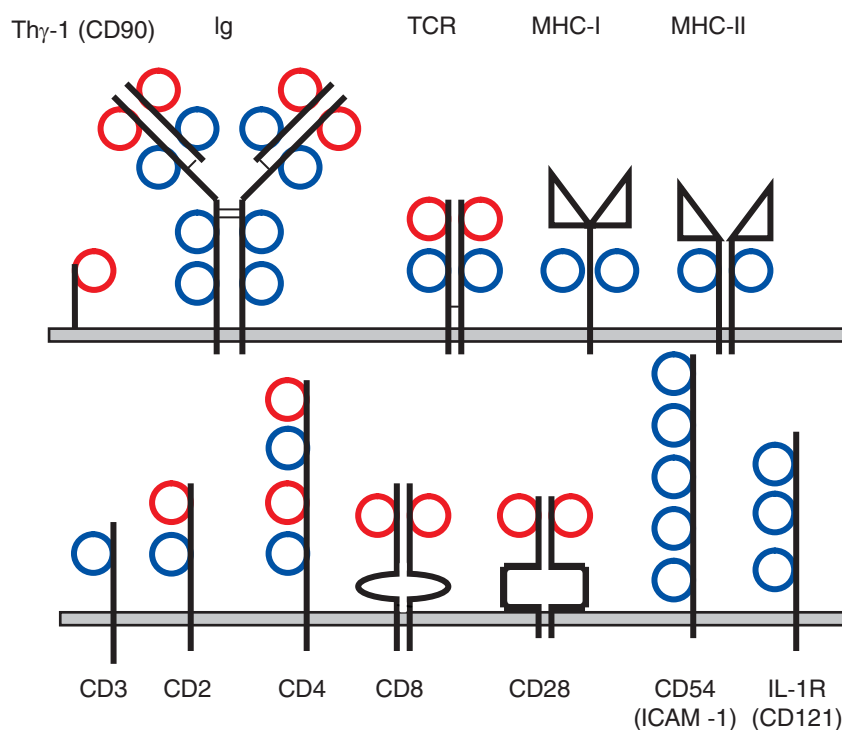


**Рис. 3.4.** Схема структуры иммуноглобулиновых доменов (на примере доменов L-цепей). Верхний ряд — пространственная модель C- и V-доменов L-цепей (по McPherson A., Harris L.); нижний ряд — схема расположения  $\beta$ -слоев в доменах

**Суперсемейство иммуноглобулинов**

Такая схема строения доменов (два параллельных организованных определенным образом  $\beta$ -слоя, соединенных дисульфидной связью) очень широко распространена в структуре молекул, функционально значимых для иммунной системы, — молекул суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF). По числу и взаиморасположению слоев выделяют домены С- и V-типов. V-тип подразумевает определенный способ взаиморасположения  $\beta$ -складок, а не варибельность молекулы (свойственная этим доменам только в составе антигенраспознающих структур — иммуноглобулинов и TCR). На рис. 3.5 представлены некоторые представители обширного суперсемейства иммуноглобулинов. В некоторых случаях молекулы имеют смешанный состав и содержат наряду с иммуноглобулиновыми структурно отличные домены. Пример таких «комбинированных» молекул — MHC, в которых только прилежащие к мембране домены принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов, а дистальные имеют иную конфигурацию.

Наиболее древний и простой представитель этого семейства — молекула Thy-1, экспрессируемая у человека в основном на нервных клетках, а у мышей — также на кроветворных клетках и Т-лимфоцитах. Эта молекула содержит единственный домен V-типа. По-видимому, суперсемейство иммуноглобулинов возникло до зарождения адаптивной иммунной систе-



**Рис. 3.5.** Суперсемейство иммуноглобулинов. Синие кружки обозначают С-домены; красные — V-подобные домены. Значки иной формы означают, что домен не относится к суперсемейству иммуноглобулинов

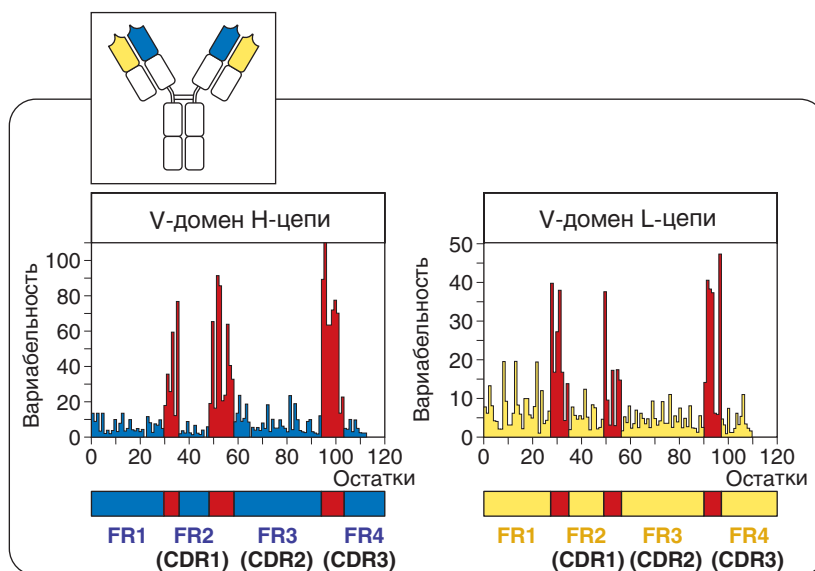
мы (об этом свидетельствует наличие молекул с такой структурой у беспозвоночных), но широко использовалось при ее формировании. Наблюдаемое у позвоночных разнообразие членов этого семейства возникло в результате сочетания дупликаций генов с точечным мутационным процессом.

### 3.1.1.2. V-домены и антигенсвязывающие участки иммуноглобулинов

V-домены H- и L-цепей содержат 4 участка с относительно постоянным составом, называемые **каркасными участками**, и 3 высоковариабельных участка, называемые **гипервариабельными** (рис. 3.6). Положение гипервариабельных участков варьирует в различных цепях; оно примерно соответствует расположению 25–35, 50–60 и 93–102 аминокислотных остатков. Поскольку эти участки играют ключевую роль в распознавании и связывании антигена, их еще называют участками, определяющими комплементарность — CDR (*Complementarity determining regions*).

V-домены могут быть одинаково представлены в иммуноглобулинах всех классов. По строению каркаса выделяют 3 подгруппы H-цепей, 3 подгруппы κ-цепей и 5 подгрупп λ-цепей. Каркасная последовательность V-доменов весьма консервативна. Их гомология внутри подгруппы составляет 85–90%.

В пространственной структуре V-доменов вариабельные последовательности расположены в зоне изгибов полипептидной цепи, направленной навстречу соответствующим участкам V-домена другой цепи (т.е. CDR



**Рис. 3.6.** Локализация гипервариабельных участков, определяющих разнообразие антигенсвязывающих участков антител, в V-доменах H- и L-цепей. На графиках представлено число вариантов аминокислотных остатков, выявленное в каждой позиции V-доменов цепей L и H. В гипервариабельных участках молекул регистрируют значительное превышение уровня вариабельности, по сравнению с остальной частью молекул (по Kabat E.A. et al., 1977)

H- и L-цепей направлены навстречу друг другу). В результате формируется гидрофильный канал, образующий антигенсвязывающий участок (активный центр) иммуноглобулинов. Он представляет собой полость длиной 6 нм и шириной 1,2–1,5 нм (по данным электронной микроскопии). Площадь поверхности, предназначенной для контакта с антигеном, составляет 7,2 нм<sup>2</sup>. Пространственная структура этой полости, обусловленная строением гипервариабельных участков, определяет специфичность антител, т.е. их способность распознавать и связывать конкретные молекулы на основе пространственного соответствия. Сверхвысокая вариабельность CDR и активных центров обеспечивает уникальность молекул иммуноглобулинов, синтезируемых В-лимфоцитами одного клона, не только по структуре, но и по способностям связывать различные антигены.

В формирование активного центра вносят вклад пространственно разделенные участки H- и L-цепей. Гипервариабельные участки V-доменов входят в состав активного центра не полностью — поверхность антигенсвязывающего участка захватывает только около 30% CDR. Структура активного центра была первоначально установлена методом мечения по сродству, основанным на регистрации места связывания меченых низкомолекулярных лигандов. Позже многие детали структуры активных центров антител и их взаимодействия с антигеном были установлены с помощью рентгеноструктурного анализа кристаллов молекул антител.

Антигенсвязывающая способность V-доменов H- и L-цепей по отдельности выражена значительно слабее, чем в составе активного центра. Поскольку мономерные иммуноглобулины содержат по две пары H- и L-цепей, молекула содержит два антигенсвязывающих участка, что наглядно демонстрируется с помощью электронной микроскопии: при связывании антителами бифункционального лиганда образуются видимые кольцевые структуры.

### 3.1.1.3. С-домены, изотипы и антигенные варианты иммуноглобулинов

Как уже говорилось, принадлежность иммуноглобулинов к различным классам и подклассам определяется строением и числом их С-доменов. В состав  $\gamma$ -,  $\alpha$ - и  $\delta$ -цепей входит по 3, а в состав  $\mu$ - и  $\epsilon$ -цепей — по 4 С-домена (см. табл. 3.1).

В С-доменах локализовано большинство участков, распознаваемых рецепторами клеток (Fc-рецепторами, С-рецепторами для компонентов комплемента). Так, в домене  $C\gamma 2$  расположены участки связывания с компонентом комплемента C4b, а также с рецепторами  $Fc\gamma RI$  и  $Fc\gamma RII$ . В домене  $C\gamma 3$  локализован участок связывания с  $Fc\gamma RIII$ . В связывании C1q участвуют  $C\gamma 2$ , и  $C\gamma 3$ . Особенности строения домена  $C_H 2$  определяют скорость метаболизма молекул иммуноглобулинов, т.е. продолжительность их пребывания в циркуляции.

Между доменами  $C_H 1$  и  $C_H 2$  располагается участок, различный по протяженности в H-цепях разных изотипов и не входящий в состав доменов. В связи высоким содержанием остатков пролина этот участок обладает высокой гибкостью, что и определило его название — **шарнирный**. Именно в этом участке располагаются сайты расщепления иммуноглобулинов протеазами (см. рис. 3.2). В нем сосредоточены все дисульфидные связи, соеди-

няющие Н-цепи. Число этих связей варьирует от 1 в молекуле IgD до 13 в молекуле IgG3. Молекула IgG1 содержит 3 дисульфидные связи.

Важный элемент молекул иммуноглобулинов — их углеводная компонента. L-цепи лишены стабильных участков гликозилирования. В Н-цепях они представлены во всех доменах, кроме вариабельного (больше всего в C<sub>H</sub>2). Число сайтов гликозилирования в иммуноглобулинах разных изо-типов различно. Сайты N-гликозилирования (через остатки аргинина) преобладают над сайтами O-гликозилирования (через остатки серина или треонина). Молекулы IgG гликозилированы значительно слабее (углеводы составляют 2–3% массы молекулы), чем иммуноглобулины других классов (12–14%). Молекулярная масса углеводной цепи в составе IgG составляет около 2 кДа. Обычные углеводные цепи имеют основу, образованную остатками маннозы и хитобиозы, и могут содержать две или более «антенн». Хотя углеводный компонент иммуноглобулина не влияет на его специфичность, он стабилизирует функционально важные детерминанты молекулы, обеспечивает взаимодействие с лектинами, определяет особенности катаболизма и т.д. Гликозилирование может существенно влиять на биологические свойства антител. Так, негликозилированные молекулы IgG обладают меньшим сродством к FcγRI, FcγRII и C1q, чем гликозилированные. Дефекты гликозилирования молекул иммуноглобулинов играют важную роль в иммунопатологии.

IgG всех субклассов, а также IgD и IgE представляют собой мономерные молекулы, т.е. содержат по две пары Н- и L-цепей. Растворимые молекулы IgA и IgM формируют полимеры — димер IgA и пентамер IgM. В их состав, помимо классических полипептидных цепей, входит соединительная J-цепь (от *joining*) массой 15 кДа, связанная с Н-цепью дисульфидной связью. J-цепь отвечает за стабилизацию полимера. Эта цепь не гомологична Н- и L-цепям (не относится к суперсемейству иммуноглобулинов). Мономерные единицы в IgA и IgM соединяются дисульфидными связями в С-концевой части Н-цепей. Эти связи особенно чувствительны к действию восстановителей. Так, под действием 2-меркаптоэтанола пентамер IgM (константа седиментации 19S, масса 900 кДа) распадается на мономеры (7S, 150 кДа). В составе присутствующих в секретах молекул IgA (секреторный IgA, sIgA) содержится еще одна цепь — секреторный компонент (SC). Его молекулярная масса — 60 кДа. Традиционно роль секреторного компонента связывают с защитой молекулы IgA от действия протеаз, содержащихся в высоких концентрациях в пищеварительных и иных секретах. В настоящее время появились данные, свидетельствующие о более разнообразных функциях этого компонента. Секреторный компонент представляет собой часть поли-Ig-рецептора, участвующего в транспортировке молекулы IgA через эпителиальный пласт в слизистых оболочках. Процесс секреции IgA будет подробнее рассмотрен при описании иммунной защиты барьерных тканей (см. раздел 3.6.5.4).

Роль иммуноглобулинов различных классов в иммунной защите организма различна. Поскольку первыми экспрессируются μ-цепи, в ходе иммунного ответа ранее других начинает секретироваться IgM (см. раздел 3.1.4.3). Большинство антител при первичном иммунном ответе принадлежит к IgM-классу. IgM-антитела обладают высокой способностью связывать ком-

племент, агглютинировать и лизировать клетки-мишени. В то же время они обладают относительно низким сродством к антигену, причем оно не возрастает в процессе иммунного ответа (отсутствует созревание аффинитета). Недостаточная функциональная эффективность IgM-антител обусловлена также отсутствием на эффекторных клетках иммунной системы рецепторов для Fc-части молекулы IgM. Тем не менее роль IgM-антител в экстренной защите организма на ранних этапах иммунного ответа достаточно велика.

IgG-антитела, на долю которых приходится основная часть антител на поздних этапах первичного и при вторичном иммунном ответе, обладают рядом преимуществ перед IgM-антителами. В то же время субтипы IgG различаются по эффекторным свойствам. Так, IgG1 и IgG3 весьма эффективны в привлечении фагоцитов и киллерных клеток (эти иммуноглобулины распознаются Fcγ-рецепторами различных типов), а также в активации комплемента. IgG1 составляют более половины всех антител, образующихся при иммунном ответе. Защитная активность IgG2- и IgG4-антител выражена незначительно в связи со слабым взаимодействием с Fcγ- и рецепторами комплемента. Их роль состоит преимущественно в прямой нейтрализации патогенов. IgG2-антитела чаще всего специфичны к углеводным детерминантам.

IgA — основной иммуноглобулин секретов слизистых оболочек и главный фактор их специфической защиты, о чем уже упоминалось выше. Секреторный IgA связывается с поверхностью патогенов, блокируя их адгезию на слизистых оболочках и подвижность. Таким образом, секреторный IgA участвует в формировании иммунной защиты слизистых оболочек. Назначение сывороточного IgA менее понятно, особенно если учитывать его слабую способность взаимодействовать с Fc-рецепторами и активировать комплемент. Содержание IgD и IgE в сыворотке крови очень низко. IgD экспрессируется в составе BCR; роль IgD в сыворотке крови не установлена. Несмотря на то, что IgE является минорным компонентом сывороточных иммуноглобулинов, он обладает значительной активностью в защите от паразитов. IgE играет ключевую роль при аллергии немедленного типа, в контексте которой он и будет рассмотрен более детально (см. раздел 4.5.1.3).

#### *Аллотипия и идиотипия*

Генетически обусловленная переменность константных доменов или каркасных участков V-доменов проявляется в варьировании антигенных свойств иммуноглобулинов, называемом аллотипией. Как правило, аллотипические детерминанты различаются по 1–2 аминокислотным остаткам. Описаны аллотипические системы для разных цепей — κ (Km, или Inv), γ (Gm; имеет 24 аллельных варианта), α (Am), μ, а также V-доменов. Функциональная значимость аллотипии не установлена. Аллотипы используют в качестве генетических маркеров молекул иммуноглобулинов в популяционных исследованиях.

Отражением структурного разнообразия антигенсвязывающего участка иммуноглобулинов-антител является их идиотипическое разнообразие. Если рассматривать антитела как молекулы с антигенными свойствами, то естественно предположить, что антигенная специфичность их переменных участков будет практически уникальна. Антигенные детерминанты — эпитопы, локализующиеся в переменных зонах иммуноглобулинов, назы-

вают **идиотопами**, а соответствующие антигенные варианты иммуноглобулинов — **идиотипами**.

Некоторые идиотипы характерны для практически всех антител данной специфичности, вырабатываемых в организмах генетически однородных животных. Таков идиотип T15, свойственный антителам к фосфорилхолину, продуцируемым у мышей линии C57BL/6. Молекулы антител имеют перекрестно реагирующие (общие) и индивидуальные (частные) идиотипы. Общие идиотипы характерны для антител к распространенным антигенам. Частные идиотипы служат уникальными маркерами антител. Активные центры антител к некоторым идиотипам по крайней мере частично воспроизводят пространственную структуру антигена, против которого направлены антитела, несущие этот идиотип. Такие антиидиотипические активные центры обозначают как **внутренний образ антигена**. Однако полное совпадение пространственной структуры антиидиотипа и антигена невозможно, поскольку антигенный эпитоп практически всегда имеет выпуклую форму, а активный центр антител — вогнутую. Антиидиотипические антитела играют важную роль в регуляции гуморального иммунного ответа (см. раздел 3.6.6.3).

### 3.1.2. В-клеточный рецептор

Существование на поверхности лимфоцитов рецепторов для антигенов было предсказано П. Эрлихом. На предположении о существовании таких рецепторов Ф. Бернет основывал свою клонально-селекционную теорию. Во 2-й половине 60-х годов XX века рецепторы В-клеток были идентифицированы как мембранные иммуноглобулины (mIg). Позже было показано, что BCR содержит, помимо иммуноглобулина, дополнительные белковые молекулы, обеспечивающие передачу сигнала внутрь клетки. Сокращенное обозначение этого молекулярного комплекса — BCR (*B-cell receptor*).

#### 3.1.2.1. Мембранный иммуноглобулин

Мембранный иммуноглобулин — специфический маркер В-клеток, поскольку он экспрессирован на всех зрелых В-лимфоцитах и отсутствует на других клетках. Преобладающим классом мембранных иммуноглобулинов на наивных (не контактировавших с антигеном) В-клетках является IgM. Он присутствует на поверхности всех наивных В-лимфоцитов, начиная со стадии незрелых В-клеток (см. раздел 3.3.1.2) (табл. 3.2). На зрелых наивных В-клетках наряду с IgM присутствует IgD. Число молекул иммуноглобулинов на поверхности наивной В-клетки составляет около 150 000. В процессе иммунного ответа происходит переключение классов иммуноглобулинов на IgG, IgA и IgE. В-клетки крови и вторичных лимфоидных органов несут на своей поверхности преимущественно IgG, а В-клетки слизистых оболочек — IgA.

Все молекулы иммуноглобулинов, расположенные на поверхности конкретной клетки, построены из идентичных Н- и L-цепей. Поэтому они имеют один и тот же изотип и аллотип, а также обладают одинаковой специфичностью к антигенам и, следовательно, идентичны по идиотипу. Разные В-клетки отличаются по специфичности мембранных рецепторов. Только клетки, происходящие от одного предшественника (клоны В-клеток), имеют идентичные мембранные иммуноглобулины, если в их V-генах

не произошла мутация. Все клоны, образующие популяцию В-клеток, формируют антигенраспознающий репертуар В-лимфоцитов. Этот репертуар, как правило, обеспечивает распознавание практически всех возможных конфигураций молекул (эпитопов).

**Таблица 3.2.** Сравнение антигенраспознающих молекул в составе рецепторов В- и Т-клеток

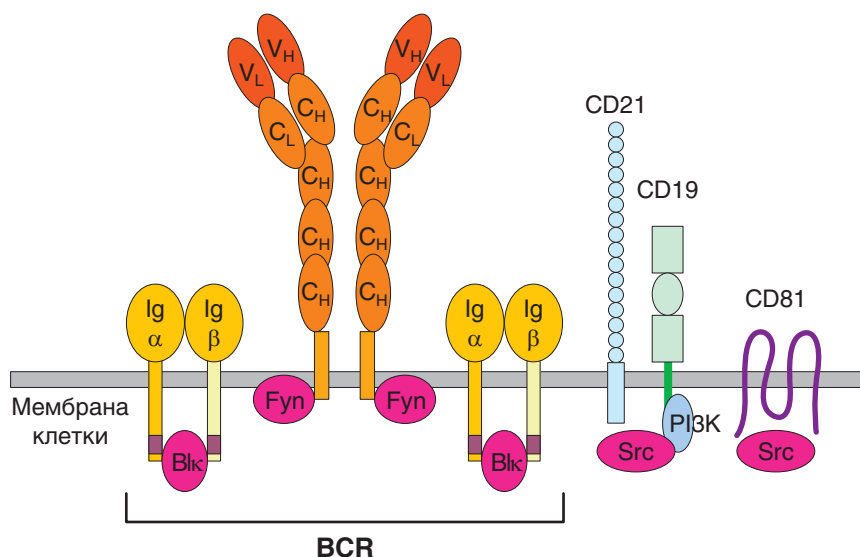
Характеристика	В-клетки	Т-клетки
Название	BCR (распознающая часть — иммуноглобулин)	Комплекс TCR—CD3 (распознающая часть — TCR)
Число полипептидных цепей в распознающем комплексе	4 цепи 2 типов (H и L)	2 цепи ( $\alpha$ и $\beta$ или $\gamma$ и $\delta$ )
Молекулярная масса, кДа	160–190	$\alpha\beta$ — 80–100, $\gamma\delta$ — 85–110
Число и типы доменов	В H-цепях: V — 1, C — 3–4. В L-цепях: V — 1, C — 1	В каждой цепи: V — 1, C — 1
Ассоциированные молекулы	Два димера Ig $\alpha$ /g $\beta$	Комплекс CD3 ( $\gamma\delta\epsilon 2$ ) и димер $\zeta_2$ или $\zeta\eta$
Аффинность (Kd, M)	$10^{-7}$ – $10^{-11}$	$10^{-5}$ – $10^{-7}$
Секретируемые формы	Есть (антитела)	Нет
Переключение изотипов С-доменов	Есть	Нет
Соматический мутагенез	Есть (при иммунном ответе)	Нет

Структура мембранных иммуноглобулинов совпадает со структурой растворимых антител соответствующей специфичности за исключением их С-концевого участка. Мембранный иммуноглобулин содержит гидрофобный трансмембранный участок, обеспечивающий закрепление молекулы на клеточной мембране. Этот участок не гомологичен доменам иммуноглобулинов. В  $\mu$ -цепи он содержит 41 остаток и имеет массу 1,7 кДа. Цитоплазматический участок мембранных иммуноглобулинов очень короткий. Его протяженность варьирует от 3 (в IgM) до 28 (в IgG3) аминокислотных остатков. Мембранный IgM имеет еще одну особенность — в отличие от сывороточного IgM, являющегося пентамером с константой седиментации 19S, он представляет собой 7S-мономер.

### 3.1.2.2. Дополнительные полипептидные цепи В-клеточного рецептора

Молекулярная структура BCR проиллюстрирована на рис. 3.7. В состав BCR помимо иммуноглобулина входит еще несколько молекул. Две из них — CD79a и CD79b — составляют интегральную часть BCR, еще три — CD19, CD21 и CD81 — функционально ассоциированы с ним и формируют физическую связь с BCR только при активации клетки. Молекулярная характеристика этих молекул представлена в табл. 3.1.

Варианты молекул CD79 — а и b — называют еще Ig $\alpha$  и Ig $\beta$ . При помощи нековалентных связей они формируют гетеродимеры, связанные с мембранным иммуноглобулином. Эти молекулы имеют сходные размеры и



**Рис. 3.7.** Схема В-клеточного рецептора и связанных с ним молекул. На схеме показаны трансмембранные молекулы, образующие В-клеточный рецептор (mIg, Igα/Igβ), а также связанные с ними внутриклеточные тирозинкиназы (окрашены фиолетовым) и трансмембранные молекулы (CD19, CD21, CD81)

молекулярную массу (около 40 кДа). Участие Igα и Igβ в передаче сигнала основано на связи их цитоплазматической части с внутриклеточными тирозинкиназами. Молекулу CD19 относят к суперсемейству иммуноглобулинов. CD19 играет важную сигнальную функцию, поскольку эта молекула связана с киназой PI<sub>3</sub>K. CD21 — рецептор для компонентов комплемента (CR2), участвующий в усилении антигенного сигнала (см. раздел 3.6.2.1), а также в регуляции активности В-лимфоцитов. CD81 относят к тетраспанинам (4 раза пронизывают мембрану); функция этой молекулы точно не определена.

С цитоплазматическими участками мембранного иммуноглобулина связана тирозинкиназа Fyn, а с молекулами CD79, CD19 и CD81 — тирозинкиназы Blk, Lyn, Lck, а также Syk, участвующие в передаче активационного сигнала. Кроме того, около цитоплазматической части молекулы CD19 располагается липидная киназа PI<sub>3</sub>K. Такое обилие сигнальных ферментов, связанных с компонентами BCR, обеспечивает запуск и передачу активационных сигналов при связывании антигена; этот аспект будет подробнее рассмотрен далее (см. раздел 3.6.2.1).

### 3.1.3. Т-клеточный рецептор и связанные с ним молекулы

Раскрытие природы антигенраспознающего рецептора Т-клеток (TCR) оказалось одной из наиболее трудных задач за всю историю иммунологии. Несмотря на целенаправленные исследования с конца 60-х годов XX века, эта задача была разрешена только в начале 80-х годов, когда совместными усилиями нескольких исследовательских групп, использовавших моно-

клональные антитела, специфичные к клонам Т-клеток, были идентифицированы 2 полипептидные цепи ( $\alpha$  и  $\beta$ ), входящие в состав основного типа рецептора Т-клеток для антигенов. Рецептор стали обозначать как TCR (*T-cell receptor*), или  $\alpha\beta$ TCR. К концу 80-х годов было открыто еще две разновидности полипептидных цепей ( $\gamma$  и  $\delta$ ), образующих другой тип TCR —  $\gamma\delta$ TCR. Еще до открытия полипептидных цепей TCR был описан комплекс молекул CD3, который оказался связанным с TCR обоих типов. Они непосредственно не участвуют в распознавании антигенов, но несут сигнальную функцию.

### 3.1.3.1. Димеры $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$

Димеры  $\alpha\beta$  и  $\gamma\delta$  — собственно антигенраспознающая часть TCR (см. табл. 3.2). Они имеют аналогичное строение и молекулярную организацию. Полипептидные цепи, входящие в состав TCR, принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов. Димеры TCR организованы значительно проще, чем иммуноглобулины. Цепи TCR по строению сходны с L-цепями иммуноглобулинов. Каждая цепь TCR имеет 2 внеклеточных домена, один из которых варибельный, а другой (расположенный ближе к мембране) — константный (рис. 3.8). Домены содержат 87–113 аминокислотных остатков. Гомология полипептидных цепей TCR и иммуноглобулинов невелика, но они имеют сходную доменную организацию. Домены цепей TCR образованы двумя  $\beta$ -слоями. В константном домене они содержат 4 и 3, а в варибельном — по 4  $\beta$ -складки. Во всех типах полипептидных цепей TCR в каждом из двух доменов содержится по одному участку гликозилирования. В отличие от L-цепей, полипептидные цепи TCR являются мембранными молекулами, имеющими трансмембранный (10–12 аминокислотных остатков) и короткий цитоплазматический (3–5 аминокислотных остатков) участки. Цепи скреплены дисульфидной связью, расположенной непосредственно над клеточной мембраной в шарнирном участке молекул. Трансмембранные отделы цепей связаны друг с другом за счет противоположных электрических

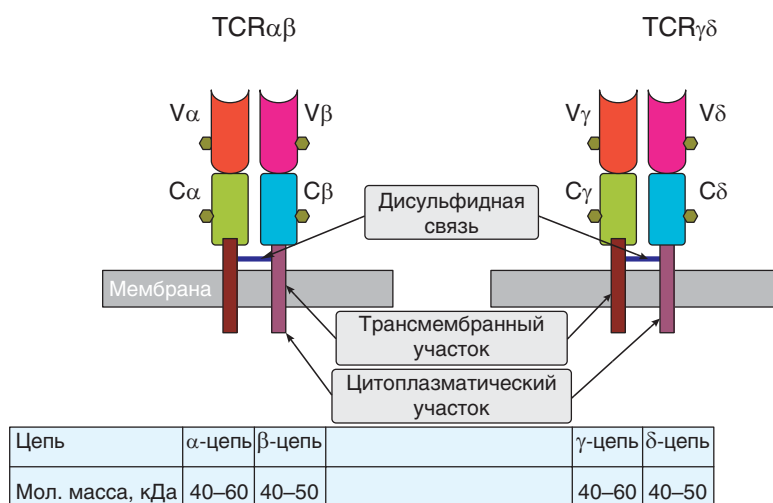


Рис. 3.8. Строение антигенраспознающих димеров Т-клеточных рецепторов

ких зарядов. Цепи димера ( $\alpha\beta$  или  $\gamma\delta$ ) связаны с полипептидными цепями комплекса CD3, также нековалентно, на основе электростатических взаимодействий (при участии лизина в TCR и аспарагиновой кислоты в CD3). Характеристика полипептидных цепей TCR представлена в табл. 3.3.

В V-доменах TCR, как и в V-доменах иммуноглобулинов, есть 4 каркасных участка с относительно постоянной аминокислотной последовательностью и 3 — CDR. Особенно высокая вариабельность свойственна CDR3. Гипервариабельные участки двух цепей формируют антигенсвязывающую полость TCR. Как и в иммуноглобулинах, выделяют несколько семейств V-доменов TCR, различающихся строением каркасных последовательностей.

**Таблица 3.3.** Характеристика полипептидных цепей комплекса Т-клеточный рецептор CD3

Цепь	Молекулярная масса, кДа	Число остатков	Число цепей в комплексе	Число внеклеточных доменов	Число ITAM	Число остатков Cys-Cys
TCR $\alpha$	40–60	250–270	1	2 (SFIg — V и C)	0	5–6
TCR $\beta$	40–50	290–315	1	2 (SFIg — V и C)	0	6
TCR $\gamma$	45–60	300–315	1	2 (SFIg — V и C)	0	8
TCR $\delta$	40–60	400–425	1	2 (SFIg — V и C)	0	6
CD3 $\gamma$	25	160	1	1 (SFIg — C)	1	3
CD3 $\delta$	20	150	1	1 (SFIg — C)	1	4
CD3 $\epsilon$	20	164	2	1 (SFIg — C)	1	2
CD3 $\zeta$	16	142	1–2	1	3	1
CD3 $\eta$	22	152	0–1	1	3	1

SFIg — суперсемейство иммуноглобулинов.

В отличие от антител, распознающих эпитопы свободных антигенов,  $\alpha\beta$ TCR распознает пептидные фрагменты антигенов, встроенные в молекулы МНС. При этом антигенный пептид взаимодействует с наиболее вариабельным CDR3, а прилежащие участки молекулы МНС — с CDR1 и CDR2 (особенности распознавания антигенов разными типами рецепторов будут подробно рассмотрены далее, см. раздел 3.2.2.3). Для распознавания необходимо сохранение димерной структуры рецепторов, тогда как изолированные пептидные цепи не способны распознавать антиген.  $\beta$ -Цепи константных доменов полипептидных цепей TCR, относящиеся к различным семействам, различаются по способности связывать суперантигены (см. раздел 3.2.2.4). Растворимые формы TCR не образуются. Растворимые молекулы TCR, созданные генно-инженерными методами, не способны распознавать антигены. Антигенсвязывающие участки TCR обладают идиотипической специфичностью, иногда сходной с таковой антител.

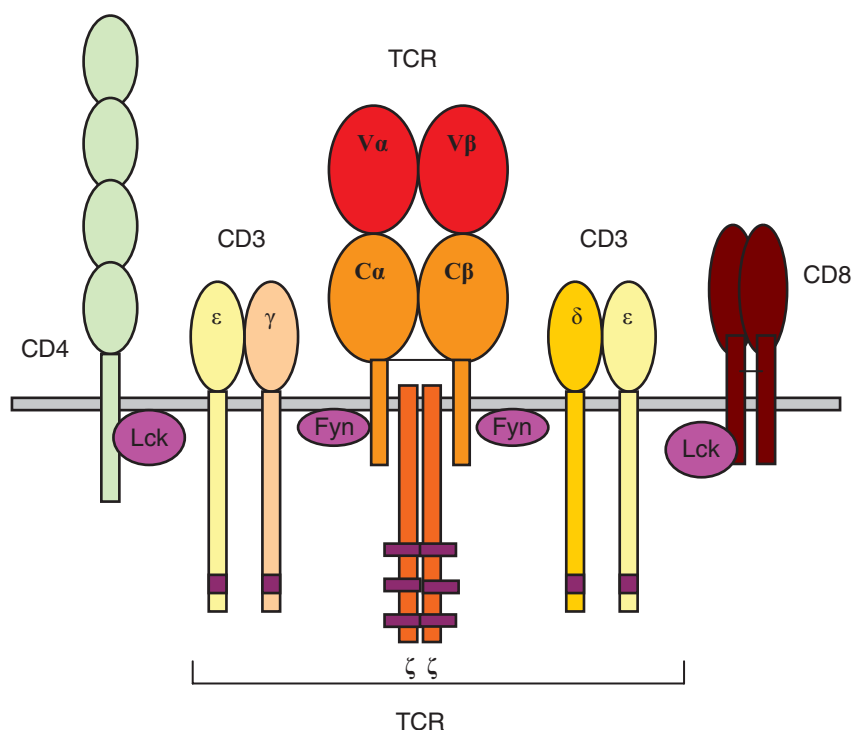
В норме на поверхности Т-клетки содержится 30 000–40 000 молекул  $\alpha\beta$ TCR, т.е. в 4–5 раз меньше, чем BCR на поверхности В-клетки. TCR, как и CD3, являются абсолютными маркерами Т-лимфоцитов: они экспрессируются только на зрелых Т-клетках. Каждая Т-клетка может нести на поверхности только один тип TCR —  $\alpha\beta$  или  $\gamma\delta$ . На этой основе выделяют две главные разновидности Т-клеток, кардинально различающиеся по своим

свойствам. Большинство (>95%) Т-клеток, локализующихся во вторичных лимфоидных органах, циркулирующих в крови и лимфе, имеют рецептор  $\alpha\beta$ -типа.  $\gamma\delta$ -клетки составляют минорную субпопуляцию (1–3%), представленную преимущественно в барьерных тканях, особенно в слизистой оболочке кишечника, где их содержание достигает 20–30% от общего числа Т-лимфоцитов.

### 3.1.3.2. Комплекс CD3

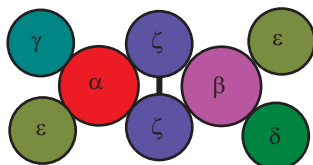
Комплекс полипептидных цепей, называемый CD3, выявили в 1979 г. с помощью моноклональных антител. Позже было установлено, что он входит в состав TCR и выполняет сигнальную функцию. Комплекс включает молекулы 4 типов —  $\gamma$ ,  $\delta$  (не путать с  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепями димера TCR),  $\epsilon$  и  $\zeta$  (рис. 3.9). Димер  $\zeta$ -цепей в настоящее время выделяют в особый комплекс, имеющий свой CD-номер (CD247). Характеристика всех упомянутых цепей представлена в табл. 3.3.

Все цепи, образующие CD3 и CD247, представляют собой трансмембранные белки I типа (ориентированы своей N-концевой частью наружу). Внеклеточные части  $\gamma$ -,  $\delta$ - и  $\epsilon$ -цепей содержат по 1 домену суперсемейства

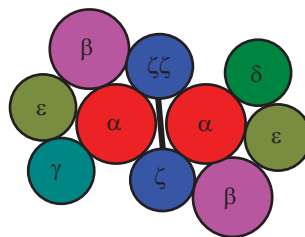


**Рис. 3.9.** Схема Т-клеточного рецептора и связанных с ним молекул. В рецепторный комплекс Т-лимфоцитов, помимо антигенраспознающего димера, (в данном случае —  $\alpha\beta$ ) входят трансмембранные полипептидные цепи, образующие комплекс CD3, а также  $\zeta$ -димер и связанные с рецептором внутриклеточные тирозинкиназы (киназы окрашены фиолетовым). Фиолетовые полосы в цитоплазматической части цепи — ITAM

Моновалентная модель



Бивалентная модель



**Рис. 3.10.** Модели строения Т-клеточного рецептора. Кружки — полипептидные цепи, черная линия — дисульфидная связь

иммуноглобулинов и достаточно консервативны (межвидовая гомология — 70–80%). Структура доменов стабилизирована дисульфидными связями. Цепи CD3-комплекса связаны между собой, а также с димерами TCR и  $\zeta_2$  нековалентно. Во внутриклеточной части  $\gamma$ -,  $\delta$ - и  $\epsilon$ -цепей содержится мотив ITAM. К этим цепям примыкает (а при активации клетки формирует прямую связь) тирозинкиназа Fyn. Это свидетельствует об участии цепей комплекса CD3 во внутриклеточной передаче сигналов.

$\zeta$ -Цепи не принадлежат к суперсемейству Ig. Они формируют димер, связанный расположенной над мембраной дисульфидной связью. Около 10% молекул представляют не гомо-, а гетеродимер  $\zeta$ - и  $\eta$ - цепей (продукт альтернативного сплайсинга гена, кодирующего  $\zeta$ -цепь). В Т-клетках слизистых оболочек в составе димера выявляют еще один тип цепей —  $\gamma$ -цепь (т.е. образуется  $\zeta\gamma$ -димер), идентичная  $\gamma$ -цепи, входящей в состав Fc $\epsilon$ R1 и ряда других Fc-рецепторов (см. раздел 2.3.4.2).  $\zeta$ -Цепь не имеет участков гликозилирования. Из 143 остатков  $\zeta$ -цепи только 9 расположены внеклеточно; 22 остатка образуют трансмембранный участок, а 112 — внутриклеточную часть. В ней содержится 3 активационных мотива ITAM, что свидетельствует об очень активном участии молекулы в передаче сигналов. И действительно,  $\zeta$ -димер, благодаря своей связи с киназой ZAP-70, передает сигнал от рецепторных структур к ферментам и адапторным белкам, направляющим его далее по основным путям внутриклеточной передачи сигнала.

Существует несколько моделей четвертичной структуры TCR-CD3 комплекса (рис. 3.10). Согласно моновалентной модели, комплекс содержит по одной цепи каждого типа, кроме  $\epsilon$ - и  $\zeta$ -цепей, представленных по две цепи каждая. При этом  $\alpha$ -цепь пространственно связана с димером  $\gamma\epsilon$ , а  $\beta$ -цепь — с димером  $\delta\epsilon$ ;  $\zeta$ -димер расположен между  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями. В соответствии с бивалентной моделью комплекс содержит 2 симметричных тетрамера состава  $\alpha\beta\gamma\epsilon$  и  $\alpha\beta\delta\epsilon$ , между которыми расположен  $\zeta$ -димер. Последняя модель в большей степени соответствует данным анализа молярного соотношения полипептидных цепей комплекса. В то же время суммарная молекулярная масса такого комплекса составляет около 300 кДа, что превышает ее расчетную (на основе второй модели) величину — 235 кДа.

TCR, содержащие антигенраспознающие димеры  $\alpha\beta$  и  $\gamma\delta$ , организованы сходным образом. Полипептидные цепи комплекса CD3 синтезируются в

избытке. Их сборка происходит в эндоплазматическом ретикулуме. При этом сначала формируется тетрамер, состоящий из одной  $\gamma$ , одной  $\beta$  и двух  $\epsilon$ -цепей, затем к нему присоединяется димер  $\alpha\beta$  или  $\gamma\delta$ . В аппарате Гольджи происходит их гликозилирование и полимер перемещается на мембрану, где к нему подсоединяется  $\zeta$ -димер. Экспрессия CD3 без включения антигенспецифического димера  $\alpha\beta/\gamma\delta$  невозможна и свободный комплекс CD3 остается в цитоплазме.

### 3.1.3.3. Корецепторы Т-клеток

В процесс распознавания Т-клетками антигена (точнее, комплекса антигенного пептида с молекулой МНС), наряду с антигенраспознающим рецепторным комплексом вовлекаются дополнительные молекулы. Наиболее важные из них — корецепторы CD4 и CD8. Назначение этих молекул состоит прежде всего в повышении сродства рецепторного комплекса к лиганду за счет дополнительного связывания корецепторов с молекулами МНС (отсюда обозначение молекул как корецепторов). Поскольку антигенный пептид может презентироваться Т-клетке в составе молекул МНС, относящихся к двум разным классам — I и II, в распознавании могут участвовать две разновидности корецепторов — CD8 и CD4. Молекула CD8 обладает сродством к МНС-I, а молекула CD4 — к МНС-II. Поскольку на зрелых Т-клетках экспрессирован либо CD4, либо CD8, антигенные пептиды в составе молекул МНС-I распознаются CD8<sup>+</sup> Т-клетками, а антигенные пептиды в составе молекул МНС-II — CD4<sup>+</sup> Т-клетками. Связывание корецепторов повышает сродство TCR к антигенному комплексу в 100 раз.

CD4 и CD8 — маркеры двух главных субпопуляций  $\alpha\beta$ Т-клеток — соответственно, Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов. Однако эти молекулы экспрессируются не только на клетках названных субпопуляций: CD4 в небольшом количестве выявляют на дендритных клетках и макрофагах, а CD8 — на естественных киллерах. На незрелых Т-клетках — кортикальных тимоцитах — оба корецептора экспрессируются одновременно (что определяет мембранный фенотип CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). В процессе дифференцировки происходит супрессия гена одного из корецепторов, тогда как второй продолжает экспрессироваться.

Структурно 2 типа корецепторов существенно отличаются друг от друга, хотя оба относятся к суперсемейству иммуноглобулинов. Их свойства отражены в табл. 3.4, а схемы строения представлены на рис. 3.11. Обе молекулы состоят из трансмембранных полипептидных цепей I типа, причем CD4 — мономер, а CD8 — димер.

Молекулярная масса CD4 — 56 кДа. Внеклеточная часть единственной цепи CD4 содержит 4 иммуноглобулиноподобных домена, из которых 2 построены по типу V-, а 2 других — по типу C-доменов иммуноглобулинов. Наружный домен содержит участок, отвечающий за взаимодействие с молекулами МНС-II. В этом же домене расположен рецепторный сайт для вируса ВИЧ-1 (остатки 31–57 и 81–94 домена V1). CD4 — основной рецептор для ВИЧ, поэтому клетками-мишенями этого вируса служат CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты — Т-хелперы, а также макрофаги и дендритные клетки.

Таблица 3.4. Характеристика корецепторов Т-клеток

Свойство	CD4	CD8
Полипептидные цепи	1	2 ( $\alpha\beta$ ). Встречается также гомодимер $\alpha\alpha$
Молекулярная масса, кДа	56	$\alpha\beta$ — 69 (32+37); $\alpha\alpha$ — 64 (32+32)
Внеклеточные домены	4 (суперсемейство иммуноглобулинов) — V—C—V—C	По одному (суперсемейство иммуноглобулинов) — V
Сродство к молекулам МНС	МНС-II (домен $\beta_2$ )	МНС-I (домен $\alpha_3$ )
Экспрессия на клетках	Т-хелперы, регуляторные Т-клетки, часть NKT- и $\gamma\delta$ Т-клеток; слабо — макрофаги, дендритные клетки	Цитотоксические Т-лимфоциты, часть $\gamma\delta$ Т-клеток и естественных киллеров
Функция	Повышение сродства к антигену-лиганду, формирование синапса, передача сигнала через Lck	Повышение сродства к антигену-лиганду, формирование синапса, передача сигнала через Lck

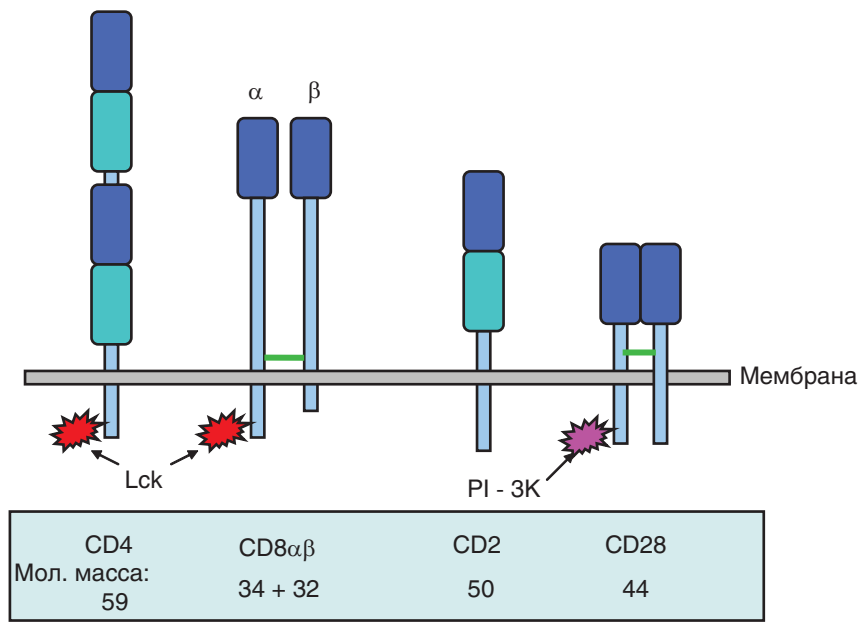


Рис. 3.11. Вспомогательные молекулы Т-лимфоцитов. Синим отмечены V-подобные домены, голубыми — С-домены; зеленые линии — дисульфидные связи, звездчатые фигуры — тирозинкиназы

Молекула CD8 — димер. На большинстве  $\alpha\beta$ Т-клеток CD8 — гетеродимер, образованный  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями, на некоторых Т-клетках, локализованных преимущественно в слизистых оболочках (у человека это исключительно  $\gamma\delta$ Т-клетки) — гомодимер  $\alpha\alpha$ . Значение существования двух типов гетеродимеров CD8 не установлено. Обе цепи CD8 сходны по размеру и строению. Их молекулярная масса составляет 34 кДа ( $\alpha$ ) и 32 кДа ( $\beta$ ). Во внеклеточной части цепи гомодимера образуют единственный иммуноглобулиноподобный домен, отделенный от мембраны длинным спейсерным участком. Цепи связаны нековалентно. С молекулой МНС-I взаимодействует  $\alpha$ -цепь.

Цитоплазматическая часть и CD4 и CD8 связана с тирозинкиназой Lck (семейство Src). Прочность связи увеличивается при распознавании комплекса антигенный пептид—молекула МНС в результате конформационных изменений корцептора. Киназа Lck играет важнейшую роль в передаче активационного сигнала от TCR (см. раздел 3.5.2.1). Таким образом, CD4 и CD8 участвуют не только в распознавании комплекса антигенного пептида и молекулы МНС, но и выполняют сигнальную функцию.

Еще одна функция корцепторов реализуется в процессе презентации антигена Т-лимфоцитам. Корцепторы вместе с молекулой Lck, в отличие от комплекса TCR-CD3, входят в состав рафтов — структурно-функциональных элементов мембраны, важных для формирования иммунного синапса — временной структуры, обеспечивающей эффективное распознавание антигена Т-клетками и формирование полноценного активационного сигнала. Уже на ранних стадиях активации Т-клеток в процессе презентации антигена между комплексом TCR-CD3 и корцепторами происходит нековалентное взаимодействие, что позволяет корцептору «ввести» рецепторный комплекс в состав рафта, тем самым обуславливая эффективность презентации (см. раздел 3.5.1.3.).

Наряду с проявлением усиливающих эффектов, корцепторы способны передавать супрессорные сигналы при распознавании антигена и последующей активации клеток. Супрессорный эффект проявляется, например, при изолированном перекрестном «сшивании» молекул корцепторов моноклональными антителами. На фоне такого связывания стимуляция через TCR вызывает апоптоз Т-лимфоцитов.

#### **3.1.4. Генетические основы формирования и перестройки генов антигенраспознающих рецепторов**

Рецепторы лимфоцитов распознают ориентировочно  $10^5$ – $10^6$  вариантов пространственных структур. Это означает, что в организме человека и других позвоночных должно существовать такое же количество вариантов белковых молекул — рецепторов для антигенов (причем как Т-, так и В-клеток). Из этого следует, что должно существовать около 1 000 000 генов, кодирующих эти структуры. Но общее число генов у человека составляет менее 30 000, т.е. на 2 порядка меньше, чем необходимо для кодирования рецепторного аппарата лимфоцитов по предложенной схеме (следует учесть, что в этом задействованы не все гены). В то же время показано, что на уровне генов и белковых молекул действительно существует очень большое число вариантов антигенраспознающих рецепторов и их вариативных генов. Так, у человека выявлено  $2,5 \times 10^7$  вариантов V-генов TCR, экспрес-

сируемых в каждом организме. Такое количество генов «не помещается» в одну клетку. Длительное время происхождение и размещение этого генетического разнообразия было неизвестно. Эти проблемы были решены в работах С. Тонегавы (*C. Tonegawa*) и его сотрудников, раскрывших механизм генерации разнообразия рецепторных генов путем их перестройки (рекомбинации) в созревающих лимфоцитах.

### 3.1.4.1. Формирование генов рецепторов лимфоцитов

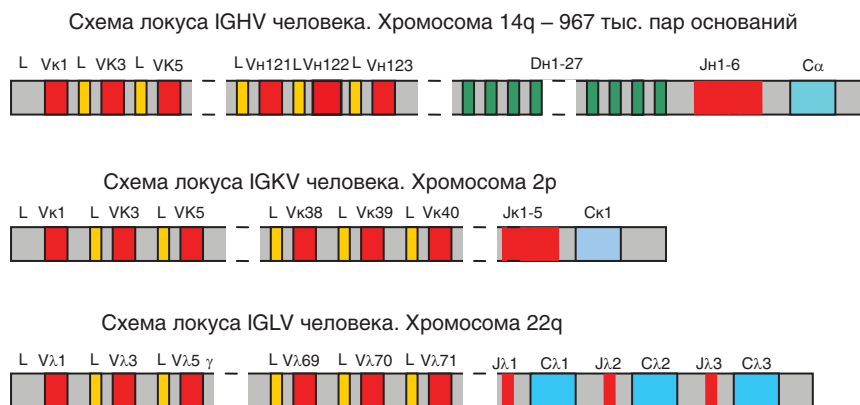
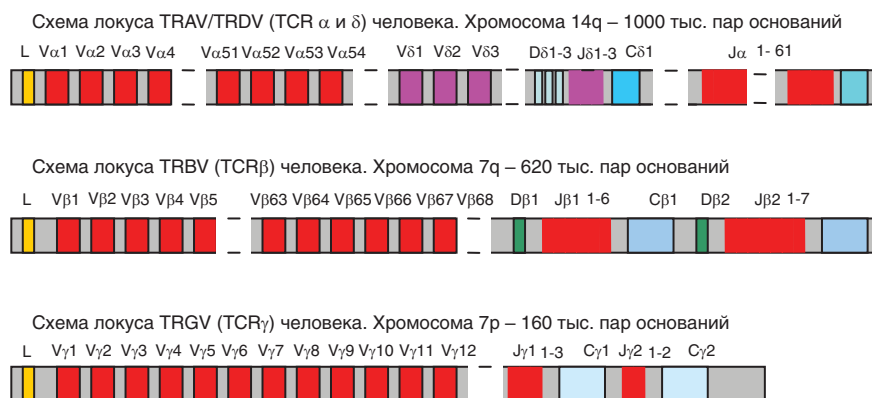
В геноме человека и млекопитающих выделяют 6 кластеров (скоплений) генов, кодирующих молекулы полипептидных цепей антигенраспознающих молекул — H-, κ- и λ-цепей иммуноглобулинов и α-, β- и γ- цепей TCR αβ- и γδ-типов (табл. 3.5, рис. 3.12 и 3.13). Последовательности, кодирующие δ-цепь TCR, расположены внутри гена α-цепи, но обычно их рассматривают как отдельный, 7-й генетический кластер. Гены человека обозначают прописными буквами — сначала буквы, обозначающие молекулу, в состав которой входит кодируемая цепь (*IG* или *TR*), затем название цепи в латинском эквиваленте (*H*, *K*, *L*, *A* и т.д.) и завершает обозначение тип кодируемого участка молекулы (вариабельный или константный — *V* или *C*). Например, ген *IGHV* кодирует вариабельный домен H-цепей иммуноглобулинов. Гены расположены на четырех хромосомах — 2 (κ), 7 (β, γ), 14 (H, α, δ) и 22 (λ).

Таблица 3.5. Характеристика генов, кодирующих антигенраспознающие рецепторы

Молекула	Цепь	Гены (V и C)	Хромосома	Размер гена, кбаз		Структура транс-крипта	Число сегментов			
				неперестроенного	перестроенного		V	D	J	C
Ig	H	IGH	14q	957	300	VDJC	45 (129)*	12	14	9
	κ	IGK	2p	Около 100	Нет данных	VJC	18 (40)	—	4	1
	λ	IGL	22q	98	Нет данных	VJC	30 (71)	—	4	4
TCRαβ	α	TRA	14q	Около 1000	1,7	VJC	45 (54)	—	61	1
	β	TRB	7q	680	1,3	VDJC	41 (65)	2	14	2
TCRγδ	γ	TRG	7p	160	1,6	VJC	6 (15)	—	5	2
	δ	TRD	14q	60	2,0	VDJC	3	3	4	4

\* Указано число функционирующих сегментов, в скобках — общее число сегментов, включая псевдогены.

В каждом кластере присутствуют гены, кодирующие константные домены — C-гены (в случае кластера *IGH* — 9, по числу изоформ H-цепей). В кластерах присутствуют также V-сегменты, кодирующие не весь вариабельный домен, а только 95–96 аминокислотных остатков, расположенных до участка CDR3. V-сегменты содержат около 300 пар оснований. Число V-сегментов, последовательно расположенных в 5'-части кластера, сильно

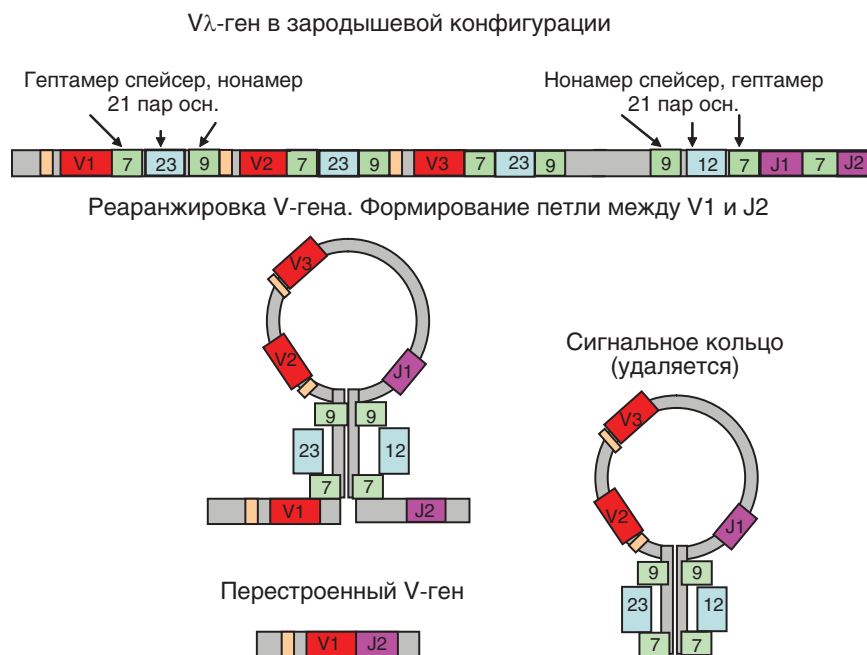
Рис. 3.12. Структура локусов иммуноглобулиновых генов (*IG*) человекаРис. 3.13. Структура локусов, кодирующих Т-клеточный рецептор (*TR*) человека

варьирует — от 3 (в *TRDV*) до 129 (в *IGHV*). Некоторые V-сегменты не экспрессируются (псевдогены), так что реальное число кодирующих генов значительно меньше (для *IGHV* — 45). V-сегменты и С-гены пространственно разобщены. Между ними на значительном расстоянии от V-сегментов расположены короткие сегменты — J (соединительные — от *Joining*), содержащие 35–50 пар оснований, а в некоторых кластерах (*H*, *B*, *D*) — также D-сегменты (от *Diversity*). Число сегментов J и D варьирует (J — от 4 до 61, D — от 2 до 12).

Между V-, D- и J-сегментами расположены рекомбинационные сигнальные последовательности (RSS — *Recombination signal sequences*). С 3'-конца («справа» — см. рис. 3.12 и 3.13) от V-гена расположена консервативная последовательность из 7 нуклеотидных остатков (гептамер) 5'CACAGTG3', далее — соединительный участок (спейсер), содержащий 12 или 23 основания, и нонамер (5'ACAAAAACCC3'). И гептамеры, и нонамеры имеют палиндромные последовательности (при считывании в обоих направлениях

они оказываются комплементарными). После участка с «нерегламентированной» последовательностью следует нонамер, участок из 23 или 12 оснований, гептамер и J- или D-сегмент. «Правило 12/23» соблюдается всегда: если правее (на 3'-конце) первого кодирующего участка (например, V) расположен 12-членный спейсер, то левее (на 5'-конце) второго участка (например, J) должен располагаться 23-членный спейсер, и наоборот. Последовательности рассмотренных участков для кластеров иммуноглобулиновых генов представлены на рис. 3.14. Кластеры генов TCR организованы аналогичным образом.

Приведенное выше строение кластеров рецепторных генов характерно для всех клеток, кроме зрелых лимфоцитов. Описанную конфигурацию генов называют зародышевой, и V-сегменты, кодирующие V-домен без 3-го гипервариабельного участка, также называют зародышевыми. В зрелых лимфоцитах эти участки организованы иначе — они содержат зрелый V-ген, кодирующий полный V-домен (образован за счет присоединения к зародышевому V-сегменту одного из DJ-сегментов). Описанные выше упорядоченные участки между сегментами V и DJ удаляются в результате глубокой перестройки структуры генетических кластеров, кодирующих рецепторные гены, называемой реаранжировкой (рекомбинацией) генов. Этот процесс происходит при дифференцировке в каждом лимфоците независимо, что приводит к формированию зрелого V-гена, уникального для данной клетки. Случайно отобранные V- и DJ-сегменты соединяются, при этом неиспользуемый генетический материал удаляется.



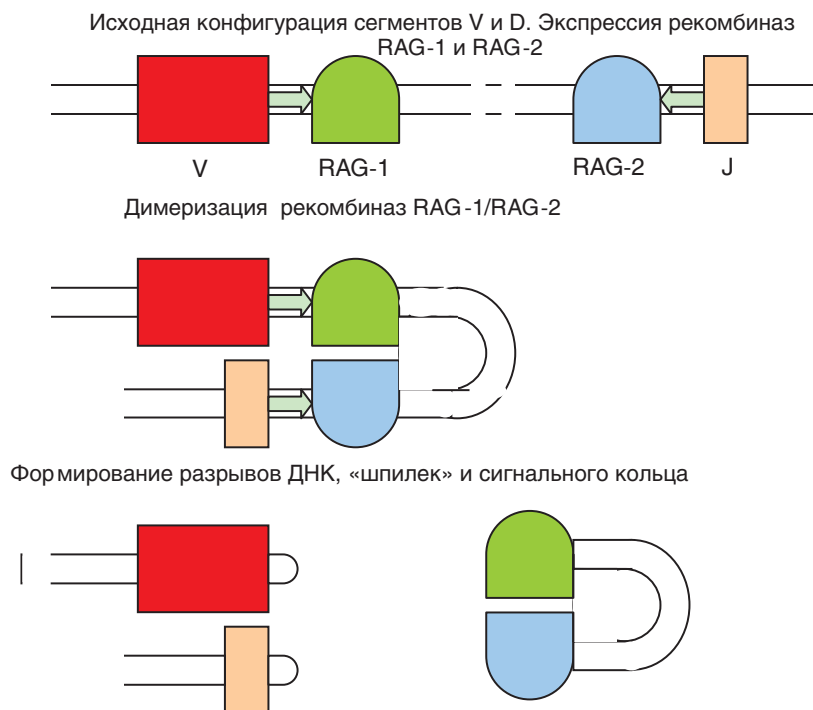
**Рис. 3.14.** Схема перестройки V-генов иммуноглобулинов на примере генов λ-цепи

Реаранжировка генов рецепторов лимфоцитов начинается с экспрессии под влиянием дифференцировочных стимулов генов **V(D)J-рекомбинационного комплекса**. Это комплекс содержит 6 компонентов:

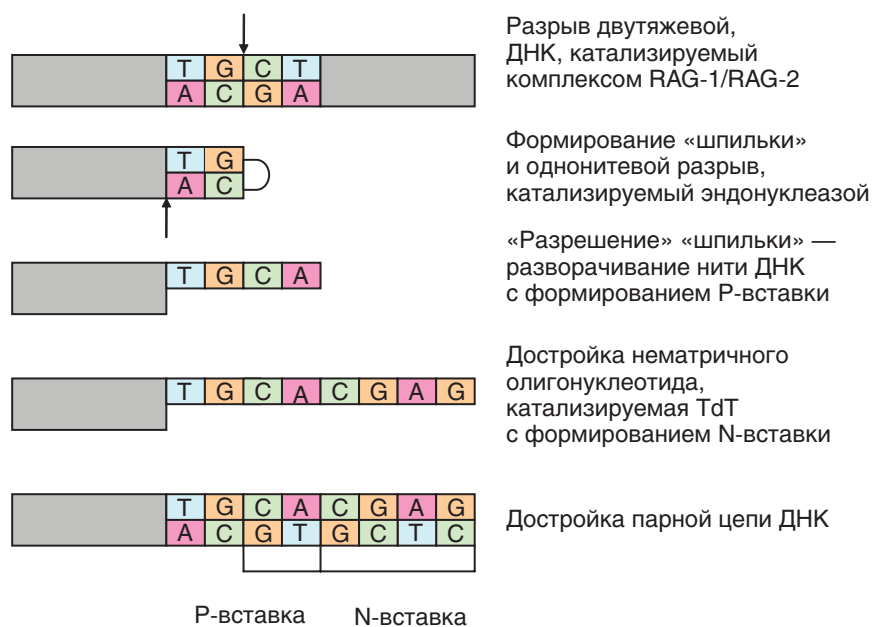
- димер рекомбиназ (экзонуклеаз) RAG-1/RAG-2;
- ДНК-зависимую протеинкиназу;
- ДНК-лигазу IV;
- терминальную дезоксинуклеотидилтрансферазу (TdT), кодирующую нематричный синтез олигодезоксинуклеотидов;
- гетеродимер HMG 1/2;
- гетеродимер Ku70/Ku80.

При наличии сегмента D (гены H-цепи иммуноглобулинов,  $\beta$ - и  $\delta$ -цепей TCR) сначала происходит перестройка на участке между D- и J-сегментами с формированием тандема DJ. Далее перестройка захватывает участок между V- и DJ-сегментами. В обоих случаях сначала происходит реорганизация пространства между перестраиваемыми участками с помощью RSS. Этот процесс начинается с экспрессии генов *RAG*. Молекулы RAG-1 и RAG-2 присоединяются к концам последовательностей 12 и 23 соединяемых участков гена. Затем субъединицы RAG димеризуются и происходит сближение связанных с ними участков. Этому способствует комплементарное взаимодействие пар гептамеров и нонамеров, основанное на палиндромности этих последовательностей (см. рис. 3.14). Этот процесс осуществляется с участием гетеродимера HMG1/2. В местах примыкания RSS к кодирующим последовательностям происходит разрыв двух нитей ДНК (он катализируется рекомбиназой RAG), причем не в точно определенной позиции, а с возможными отклонениями в несколько нуклеотидных остатков. Разорванные нити ДНК замыкаются друг на друга. В результате формируется «шпилька», в которой ведущая нить ДНК переходит в комплементарную ей нить (рис. 3.15). Вырезанный отрезок, содержащий RSS, замыкается при соединении разорванных нитей. В результате формируется кольцевая структура — рекомбинационное вырезанное кольцо (REC — от *Recombination excision circle*).

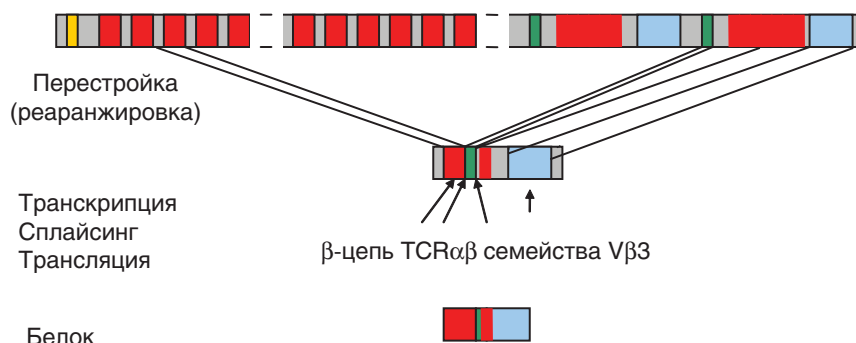
На следующем этапе происходит «разрешение» шпилек с обеих сторон от места разрыва: при участии ДНК-зависимой протеинкиназы эндонуклеаза повторно разрывает ДНК, но не на вершине «шпилеки», а сбоку, образуемые при этом отрезки ДНК различаются по длине. Более длинная нить разворачивается, и на ней комплементарно достраивается вторая. Описанные события приводят к появлению в составе ДНК новой последовательности, палиндромной по отношению к исходной. Такую последовательность называют «Р-вставка» (от *Palindromic*) (рис. 3.16). В этот же очень короткий промежуток времени с участием TdT происходит добавление на свободных концах ДНК олигонуклеотида случайного состава. Поскольку синтез этого олигонуклеотида происходит не на матрице ДНК, такой вариант вставки называют N-вставкой (от *Non-template*). Протяженность N-вставок не превышает 20 нуклеотидов (обычно меньше 10). Только после этого происходит воссоединение нитей ДНК с 5'- и 3'-концов. В процессах репарации ДНК участвуют ДНК-лигаза IV, ДНК-зависимая протеинкиназа и димер Ku70/Ku80. На этом процесс реаранжировки конкретного гена завершается. Сформированный



**Рис. 3.15.** Роль рекомбиназ RAG-1 и RAG-2 в начальных событиях перестройки V-генов



**Рис. 3.16.** Образование Р- и N-вставок при реаранжировке V-генов



**Рис. 3.17.** Схема перестройки V-генов T-клеточного рецептора на примере генов β-цепи. На рисунке в общих чертах отражены результаты перестройки рецепторных генов на уровне РНК и белка

зрелый ген может транскрибироваться. После сплайсинга мРНК с нее транслируется белок — цепь иммуноглобулина или молекулы TCR (рис. 3.17).

Описанные процессы происходят в 3'-концевой части V-гена — в участке, сформированном при участии DJ-сегментов. Эта область соответствует третьему гипервариабельному участку — CDR3. В результате этот участок значительно превосходит по вариабельности CDR1 и CDR2, структура которых при реаранжировке V-генов не изменяется.

Реаранжировка происходит с соблюдением правил, обеспечивающих высокую упорядоченность этого сложного процесса. Прежде всего, запуск перестройки V-генов в кластерах, кодирующих антигенраспознающие структуры BCR и TCR, происходит под влиянием дифференцировочных сигналов. Лишь «подготовительная» перестройка в регионе D- и J-сегментов может проходить в других клетках (кроме T- и B-лимфоцитов), например в естественных киллерах, родственных по своему происхождению T-лимфоцитам. Перестройка конкретного V-гена всегда начинается в одной хромосоме. При ее успешном завершении прекращается экспрессия генов *RAG*, что означает прекращение перестройки (ген на второй хромосоме остается неперестроенным и не функционирует). Неудачи при реаранжировке генов чаще всего связаны со сдвигом рамки считывания, происходящим в 2/3 случаев. При подобном нарушении перестраивается V-ген на другой хромосоме аллельной пары. При успешном завершении реаранжировки он оказывается единственным функционирующим геном. Таким образом происходит «аллельное исключение», т.е. достигается моноспецифичность антигенраспознающих рецепторов. Поскольку в лимфоците всегда присутствует только 1 полноценно перестроенный ген, аллельное исключение затрагивает и C-гены. Именно поэтому иммуноглобулиновые рецепторы лимфоцитов однородны также по изотипу и аллотипу. При неудачной перестройке генов иммуноглобулинов на обеих хромосомах клетка погибает путем апоптоза. Это происходит примерно в 45% случаев.

Все антигенраспознающие рецепторы состоят из 2-х типов цепей, участвующих в формировании активного центра рецептора. Перестройке

подвергаются V-гены всех цепей, формирующих клеточный рецептор, но не одновременно, а последовательно: в В-клетках сначала перестраиваются гены H-, а затем — L-цепей; в  $\alpha\beta$ T-клетках — сначала гены  $\beta$ -, а затем  $\alpha$ -цепей. Только в  $\gamma\delta$ T-клетках перестройка V-генов  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепей происходит почти одновременно. Условия перестройки 1-й цепи, как правило, более жесткие, чем аналогичные условия для 2-й цепи. Сначала перестраиваются V-гены  $\kappa$ -, а затем  $\lambda$ -цепей; при этом в каждом случае последовательно перестраиваются гены сначала на одной, а потом на другой хромосоме. Именно поэтому вероятность успешной перестройки увеличивается в 2 раза. Кроме того, гены кластера  $\kappa$ -цепей *IGK* организованы таким образом, что содержат 3 C-гена со своими J-сегментами. Один и тот же V-ген может повторно объединиться с разными J-сегментами. В  $\alpha\beta$ T-клетках перестройка гена  $\alpha$ -цепи сначала проходит так же, как предшествовавшая перестройка гена  $\beta$ -цепи. Однако при неудачной повторной перестройке  $\alpha$ -гена происходит запуск механизмов редактирования — ген *RAG* экспрессируется повторно и перестраивается другой зародышевый V $\alpha$ -сегмент, не попавший ранее в эксцизионное кольцо. Этот процесс может повторяться до образования функционального гена легкой цепи. В результате потери клеток при реаранжировке генов второй цепи рецептора значительно ниже, чем при перестройке гена первой цепи. Редактирование гена  $\alpha$ -цепи может происходить даже в периферическом отделе иммунной системы, например, при распознавании T-клеткой аутоантигена или при беременности. Если перестраивается ген  $\alpha$ -цепи, находящийся в зародышевой конфигурации во второй хромосоме, может возникнуть ситуация, нарушающая аллельное исключение. В этом случае в одной T-клетке будет присутствовать 2 разных TCR с одинаковой  $\beta$ - и разными  $\alpha$ -цепями.

Хуже всего изучены механизмы выбора T-клеткой формирования рецепторов  $\gamma\delta$ - или  $\alpha\beta$ -типов. Перестройка генов *TRBV*, *TRGV* и *TRDV* начинается практически одновременно. Перестройка V-генов  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепей завершается экспрессией мембранного рецептора в комплексе с CD3, а перестройка V-гена  $\beta$ -цепи — экспрессией «временного» пре-T-рецептора; при ее успехе запускается реаранжировка гена  $\alpha$ -цепи. Экспрессия  $\gamma\delta$ - или пре-T-рецепторов служит источником сигналов (соответственно, сильного и слабого), блокирующих экспрессию рецептора альтернативного типа. При определении, какой из рецепторов будет экспрессирован, важную роль играют ингибирующие участки промоторов — сайленсеры, подавляющие активность других генов. Установлена активность сайленсеров, локализованных в генах  $\gamma$ -цепей и подавляющих экспрессию этого гена и, следовательно, формирование TCR $\gamma\delta$ -типа. Выбор между линиями дифференцировки T-лимфоцитов в  $\alpha\beta$ - и  $\gamma\delta$ -клетки происходит до перестройки гена  $\alpha$ -цепи. После его перестройки возврат на  $\gamma\delta$ -путь становится невозможным в связи с делецией гена  $\delta$ -цепи (он попадает в эксцизионное кольцо при реаранжировке  $\alpha$ -гена). На разных этапах онтогенеза срабатывают механизмы, обеспечивающие предпочтительность формирования TCR разных типов:  $\gamma\delta$  — в эмбриогенезе,  $\alpha\beta$  — после рождения. Действительно, у взрослых даже при наличии перестроенных генов  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепей перестройка гена  $\beta$ -цепи направляет развитие клетки в сторону  $\alpha\beta$ T-лимфоцитов.

Описанные процессы повышают вариабельность рецепторных V-генов в разной степени. Во-первых, вариабельность этих генов заложена в их зародышевой конфигурации. При наличии 30–40 вариантов зародышевых V-генов (что соответствует действительности для цепей, образующих TCR  $\alpha\beta$ -типа и иммуноглобулины) комбинирование V-доменов двух цепей при построении антигенсвязывающего участка приводит к формированию 1000–1500 вариантов клеточных рецепторов (т.е. в 1000 раз меньше, чем необходимо для распознавания всего множества антигенов). Комбинация различных зародышевых V- и J- (а для половины цепей — еще и D-) сегментов повышает эту величину на 1–2 порядка. При этом необходимо учитывать неточную локализацию разрывов цепей ДНК V-, D- и J-сегментов при реаранжировке генов, а также наличие P- и N-вставок. Наконец, к троекратному увеличению вариабельности приводит смещение рамки считывания в D-сегменте. По некоторым данным, суммарная вариабельность антигенраспознающих участков достигает для BCR  $10^{12}$ – $10^{17}$ , для TCR $\alpha\beta$  —  $10^{16}$ – $10^{19}$ , для TCR $\gamma\delta$  —  $10^{12}$ – $10^{17}$  вариантов (табл. 3.6). Очевидно, что в полной мере такая вариабельность не может быть реализована (общее число клеток в организме человека составляет  $10^{13}$ – $10^{14}$ , из них менее  $10^{12}$  — лимфоидные). Реальное число клонов Т-клеток, отражающее число вариантов антигенраспознающих участков TCR, составляет  $2,5 \times 10^7$ , что заведомо превышает число объектов распознавания. Таким образом, процесс реаранжировки V-генов успешно решает задачу генерации разнообразия антигенраспознающих структур лимфоцитов.

**Таблица 3.6.** Источники разнообразия антигенраспознающих рецепторов

Источник вариабельности	H	κ	λ	α	β	γ	δ
Число функционирующих V-сегментов	45	18	30	45	41	4–6	3
Число вариантов D-сегментов	14	—	—	—	2	—	2
Число вариантов J-сегментов	12	4	4	45	41	3	2
Неточность разрывов-соединений нити ДНК	+	+	+	+	+	+	+
Использование 3-х рамок считывания D-сегмента	+	—	—	—	++	—	—
N- и P-нуклеотиды	++	+	+	+	++	+	++
Число комбинаций V(D)J	$10^4$			$10^3$		70	
Число комбинаций цепей	$10^7$			$10^{11}$		$10^6$	
Всего вариантов	$10^{14}$			$10^{16}$		$10^9$	

Вследствие полной независимости в каждой лимфоидной клетке описанных процессов структура зрелых V-генов в каждом лимфоците уникальна (вероятность повторения этой структуры  $10^{-17}$ – $10^{-19}$ , т.е. фактически равна нулю). Именно поэтому формирующиеся  $10^7$ – $10^8$  вариантов V-генов распределены во всей популяции лимфоцитов. Таким образом, геном лимфоидных клеток отличается от генома других соматических клеток структурой генетических кластеров, кодирующих антигенраспознающие

молекулы. Кроме того, этими же особенностями различаются В-,  $\alpha\beta$ T- и  $\gamma\delta$ T-клетки.

### 3.1.4.2. Соматический мутагенез V-генов иммуноглобулинов

В формирование разнообразия антигенраспознающей способности иммунорецепторов вносит вклад еще один процесс, реализуемый на генетическом уровне — усиленный соматический мутагенез. Он происходит в популяции В-лимфоцитов при иммунном ответе, а не при дифференцировке В-клеток и имеет отношение не только к специфичности, но и к аффинности антител, секретируемых потомками В-лимфоцитов — плазматическими клетками.

Гипермутагенез наблюдают только в активированных и пролиферирующих В-клетках в зародышевых центрах (В-центробласты) после переключения изотипов с IgM на последующие классы. Он происходит на пике Т-зависимого иммунного ответа: гипермутагенез регистрируют с 8-х суток после иммунизации и достигает максимума на 12-е сутки. В плазматических клетках гипермутагенез не выявляется.

Усиление мутагенеза затрагивает только V-домен, а в нем — преимущественно регион CDR3. Частота мутаций при гипермутагенезе возрастает на 3–4 порядка (с  $10^{-6}$ – $10^{-7}$  до  $10^{-2}$ – $10^{-3}$ ), достигая в регионе CDR3 2,5–3% (т.е. при каждом делении клетки происходит изменение 3 из 100 оснований).

Развитие гипермутационного процесса связывают с проявлением активности фермента — индуцируемой активацией **дезаминазы цитидина**, кодируемой геном *AID* (*Activation-induced cytidine deaminase*). Этот ген экспрессируется в делящихся В-лимфоцитах зародышевого центра. Названный фермент дезаминирует остатки цитидина в одноцепочечной ДНК до дезоксиуридина, что первоначально приводит к формированию мутации С→Т (замена цитозина на тимин), а на последующих фазах процесса — большого количества точечных соматических мутаций типа трансцизий (превращений внутри одного класса нуклеотидов).

Большинство мутаций нарушают способность антител связываться с антигеном. Однако при таком высоком темпе мутаций неизбежно возникают изменения структуры активного центра антител, повышающие его сродство к антигенному эпитопу. Такие варианты отбираются и служат основой феномена **созревания аффинитета** (см. раздел 3.6.2.2).

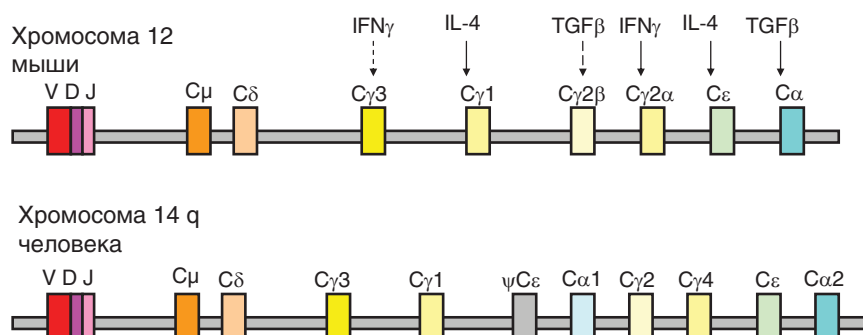
### 3.1.4.3. Переключение константных генов иммуноглобулинов

В кластере генов *IGH* присутствует несколько С-генов, экспрессируемых в определенной последовательности в комбинации с одним и тем же V-геном благодаря особому механизму переключения (рис. 3.18). Это служит молекулярной основой изотипического разнообразия иммуноглобулинов и последовательной смены их классов при активации и антигензависимой дифференцировке В-лимфоцитов.

Последовательность расположения С-генов в кластере *IGH* такова (см. рис. 3.18):

- у мышей — С $\mu$ , С $\delta$ , С $\gamma$ 3, С $\gamma$ 1, С $\gamma$ 2b, С $\gamma$ 2a, С $\epsilon$ , С $\alpha$ ;
- у человека — С $\mu$ , С $\delta$ , С $\gamma$ 3, С $\gamma$ 1, С $\alpha$ 1, С $\gamma$ 2, С $\gamma$ 4, С $\epsilon$ , С $\alpha$ 2.

У человека между С $\gamma$ 1 и С $\alpha$ 1 расположен псевдоген, гомологичный С $\epsilon$ . С учетом этого можно предположить, что расположение и набор С-генов у



**Рис. 3.18.** Локализация константных генов иммуноглобулинов на хромосоме и роль цитокинов в переключении на конкретные изотипы

человека отражает последствия дупликации (Cγ3, Cγ1, ψCε, Cα1 и Cγ2, Cγ4, Cε, Cα2 представляют гомологичные наборы генов).

В наивных В-клетках при экспрессии генов кластера *IGH* информация считывается с генов *IGHV*, *IGHCM* и *IGHCD*. В результате сплайсинга из мРНК удаляется интрон, расположенный между генами V и Cμ и формируется мРНК, кодирующая μ-цепь, или удаляются упомянутый интрон и участок, кодирующий μ-цепь, и формируется мРНК, кодирующая δ-цепь. В конечном счете одновременно синтезируются IgM и IgD, одновременно экспрессируемые на поверхности наивной зрелой В-клетки.

Переключение изотипов Н-цепей запускается в процессе иммунного ответа. Для этого необходимо взаимодействие с Т-клетками, реализуемое через молекулы CD40 и CD154, а также при помощи цитокинов. Основную роль в переключении играет последовательность S (от *switch* — переключение), расположенная после V-гена и перед каждым С-геном, кроме Cδ. S-последовательность имеет состав — GAGCT или GGGGGT. Переключению предшествует ее полимеризация (до 150 повторов). Одновременно происходит реорганизация хроматина с повышением доступности для ферментов участков, вовлекаемых в переключение. Происходит сближение полимерных участков S и формируется петля, в которую попадают С-гены, расположенные между V-геном и «избранным» для экспрессии С-геном. Полимеризация S-сайтов делает их чувствительными к ДНКазе (эндонуклеазе) осуществляющей двунитевые разрывы. Свободные концы сближаемых участков немедленно воссоединяются. Важно отметить, что разные С-гены соединяются с одним и тем же V-геном — единственным, присутствующим в данной В-клетке, т.е. специфичность антител разных классов, продуцируемых данной клеткой, не изменяется. Процесс переключения изотипов проиллюстрирован на рис. 3.19.

Обычно переключение — необратимый процесс, поскольку при этом происходит утрата материала, попадающего в вырезаемую петлю. Есть единичные данные об обратимости переключения, что позволяет допустить существование альтернативных механизмов переключения без утраты промежуточных генов. Так, считают, что может формироваться транскрипт,

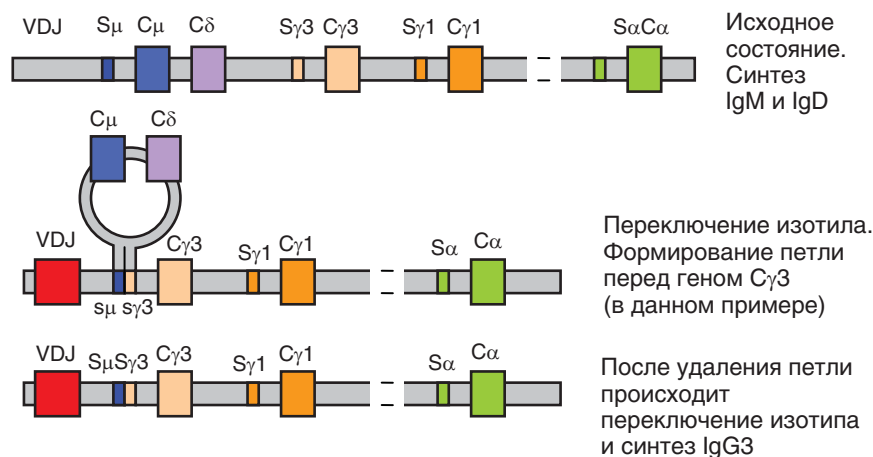


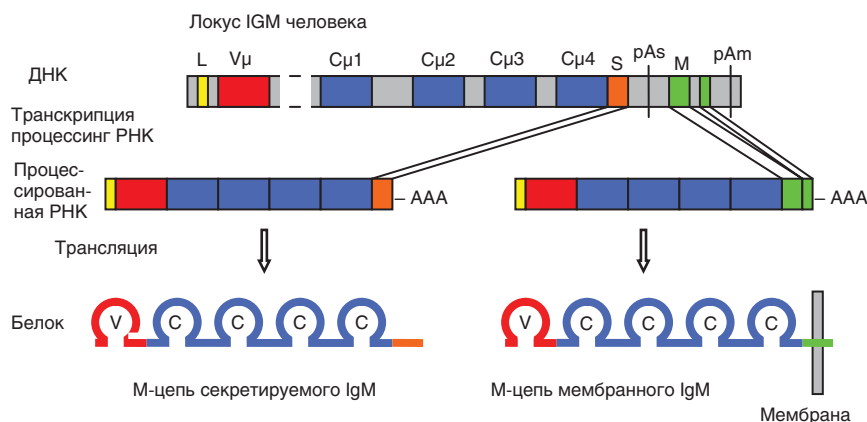
Рис. 3.19. Молекулярно-генетические основы переключения изотипов

содержащий продукт сразу нескольких С-генов, при этом последовательности, кодирующие «ненужные» С-гены, удаляются процессингом.

Для переключения необходимо действие цитокинов, секретируемых в основном Т-хелперами. Именно поэтому переключение изотипов происходит преимущественно при Т-зависимом иммунном ответе. На схеме (см. рис. 3.18) отражено дифференцированное действие цитокинов при переключении на различные изотипы иммуноглобулинов. Особенно четко роль цитокинов в переключении изотипов показана для иммуноглобулинов мыши. Известно, что IL-4 обеспечивает переключение на IgG1 и (особенно специфично) на IgE, а  $IFN\gamma$  — на IgG2a (с меньшей определенностью — на IgG3). Еще один цитокин — трансформирующий фактор роста  $\beta$  ( $TGF\beta$ ) — способствует переключению на IgA и, вероятно, на IgG2b. У человека подобные закономерности проявляются менее четко, хотя не вызывает сомнений роль IL-4 в переключении на IgE. Проявление действия цитокинов на пост-транскрипционном уровне будет рассмотрено ниже.

#### 3.1.4.4. Переключение синтеза с мембранных на секретируемые иммуноглобулины

С 3'-конца к С-генам иммуноглобулинов примыкает сегмент SC (*Secretory C-exon*), за которым следует 2 сегмента MC (*Membraneous C-exons*). Сегмент SC кодирует С-концевой участок растворимого иммуноглобулина (антитела), сегменты MC — С-концевой участок мембранного иммуноглобулина (рецептора). После сегмента SC и второго сегмента MC расположены участки полиаденилирования (поли-А), служащие сигналом для окончания транскрипции. При синтезе мембранного иммуноглобулина считываются и SC- и MC-участки. Процессинг мРНК приводит к удалению участка, кодируемого сегментом SC. Образующийся белок содержит гидрофобную последовательность, кодируемую сегментом MC, что позволяет ему встраиваться в мембрану. При переключении на синтез растворимых антител в процессе дифференцировки плазматических (антителообразующих) клеток терминирующая последовательность поли-А располагается после сегмента SC, в связи с чем сегменты MC не транскрибируются. Образуется РНК,



**Рис. 3.20.** Переключение синтеза иммуноглобулинов с мембранного на секреторный тип (на примере  $\mu$ -цепи)

кодирующая растворимый белок (антитело), лишенный гидрофобной последовательности. При этом как специфичность, так и свойства С-доменов у растворимой и мембранной форм антитела совпадают. Процесс переключения проиллюстрирован на рис. 3.20. Как правило, при переходе к образованию секретируемой формы иммуноглобулинов повышается интенсивность их синтеза. Это связано с дифференцировкой В-лимфоцитов в плазматические клетки с развитым аппаратом синтеза белка.

## 3.2. АНТИГЕНЫ

Антигенами называют молекулы, способные вызывать иммунный ответ, т.е. комплекс реакций, направленных на их удаление из внутренней среды организма. Антигены — это не особый класс соединений: ими могут быть белки и некоторые другие макромолекулы (например, полисахариды), в том числе комплексированные с любыми химическими структурами. Антигенность молекулы определяется ее способностью вызывать реакцию иммунной системы организма (подобно пахучим веществам — любым соединениям, воспринимаемым органами обоняния). Таким образом, отношение вещества к антигенам определяется не на основании его объективных характеристик, а исходя из его способности вызывать реакцию иммунной системы данного конкретного организма (т.е. как бы «с точки зрения» иммунной системы). Более того, комплексы признаков, которыми должен обладать антиген «с точки зрения» В- и Т-лимфоцитов, существенно различаются. Все это осложняет изучение антигенов, в том числе и в практическом аспекте.

### 3.2.1. Антигены, распознаваемые В-клетками, и их взаимодействие с антителами

В этой главе вначале будут рассмотрены базовые представления о природе антигенов, сложившиеся на основе изучения их способности индуцировать выработку антител и взаимодействовать с ними. Эти представления

лежат в основе учения об антигенах, распознаваемых В-лимфоцитами, поскольку антигенраспознающие структуры этих клеток — мембранные иммуноглобулины. Наиболее важные свойства, которыми должен обладать антиген, распознаваемый В-лимфоцитами, — чужеродность, иммуногенность и специфичность.

### 3.2.1.1. Чужеродность антигенов

Основная функция иммунной системы состоит в защите организма от биологической агрессии, исходящей, как правило, извне от патогенов и их продуктов, чужеродных для макроорганизма. Эндогенная агрессия в виде развития опухолей тоже часто связана с приобретением собственными клетками организма определенных черт чужеродности.

Ранее в качестве маркеров чужеродности рассматривали именно антигены. В настоящее время более значимыми носителями признаков чужеродности считают РАРР, поскольку именно они ответственны за включение процессов, составляющих основу иммунной защиты. Соответствие между РАРР (отвечают за активацию врожденного иммунитета) и антигенами (отвечают за запуск адаптивного иммунитета) не до конца выяснено. В ряде случаев одна и та же молекула сочетает в себе свойства РАРР и антигена, в других случаях в роли РАРР и антигена выступают разные молекулы патогенов.

В любом случае чужеродные молекулы можно рассматривать как маркеры клеток, потенциально опасных для организма. Эти молекулы служат наиболее ранним сигналом опасности, распознаваемым задолго до проявления патогеном своих вредоносных качеств. Таким образом, эволюция избрала косвенный путь выявления потенциально опасных агентов по их чужеродности для данного организма. Это послужило основанием для определения антигенов, данного Р.В. Петровым: **антигены — это биологические тела и молекулы, несущие признаки чужеродной генетической информации.** Поскольку чужеродность проявляется относительно конкретного организма, молекула, воспринимаемая как антиген одним организмом, может не восприниматься в качестве такового другим организмом.

Связь антигенности с чужеродностью макромолекулы для данного организма наглядно проявляется при оценке иммуногенности гомологичных белков. Иммуногенность возрастает по мере увеличения «эволюционного расстояния» между донором и реципиентом белка. В основе повышения иммуногенности лежит увеличение различий в первичной структуре белков. Эти закономерности используют при серологической оценке степени эволюционного родства видов.

Даже единичные замены аминокислот, лежащие в основе внутривидового антигенного полиморфизма (в частности, в системе гистосовместимости), эффективно распознаются с помощью антител, особенно при аллоиммунизации (т.е. иммунизации материалом от генетически неидентичных особей того же вида). Комбинация достаточно большого числа полиморфных генов (особенно высокополиморфных генов гистосовместимости) обеспечивает биологическую индивидуальность, которая проявляется, в частности, в отторжении тканей при аллотрансплантации. По этой же причине, хотя и не во всех случаях, организм распознает неоантигены, возникающие вследствие мутаций.

Однако чужеродность — не абсолютная характеристика антигена. Об этом свидетельствует возможность образования **аутоантител**, т.е. антител к собственным молекулам организма (см. раздел 4.4.1). В тех случаях, когда в качестве аутоантигенов выступают компоненты тканей, в норме изолированных от иммунной системы («забарьерные ткани»), нарушения общего принципа чужеродности не происходит, поскольку для иммунной системы эти ткани «чужие». В других случаях аутоантитела образуются в ответ на действие чужеродных молекул, имеющих структурное сходство с аутологичными компонентами. Эти антитела взаимодействуют как с чужеродным иммуногеном, так и с аутоантигеном. Так бывает, например, при стрептококковой инфекции, при которой образуются антитела к микробным полисахаридам, реагирующие также с антигенами собственной соединительной и эпителиальной тканей. Однако выявляют также истинную реакцию иммунной системы на собственные антигены. Это происходит не только при патологии (нарушение условий презентации антигена лимфоцитам, дефекты селекции лимфоцитарных клонов, дефицит регуляторных клеток и т.д.), но и в норме.

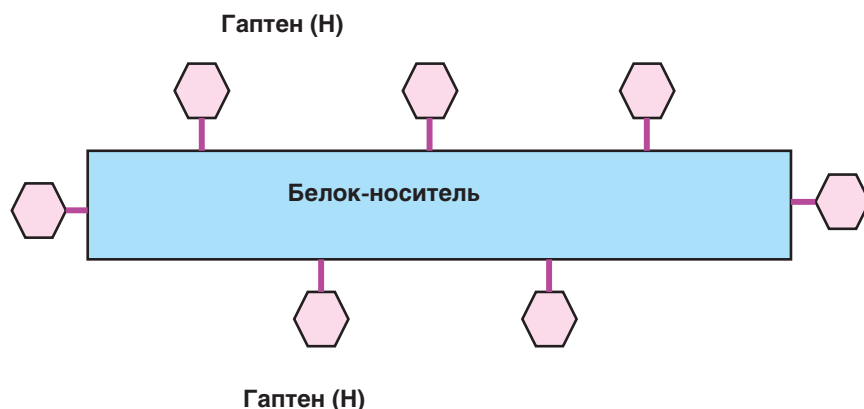
В организме всегда присутствуют многочисленные аутоантитела, взаимодействующие с собственными молекулами организма. Такие антитела продуцируются в основном В1-клетками (см. раздел 3.3.1.3). Эти антитела обладают низким сродством к антигенам, часто полиспецифичны; они не способны активировать некоторые эффекторные механизмы врожденного иммунитета (например, разрушение носителя антигена фагоцитом). В связи с этим такие аутоантитела не повреждают ткани, а напротив, выполняют ряд важных функций (транспорт макромолекул, элиминацию отработавших молекул и другие гомеостатические функции). Функционально важную группу аутоантител образуют антитела к идиотопам иммуноглобулинов (анти-антитела). Они копируют конфигурации антигенных эпитопов, служа их «внутренними образами» и играют определенную роль в регуляции иммунного ответа (см. разделы 3.1.1.3 и 3.6.6.3).

### 3.2.1.2. Иммуногенность антигенов

Иммуногенность определяет способность антигена вызывать иммунный ответ независимо от его специфичности. Биологической основой для проявления этого свойства антигенов служат те механизмы развития иммунного ответа, которые предполагают участие, помимо лимфоцитов, определяющих специфическую компоненту реакции, некоторых вспомогательных клеток, а также кооперацию различных типов лимфоцитов. Способность чужеродных веществ запускать весь необходимый клеточный ансамбль и составляет основу их иммуногенности. Иммуногенность антигенов зависит не только от свойств молекул, но и от пути и режима их введения в организм, а также дополнительных воздействий (например, использования адъювантов).

#### *Структурно-химические основы иммуногенности*

Антигенами могут быть белки и углеводы. Липиды, нуклеиновые кислоты и другие органические вещества (в некоторых случаях — также неорганические, например, некоторые металлы) эффективны лишь в составе комплексных соединений (например, в комплексе с белками), определяя при этом не иммуногенность, а специфичность антигена (т.е. выполняя



**Рис. 3.21.** Схема строения комплекса гаптен-белок-носитель (по К. Ландштейнеру)

роль эпитопа). Использование конъюгатов низкомолекулярных соединений (гаптен-белок-носитель), введенное в научную практику К. Ландштейнером, сыграло ключевую роль в изучении свойств антигенов и индуцируемых ими антител. В частности, с помощью конъюгатов было показано, что специфичность антигена определяется преимущественно гаптеном, а иммуногенность — носителем. С позиций современной иммунологии, предполагающей необходимость кооперации вовлекаемых в тимусзависимый иммунный ответ В-лимфоцитов с Т-хелперами, иммуногенность обусловлена преимущественно способностью антигена активировать Т-хелперы. Важным условием развития иммунного ответа служит предварительная активация дендритных клеток в результате распознавания ими РАР. Именно поэтому следует признать, что иммуногенность молекул антигена во многом определяется наличием в их составе РАР, т.е. их способностью сформировать при поступлении в организм «провоспалительный фон».

Важнейшее качество, определяющее иммуногенность антигенов, — размер молекулы. С повышением молекулярной массы полимерных молекул увеличивается их иммуногенность. Для полисахаридов это правило срабатывает только в ограниченной степени. Универсальной шкалы зависимости иммуногенности от молекулярной массы не существует. Для углеводов минимальный размер молекулы, обладающей иммуногенностью, больше, чем для белков. Минимальный размер белковой молекулы, вероятно, определяется появлением  $\alpha$ -спиральной структуры (7–10 аминокислотных остатков), однако он варьирует в зависимости от конкретного состава молекулы. Минимальная описанная молекулярная масса иммуногенной молекулы составляет 450 Да (арсанил-N-ацетил-DL-тирозин). При переходе от мономерной формы флагеллина (40 кДа) к полимерной (20 000 кДа) титры антител возрастают на 2 порядка. Для углеводов граница между низкой и высокой иммуногенностью расположена на уровне молекулярной массы в десятки килодальтон: полимер декстрана массой 52,3 кДа — слабо иммуногенен, а массой 90,7 кДа вызывает достаточно сильный ответ. Число

антителообразующих клеток в селезенке при иммунизации полимерами пневмококкового полисахарида массой 220, 121 и 40 кДа различается примерно на порядок (со снижением молекулярной массы уровень ответа убывает).

Помимо формирования структур, определяющих иммуногенность (например,  $\alpha$ -спирали для белков), размер молекулы важен и для увеличения числа групп (эпитопов), распознаваемых рецепторами лимфоцитов, т.е. для повышения валентности антигена. Значение этого фактора наиболее четко проявляется при использовании конъюгатов, содержащих различное число гаптенных групп. С повышением числа идентичных групп иммуногенность конъюгата растет, даже если его размеры не увеличиваются. После достижения определенной эпитопной плотности дальнейшее возрастание иммуногенности с увеличением числа эпитопов прекращается и может наблюдаться даже снижение иммуногенности вследствие стерических помех, создаваемых расположением эпитопов, их взаимной маскировки и блокады факторов, определяющих иммуногенность.

Влияние валентности на иммуногенность связано также с разнообразием эпитопов, присутствующих на молекуле. Установлено, что молекула приобретает иммуногенность только при достаточном разнообразии ее структуры. Так, поли-L-лизин иммуногенен только для ограниченного числа животных, например, для некоторых линий морских свинок. Однако введение в состав этой молекулы боковых цепей или чередование лизина с другими остатками в составе основной цепи делает полимер иммуногенным практически для любых животных.

Наконец, роль размера молекулы в проявлении ее иммуногенности можно проиллюстрировать на примере молекулярных агрегатов. Их высокая иммуногенность в значительной степени обусловлена тем, что они активно фагоцитируются, что важно для процесса обработки антигена и его представления (презентации) Т-хелперам.

Иммуногенность антигенов зависит от жесткости их структуры, т.е. способности сохранять определенную конфигурацию. Стабилизации конформации способствует наличие ароматических заряженных полярных аминокислотных остатков. Так, молекула желатина, утратившая жесткость конформации в результате обработки, практически не иммуногенна, но приобретает иммуногенность после введения в ее состав ароматических аминокислот. Наоборот, гидрофобные остатки в большом количестве препятствуют формированию  $\alpha$ -спирали и стабилизации конформации молекул. Чрезмерную гибкость придают полимерам остатки пролина, особенно повторяющиеся. В обоих случаях снижение жесткости молекул сопровождается ослаблением их иммуногенности. Однако при распознавании антигенов достаточно высокая гибкость полимера позволяет эпитопу «подстроиться» под структуру активного центра рецептора В-клеток.

Существует еще одно свойство антигенов, от которого зависит их иммуногенность: они должны принадлежать к классам полимеров, из которых построены организмы высших животных. Полагают, что это обусловлено необходимостью деградации молекулы антигена для формирования на его основе лиганда для рецепторов Т-клеток (см. раздел 3.2.2.2). Осуществление деградации требует наличия соответствующих ферментов. Ферменты в

организме обычно участвуют в расщеплении продуктов питания и собственных макромолекул. Отсутствие ферментов, способных расщеплять некоторые полимеры, служит основой слабой иммуногенности таких веществ. Считают, что с повышением резистентности к расщеплению ферментами связано ослабление иммуногенности белков после их рацемизации щелочами. Таким образом, хотя антигены по определению должны быть чужеродны для организма, эта чужеродность не должна переходить определенные границы. Вышесказанное относится преимущественно к антигенам, вызывающим тимусзависимый ответ.

### *Генетические аспекты иммуногенности*

Поскольку иммуногенность антигена зависит от эффективности процессов обработки, которой он подвергается в организме, следует ожидать, что она зависит и от генотипа реципиента. Существование генетического контроля иммунного ответа на конкретные антигены показано в разнообразных экспериментах. Так, при иммунизации инбредных (генетически «чистых» линий) морских свинок полимером  $(\text{Glu-Lys})_n$  или конъюгатом динитрофенил-поли L-лизинном животные одной линии отвечали образованием антител на оба конъюгата, а морские свинки другой линии не отвечали ни на один из них. Гибридологический анализ показал, что способность отвечать на антиген детерминирована одним доминантным геном.

Аналогичные результаты получены в экспериментах на мышах с использованием других синтетических полипептидов. Если мышей иммунизировать разветвленными полипептидами  $(\text{T, G})\text{-A-L}$  и  $(\text{His, G})\text{-A-L}$  (эти полипептиды содержат основную полипептидную цепь, образованную поли-L-лизинном с боковыми полиаланиновыми цепями, заканчивающимися остатками тирозина и глутаминовой кислоты или гистидина и глутаминовой кислоты соответственно), то мыши линии C57BL/6 дают высокий иммунный ответ на 1-й, но не на 2-й пептид. Мыши линии CBA, наоборот, сильно отвечают на 2-й и слабо — на 1-й пептид. И в этом случае сильный ответ детерминирован одним доминантным геном.

И у морских свинок, и у мышей показана связь уровня иммунного ответа с комплексом МНС. Связь иммуногенности с МНС обусловлена различиями в сродстве аллельных вариантов молекул МНС к различным пептидным фрагментам антигенов, выступающих в качестве эпитопов для Т-клеток. Уровень иммунного ответа в значительной степени определяется эффективностью презентации антигенного пептида, а она зависит от способности пептидов встраиваться в молекулы МНС. Таким образом, генетическая детерминация структуры МНС (точнее, участка, связывающего пептид) одновременно распространяется на контроль уровня иммунного ответа.

В такой четкой форме генетическая детерминация иммуногенности проявляется только в отношении некоторых достаточно простых по структуре антигенов. Способность отвечать на сложные антигены подвержена комплексному генетическому контролю (см. раздел 3.6.6.1). Данные генетических исследований подчеркивают относительность понятия «иммуногенность» и зависимость иммуногенности от свойств организма, в который введен антиген. Оказывается, что иммуногенность антигена может зависеть от особенностей реакции организма в не меньшей степени, чем от структуры антигена.

*Тимусзависимость антигенов*

Гуморальный иммунный ответ на белковые антигены обычно требует участия не только В-, но и Т-клеток и ослабляется в отсутствие тимуса (у генетически бестимусных или тимэктомированных вскоре после рождения животных). При этом В-клетки распознают нативный антиген, тогда как Т-клетки — его фрагменты (эпитопы), встроенные в состав молекул МНС (см. далее). Т-клетки могут выступать в качестве клеток-помощников при иммунном ответе только на те молекулы, чьи фрагменты могут встраиваться в состав молекул МНС (например, на белковые антигены). Ответ на другие антигены (например, полисахаридные) осуществляется В-клетками без участия Т-лимфоцитов. Именно поэтому они могут вызывать ответ у бестимусных nude-мышей. Иногда исключение Т-клеток из ответа на антигены обусловлено другими механизмами. Антигены, способные индуцировать иммунный ответ без участия Т-лимфоцитов, называют тимуснезависимыми, или Т-независимыми (ТН).

ТН-антигены, как правило, крупные молекулы (с молекулярной массой порядка  $10^3$  кДа). По химической природе это могут быть полисахариды, ЛПС или белки. Они поливалентны, содержат повторяющиеся эпитопы. Полимеризация и агрегирование тимусзависимых антигенов нередко делает их ТН, а конъюгирование полисахаридов с белками, наоборот, переводит полисахаридные антигены из разряда ТН в тимусзависимые. Многие из ТН-антигенов медленно деградируют и длительно персистируют в организме. Для ответа на эти антигены не требуются их обработка и презентация АПК. По этой причине иммунный ответ на такие антигены не контролируется генами МНС. Однако это не означает, что в иммунном ответе на тимуснезависимые антигены участвуют только В-лимфоциты. Вспомогательные клетки (макрофаги, дендритные клетки, Т- и NK-лимфоциты) в той или иной степени вносят вклад в иммунный ответ на эти антигены (см. раздел 3.6.4.2). Например, они могут служить источником цитокинов, способствующих пролиферации В-лимфоцитов, например, BAFF — цитокина семейства TNF, играющего ключевую роль в гомеостазе В-лимфоцитов (см. далее).

Важные сведения были получены при изучении ответа на ТН-антигены мышей с мутацией *xid*, затрагивающей тирозинкиназу *btk* и блокирующей дифференцировку В-лимфоцитов до стадии, на которой экспрессируется мембранная молекула *Lyb-5*. Эти мыши, а также новорожденные особи других линий, у которых не успели созреть *Lyb-5*<sup>+</sup> В-клетки, отвечают не на все ТН-антигены. Антигены, на которые способны отвечать мыши с мутацией *xid*, обозначают как тимуснезависимые антигены I типа (ТН-1; *Thymus-independent I*), а антигены, ответ на которые у этих мышей отсутствует — как тимуснезависимые антигены II типа (ТН-2). В настоящее время установлено, что у *Xid*-мышей практически отсутствует одна из субпопуляций В-лимфоцитов — *CD5*<sup>+</sup> *B1a*-клетки и специфический ответ на ТН-2 антигены связывают преимущественно с этими клетками. В качестве примера ТН-1 антигенов можно привести большинство бактериальных ЛПС, полифлагеллин, полисахарид бордетелл, а также их конъюгаты с гаптенами. Важно отметить, что ТН-1 антигены обладают митогенными свойствами в отношении В-клеток. К ТН-2 антигенам относят полисахаридные антигены (в том числе бактериальные), конъюгаты гаптен с фиколлом, лева-

ном, некоторые разновидности ЛПС, некоторые синтетические антигены (например, поливинилпирролидон).

Основной изотип антител, специфичных к тимуснезависимым антигенам, — IgM; при этом переключения изотипа обычно не происходит, отсутствует «созревание аффинитета» и практически не формируется иммунологическая память и, как следствие, не развивается вторичный иммунный ответ. Известны, однако, исключения из этих правил (например, переключение на IgA в слизистых оболочках).

ТН-антигены не презентуются Т-хелперам в составе МНС. Именно поэтому Т-хелперы не участвуют в ответе на эти антигены. Активацию В-клеток ТН-антигенами лучше рассмотреть на примере ТН-2 антигенов. Способность активировать В-клетки без помощи Т-лимфоцитов обусловлена особенностями структуры ТН-2 антигенов. Важнейшие их свойства, как уже отмечалось, — наличие большого числа повторяющихся эпитопов и достаточно крупный размер молекулы. При связывании ТН-2 антигена происходит кластеризация BCR на поверхности лимфоцита. Это способствует активации киназ, ассоциированных с BCR, и индукции сигнала, достаточного для преодоления порога активации В-лимфоцитов. Вероятно, определенный вклад в активацию ТН-2 специфических клеток вносит распознавание ими RAMP, входящих в состав большинства ТН-антигенов.

ТН-1 антигены активируют В-лимфоциты несколько иначе. Механизм этой активации в настоящее время до конца не известен. Известно, что ТН-1 антигены способны активировать клетки через митогенные и паттернраспознающие рецепторы. Однако при низких концентрациях антигена такая активация возможна только при его концентрировании на В-клетках при помощи BCR (поэтому в этих условиях на ТН-1 антигены отвечают только клетки специфичных клонов). Не вполне ясно, поступают ли при этом в клетку активационные сигналы от BCR, связавших антиген. Митогенность ТН-1 антигенов проявляется при повышении их концентрации до уровня, при котором для активации В-клеток дополнительное концентрирование антигена при помощи BCR не требуется. Таким образом, в митогенных концентрациях ТН-1 антигены способны активировать все В-клетки, независимо от специфичности их BCR. В настоящее время лучше всего изучен ответ на ТН-1 антиген — ЛПС, который связывается с LBP и CD14 и в составе этого комплекса активирует клетку через TLR-4. Тем не менее, в ответе В-клеток на ТН-1 антигены остается много неясного.

Считают, что степень участия Т-хелперов или иных вспомогательных клеток (например, естественных киллеров) в ответе на ТН-2 антигены выше, чем при ответе на ТН-1 антигены. Показана роль в развитии ответа на эти антигены ряда цитокинов (IL-3, GM-CSF, IFN $\gamma$ , BAFF).

### *Толерогенность*

Альтернатива индукции иммунного ответа при ответе на антигены — развитие неответа. Это не просто отсутствие ответа, а активное и избирательное его подавление в отношении данного конкретного антигена. На уровне клетки эту реакцию называют **анергией**, а на уровне организма — **иммунологической толерантностью** (см. раздел 4.3). Толерантность индуцируется при введении высоких доз белков и полисахаридов при отсутствии

молекулярных агрегатов. Для белков может развиваться также низкодозная толерантность.

Одно из важных свойств антигенов, способствующих индукции толерантности, — способность избегать поглощения АПК (например, отсутствие молекулярных агрегатов). Проявлению толерогенности способствует также относительно низкая молекулярная масса и высокая эпитопная плотность. Таким образом, одни и те же молекулы могут выступать в качестве иммуногенов и толерогенов или не оказывать действия на иммунную систему в зависимости от их физического состояния (степени агрегированности). Имеет значение также присутствие в микроокружении цитокинов, регулирующих активность дендритных клеток, обрабатывающих и презентующих антиген Т-лимфоцитам: IL-12 и IFN $\gamma$  способствуют проявлению иммуногенности, а IL-10 — толерогенности молекул антигенов. Очень важную роль играет степень экспрессии на поверхности дендритных клеток костимулирующих молекул (что, в свою очередь, зависит от наличия RAMP в молекуле антигена) — энергия развивается при слабой экспрессии этих молекул.

### 3.2.1.3. Специфичность антигенов

В иммунологии под специфичностью понимают избирательность взаимодействия индукторов и продуктов иммунных процессов, в частности, антигенов и антител. Выше, при рассмотрении структуры антигенраспознающих рецепторов и антител (см. раздел 3.1.1.2) упоминалось, что их сродство к антигенам и способность взаимодействовать с ними связана с четко ограниченным участком — активным центром или антигенсвязывающим участком.

#### *Антигенные детерминанты*

Специфическое взаимодействие антител с молекулой антигена связано с относительно небольшим участком ее поверхности, соответствующим по размеру антигенсвязывающему участку рецепторов и антител. Как уже упоминалось, при изучении иммунного ответа на конъюгаты гаптенов с белками-носителями было установлено, что специфичность конъюгата определяют молекулы гаптена, к которым направлены образующиеся антитела. Связь специфичности антигенов с относительно небольшими участками ее поверхности подтвердилась при анализе специфичности природных молекул белков и полисахаридов, а также при изучении ответа на синтетические полипептиды.

В этих работах было установлено, что практически в любой молекуле антигена есть несколько детерминант, или **эпитопов** — участков, ответственных за взаимодействие с активными центрами антигенраспознающих молекул. Для антигенов с повторяющейся структурой (например, полисахаридов) характерны повторяющиеся однотипные эпитопы. Белкам свойственны разнообразные по своей структуре эпитопы, к каждому из которых могут вырабатываться специфические антитела. В молекуле устанавливается иерархия эпитопов, когда один из них является доминирующим, что проявляется в преимущественном образовании антител против этого эпитопа (явление иммунодоминантности). После искусственного удаления этого эпитопа свойство иммунодоминантности переходит к другому эпитопу.

Связь специфичности антигенов с относительно небольшими фрагментами их молекул объясняется самой природой этой специфичности. Она служит отражением пространственного соответствия (комплементарности) эпитопа и активного центра рецептора. Чем больше это пространственное соответствие, тем выше сродство эпитопа к активному центру рецептора. Распознавание эпитопа рецептором — пусковой момент иммунного ответа. Антитела, продуцируемые в результате такого ответа, соответствуют по своей специфичности рецептору и, следовательно, специфичны к упомянутому выше эпитопу.

Эпитоп представляет собой выпуклость на поверхности макромолекулярной глобулы, соответствующая по величине и конфигурации полости активного центра антитела. Для того, чтобы эпитоп мог проникнуть в полость, размер эпитопа должен быть несколько меньше размеров полости активного центра. Если протяженность активного центра составляет 6 нм, то длина эпитопа — до 4 нм, а его объем — 2–3 нм<sup>3</sup>. Эпитоп белковой молекулы может содержать 7–15 аминокислотных остатков (это соответствует массе 0,6–1 кДа), а эпитоп углеводной молекулы — 6 моносахаридных остатков. Наибольшую роль в обеспечении специфичности взаимодействия с активным центром играют концевые остатки в составе эпитопа (на долю концевого сахара приходится 39% энергии взаимодействия с антителом, а на долю 6-го остатка — только 6%). Учитывая постепенное убывание вклада мономеров во взаимодействие с активным центром, можно заключить, что суждения о границах эпитопа и его размерности весьма относительны.

Анализ специфичности антител, образуемых одним организмом, а также моноклональных антител, получаемых при иммунизации одного животного, показывает, что против одного эпитопа образуется широкий спектр разных антител. Это еще раз подчеркивает относительность представлений об эпитопной структуре антигенов и невозможность однозначной локализации эпитопов. Эпитопная структура представится еще более размытой, если учесть различия в индивидуальной реакции на антиген различных представителей одного или разных видов животных. Это отсутствие жесткого соответствия между структурами эпитопов и активных центров становится более понятным, если учесть, что в основе механизма формирования антигенраспознающего репертуара рецепторов лимфоцитов лежат случайные процессы (см. раздел 3.1.3). При вторичном иммунном ответе специфичность образующихся антител и их сродство к антигену становится выше за счет особого отбора, которому подвергаются предшественники антителообразующих клеток в ходе иммунного ответа (см. раздел 3.6.2.2).

Специфичность и разрешающая способность распознавания гаптенов антителами первоначально была изучена с помощью реакции задержки. Ее суть состоит в том, что исследуемый свободный гаптен, взаимодействуя с антителом, не вызывает видимых реакций, но препятствует взаимодействию с ними конъюгатов гаптен–белок, способных вызвать такие реакции (образование осадков — преципитатов или агглютинатов клеток). Степень ослабления этих реакций отражает количество гаптена, вступившего во взаимодействие с антителами. Реакция антител и конъюгата гаптена с белком может быть полностью блокирована идентичным свободным гаптеном, частично — родственным, но не идентичным гаптеном и совсем не блоки-

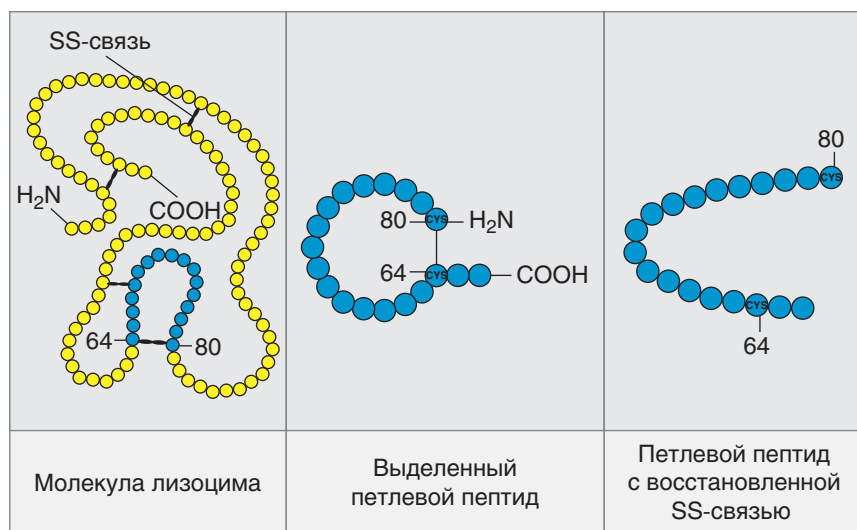
руется гаптенем, кардинально отличающимся от конъюгированного. Такой анализ позволил установить очень высокую способность антител отличать гаптены различного строения. Выяснилось, что антитела различают оптическую конфигурацию углеводов, замещение атомов водорода на кислотные и азотсодержащие группы, но не на галогены. Четко распознаются позиции замещения — орто-, мета-, пара-, особенно при замещении кислотными группами. Более того, распознается заряд детерминанты, которому соответствует противоположный заряд активного центра.

### *Линейные и конформационные эпитопы*

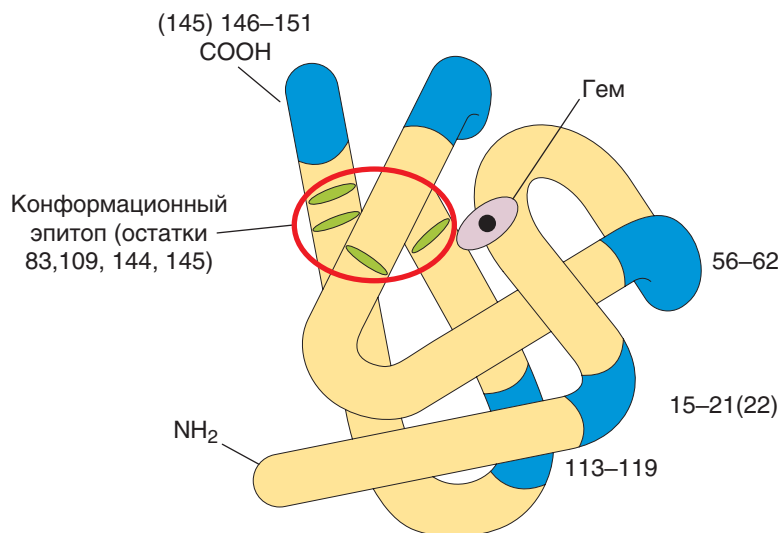
Белковые молекулы имеют сложную пространственную структуру, при этом гидрофильные остатки экспонированны на поверхности, тогда как гидрофобные скрыты в глубине белковой глобулы. Эпитопы, как правило, соответствуют гидрофильным поверхностным структурам, содержащим циклические остатки, которые придают эпитопу пространственную индивидуальность. При свертывании белковой глобулы могут сближаться остатки, отдаленные друг от друга в линейной последовательности. Это обстоятельство определяет существование двух типов эпитопов — линейных и конформационных. Первые образованы линейной последовательностью аминокислотных остатков, вторые — отдаленными друг от друга остатками, сближенными на поверхности белковой глобулы. Нарушение третичной структуры белка, вызванное разрывом дисульфидных связей или денатурацией, приводит к исчезновению конформационных детерминант при полной сохранности линейных.

Существование конформационных детерминант можно продемонстрировать на примере молекулы лизоцима (рис. 3.22). Нативная молекула этого белка содержит петлю, соответствующую последовательностям 60–83, скрепленную дисульфидной связью. При иммунизации лизоцимом петля выступает как иммунодоминантный эпитоп. Разрыв связи приводит к распрямлению петли, ликвидации эпитопа и нарушению взаимодействия с антителами к нативной молекуле. Нативные и линейные эпитопы могут сосуществовать в одной молекуле, как, например, в молекуле миоглобина, содержащей конформационный эпитоп, захватывающий остатки 34, 53 и 113, а также ряд линейных эпитопов (рис. 3.23).

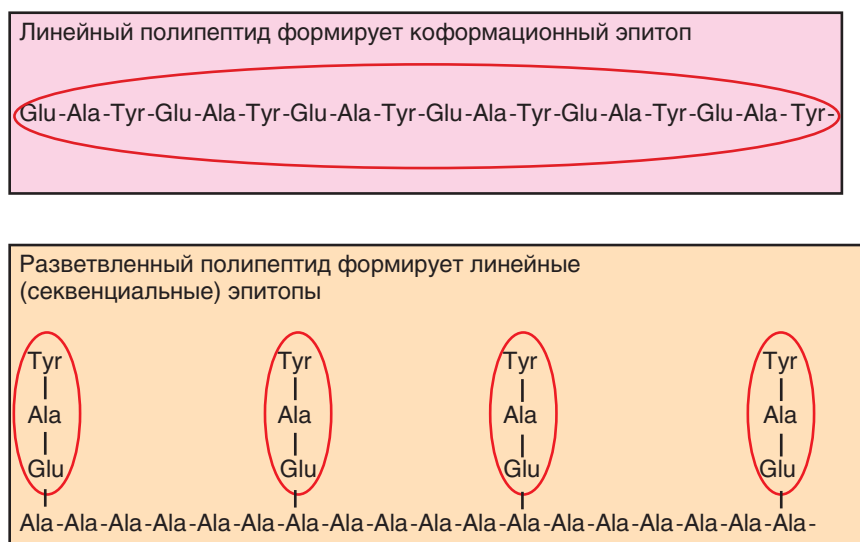
Взаимоотношение линейных и конформационных эпитопов можно наглядно проиллюстрировать на примере синтетических полипептидов, содержащих остатки Glu, Ala и Tyr. В одном из таких пептидов триада Glu–Ala–Tyr повторяется последовательно и многократно, причем полипептидная цепь имеет  $\alpha$ -спиральную конфигурацию. В другом полипептиде к линейному пептиду, образованному остатками Ala, «подшивали» боковые группы Glu–Ala–Tyr (рис. 3.24). К пептидам обоих типов получали антитела. Оказалось, что при реакции антител с пептидами не наблюдалось перекрестных реакций, т.е. пептид 1 не реагировал с антителами к пептиду 2 и наоборот. Реакция полипептидов второго типа со своими антителами блокировалась трипептидом Glu–Ala–Tyr. Реакция полипептидов первого типа со своими антителами блокировалась линейными пептидами, образованными как минимум 17 чередующимися остатками Glu, Ala, Tyr, формирующими  $\alpha$ -спираль. Таким образом, антитела к линейному полипептиду были



**Рис. 3.22.** Роль трехмерной структуры молекулы в формировании эпитопа. Пептид 64–80 иммунодоминантный. Он сохраняет способность взаимодействовать с антителами после выделения из молекулы, но утрачивает ее после восстановления дисульфидной связи



**Рис. 3.23.** Линейные и конформационные эпитопы (на примере молекулы миоглобина кашалота). Синим отмечены линейные эпитопы; красным обведен конформационный эпитоп



**Рис. 3.24.** Линейные и конформационные эпитопы модельных синтетических пептидов. Эпитопы обведены красным

направлены к конформационной детерминанте, формируемой  $\alpha$ -спиралью, а антитела к разветвленному полипептиду — к линейной детерминанте.

Существование конформационных эпитопов демонстрирует важность распознавания не только линейной структуры, но и пространственной конфигурации молекул. Это положение можно проиллюстрировать на примере перекрестной реактивности гаптенов различной химической природы с белковыми эпитопами антиидиотипических антител (т.е. анти-антител, распознающих некоторые идиотопы антител, специфичных к этим гаптенам). Перекрестная реактивность в этом случае основана на том, что конфигурация активного центра (и в определенной степени идиотопов) комплементарна конфигурации как эпитопа иммуногена, так и антиидиотопа. Следовательно, эпитоп и антиидиотоп, если не идентичны, то сходны друг с другом по конфигурации.

Анализ специфичности конформационных детерминант с помощью методов, разработанных при изучении гаптенов и применяемых для линейных (секвенциальных) детерминант, практически невозможен. При извлечении из целой молекулы конформационная детерминанта изменяет свою конфигурацию и теряет способность реагировать с антителами. Эти эпитопы изучают, подбирая белки (от родственных видов, мутантных линий клеток и особенно часто — синтетические белки), отличающиеся единичными заменами аминокислотных остатков. При этом для оценки реакции часто используют, твердофазный иммуноферментный анализ, позволяющий достичь высокой производительности и степени стандартизации.

Размеры конформационных эпитопов варьируют даже в более широких пределах, чем линейных эпитопов: они соответствуют 6–17 аминокислотным остаткам. Так, в молекулах миоглобина размер конформационного

эпитопа составляет 6–8, а в молекуле бычьего сывороточного альбумина — 10–12 остатков. Расположение частей конформационных детерминант на большом расстоянии в линейной структуре молекулы описано, например, для аллотипических детерминант иммуноглобулинов, уже упоминавшихся эпитопов миоглобина и т.д. Как в линейных, так и в конформационных эпитопах роль отдельных остатков может существенно варьировать. Так, в формировании описанной выше петлевой детерминанты лизоцима ключевую роль играет остаток в положении 68. В данном случае проявляется фактор гибкости эпитопа, позволяющий «подогнать» конфигурацию конформационного эпитопа, к структуре активного центра антител. Подгонка происходит за счет остатков, обеспечивающих эту гибкость (например, пролина).

Важным и практически неизученным остается вопрос об активных факторах, определяющих иерархию эпитопов и реализуемых через ингибирование одними эпитопами иммунного ответа на другие эпитопы, что может происходить с участием регуляторных клеток.

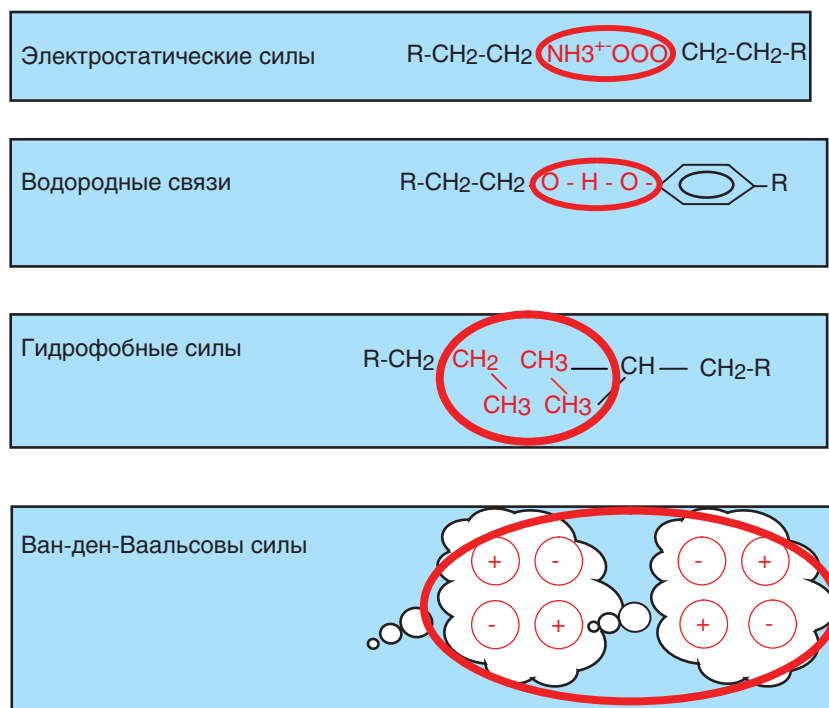
Несмотря на то, что знания о структурных основах конформационных и линейных эпитопов белков пока далеко не полны, их достаточно, чтобы с высокой долей уверенности прогнозировать, какие участки белковой молекулы окажутся антигенными эпитопами. С помощью биоинформатики с использованием компьютерных программ разработаны алгоритмы для таких расчетов. В первую очередь выбирают участки с преобладанием гидрофильных остатков над гидрофобными (условие локализации эпитопа на поверхности молекулы), а также с аминокислотными остатками, придающими этому участку гибкость. Детерминанты, смоделированные на основе таких расчетов, в настоящее время синтезируют и с успехом применяют в серодиагностике и для приготовления искусственных вакцин.

#### 3.2.1.4. Взаимодействие антигенов и антител

##### *Физико-химические основы взаимодействия антиген–антитело*

В основе реакции антиген–антитело лежит взаимодействие между эпитопом антигена и активным центром антитела, основанное на их пространственном соответствии (**комплементарности**). Это взаимодействие состоит в установлении между эпитопом и активным центром антитела нековалентных химических связей, в основе которых лежат следующие типы межмолекулярных взаимодействий (ни одно из них не является специфичным для реакции антиген–антитело) (рис. 3.25):

- электростатические; они включают ионные (между заряженными группами аминокислотных остатков, например, карбоксильными и аминогруппами) и полярные (связанные с формированием диполей) взаимодействия;
- водородные (связаны с формированием водородных мостиков между гидрофильными группами);
- гидрофобные (обусловлены энергетическими преимуществами контакта гидрофобных участков молекул между собой);
- силы Ван-дер-Ваальса (основаны на взаимодействии электронных облаков).



**Рис. 3.25.** Нековалентные связи, обеспечивающие взаимодействие антигена с антителом. Основные типы связей, играющих роль во взаимодействии антигена с антителом, обведены красным

Все эти взаимодействия проявляются только при близком контакте молекул. Так, интенсивность электростатических взаимодействий убывает пропорционально квадрату расстояния, а ван-дер-ваальсовых сил — пропорционально 7-й степени расстояния. Такое маленькое расстояние между молекулами может быть достигнуто только за счет комплементарности эпитопа и активного центра антитела.

#### **Аффинность антител**

Взаимодействие антигена с антителом обратимо и подчиняется закону действия масс, на основе которого рассчитывают константу равновесия. В реакции антител с гаптеном формула имеет вид:

$$K_a = [AbH]/[Ab][H],$$

где  $K_a$  — константа равновесия (или константа связывания);  $[Ab]$  — концентрация несвязанных антител;  $[H]$  — концентрация свободного гаптана;  $[AbH]$  — концентрация комплекса антитело–гаптен. Размерность константы связывания — 1/моль.

Часто бывает удобно использовать величину, обратную константе связывания, которая обозначается как константа диссоциации ( $K_d=1/K_a$ ) и выражается в молях.

Константа связывания служит мерой сродства (аффинности) антител и может рассматриваться как показатель специфичности антител к данному эпитопу. Для прямого экспериментального определения аффинности антител используют метод равновесного диализа. Антитела помещают в диализационный мешок, стенки которого проницаемы для гаптена, но не для антител. Диализный мешок с антителами помещают в раствор гаптена, который начинает диффундировать в мешок по градиенту концентрации. После установления равновесия измеряют концентрацию гаптена внутри и снаружи мешка. Превышение первой величины над второй соответствует количеству гаптена, связавшегося с антителами. Результаты выражают в координатах Скэтчарда, используемых при количественной оценке параметров связывания различных веществ (например, лекарственных средств и их рецепторов). Это позволяет рассчитать величину  $K_a$ , т.е. оценить аффинность взаимодействия. Помимо кинетического подхода к оценке аффинности существует термодинамический подход, основанный на анализе изменений свободной энергии при взаимодействии антиген–антитело. Аффинность антител существенно меняется в ходе иммунного ответа («созревание аффинности» — см. раздел 3.6.2.2). При этом она возрастает от  $10^{-7}$ – $10^{-8}$  М до  $10^{-10}$ – $10^{-11}$  М.

При использовании высокомолекулярных антигенов, содержащих большое число эпитопов, точное определение аффинности взаимодействия каждого эпитопа со своим антителом становится невозможным. В этом случае оценивают суммарное сродство (функциональную аффинность, или **авидность**). Его определяют чаще всего по устойчивости иммунных комплексов к таким воздействиям, как повышение ионной силы раствора, способствующее разрыву связей между эпитопами и активными центрами антител. Оценку проводят с помощью иммуноферментного или радиоиммунного тестов. Как правило, авидность взаимодействия с антителами целого антигена выше, чем сумма взаимодействий с антителами индивидуальных эпитопов. Это превышение объясняют тем, что диссоциация каждой связи затрудняется при сохранении контакта молекул, удерживаемых за счет других связей.

Существует значительная трудность в определении аффинности поликлональных антител в иммунных сыворотках из-за высокой степени их гетерогенности. Эту проблему можно решить, используя моноклональные антитела — антитела с идентичной аффинностью (получают, как правило, в культурах гибридных клеток).

#### *Методы оценки взаимодействия антиген–антитело*

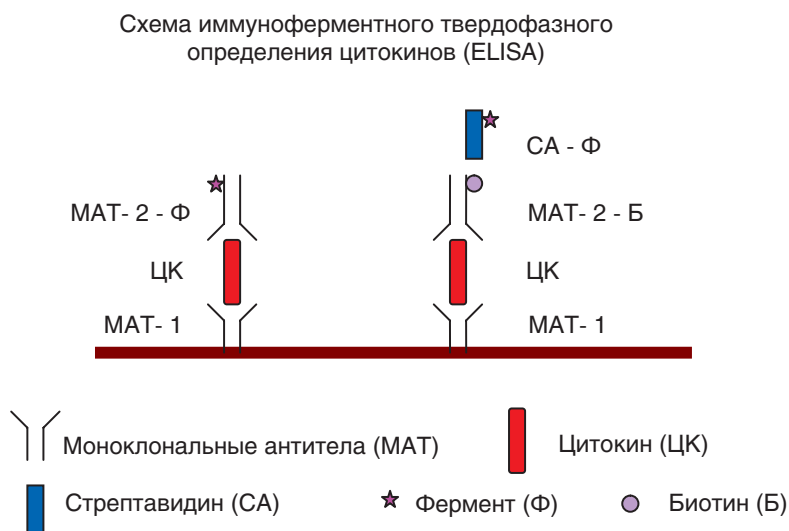
Часто возникает необходимость измерения взаимодействия антигена и антитела — как для определения содержания антител, так и для выявления антигенов в биологических жидкостях и растворах. Для этого применяют 2 группы методов. Первая группа основана на непосредственной регистрации связывания антигенов и антител. Для этого один из компонентов (обычно антитела) метят и затем выявляют связывание меченного реагента с другим компонентом реакции. В качестве метки используют радиоактивные изотопы (радионуклиды), ферменты и флуоресцентные красители (флуорохромы). Методы соответственно обозначают как радиоиммунные,

иммуноферментные и иммунофлуоресцентные. Радиоиммунный анализ обычно проводят в прямом варианте, т.е. содержание антигена определяют по количеству связавшихся с ним меченых антител. Наиболее распространенные варианты иммуноферментного метода — конкурентный и двусайтовый. В первом случае оценивают степень ослабления связывания меченных антител с антигеном, фиксированным на пластиковой поверхности, после добавления исследуемого реагента. Во втором случае на пластике фиксируют немеченные антитела, специфичные к одному из эпитопов антигена, к ним добавляют исследуемый материал и содержание в нем антигена определяют по связыванию меченных антител к другому его эпитопу. Схемы постановки иммуноферментного теста представлены на рис. 3.26.

Антитела, меченные флуорохромами, обычно применяют для изучения поверхностных антигенов клеток. Для выявления связывания раньше использовали люминесцентную микроскопию. В настоящее время в цитологических исследованиях чаще применяют проточную лазерную цитометрию (люминесцентную микроскопию продолжают использовать в гистологических исследованиях).

Другая группа методов оценки взаимодействия антител с антигенами основана на регистрации так называемых вторичных феноменов:

- преципитации (осаждения) иммунных комплексов;
- агглютинации (склеивания) частиц, несущих антиген (эритроцитов, частиц латекса и т.д.);
- связывания и активации комплемента с последующим лизисом эритроцитов, несущих антиген и т.д.



**Рис. 3.26.** Схема иммуноферментного твердофазного определения антигена (ELISA) на примере цитокина. Коричневая полоса — пластиковая поверхность, на которую последовательно наносят указанные реагенты

Эти методы просты, но возникают значительные трудности при их автоматизации и проведении их количественной оценки. Результаты этих реакций оценивают титрами, т.е. последним разведением антител, дающим положительный результат. Использование этих методов сыграло огромную роль на ранних этапах развития иммунологии (тогда их применяли для выявления антител и антигенов с целью диагностики многих инфекционных заболеваний).

Эти методы послужили единственной методической основой работ, заложивших теоретические основы иммунохимии. Так, анализ кривой преципитации, методы которого в 30-е годы XX века разработал М. Хейдельбергер (*M. Heidelberger*), позволил установить основные закономерности взаимодействия антигенов и антител, когда не только отсутствовала возможность получения чистых и гомогенных препаратов антител, но даже их природа была неизвестна. Кривую преципитации строили, измеряя количество белка в осадке, образуемом при взаимодействии антигена с антителом (обычно к стандартному раствору антигена постепенно добавляли антитела и измеряли содержание белка в преципитате), а также концентрацию свободных антител или антигена в растворе. Эта кривая обычно имеет горбовидную форму. Перед формированием максимального количества преципитата находится точка эквивалентности, когда в растворе отсутствуют свободные антигены и антитела.

Изучение и объяснение кривых преципитации привело к созданию теории решетки, согласно которой в основе формирования преципитата лежит бивалентность молекулы антитела и поливалентность антигенов (рис. 3.27). В результате при взаимодействии антигена с малым количеством антител образуются растворимые комплексы из одиночных пар молекул. По мере увеличения количества антител возникает возможность не только каждой молекуле антитела связывать две молекулы антигена, но и разным молекулам антител взаимодействовать с одной и той же молекулой антигена. В результате формируется молекулярная «решетка», не способная удержаться в растворе и выпадающая в осадок. Формулы иммунных комплексов в зоне эквивалентности:  $АГ_2АТ_2$ ,  $АГ_3АТ_3$ ,  $АГ_2АТ_3$  (где  $АГ_n$  — число молекул антиге-

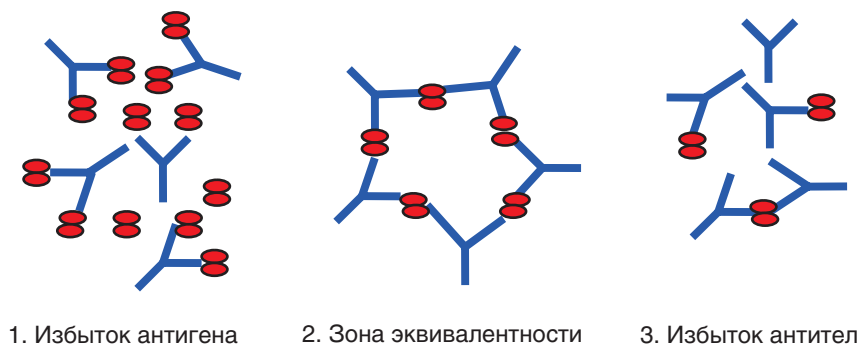


Рис. 3.27. Иммунные комплексы при разных соотношениях антигена и антител

на, а  $AT_n$  — число молекул антител). Размер решетки и объем преципитата увеличивается с возрастанием относительной доли антител в растворе. Однако добавление антител вскоре после достижения точки эквивалентности приводит к «блокаде» молекулы антигена, когда обе валентности нескольких молекул антитела оказываются связанными с одной молекулой антигена. Это препятствует формированию решетки и сопровождается образованием растворимых иммунных комплексов состава  $AG_4AT_3$ ,  $AG_3AT_2$  и  $AG_2AT$ .

В настоящее время методы, основанные на преципитации, продолжают использовать в лабораторной и исследовательской практике. Реакцию преципитации в агаре применяют для определения концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови (метод радиальной иммунодиффузии). Преципитация лежит в основе широко используемого метода иммуноблоттинга («иммунопротокания»), когда электрофоретические фракции белков переносят в целлюлозу и «проявляют», осаждавая антителами.

Два других традиционных подхода к определению антител или выявлению антигенов основаны на агглютинации и лизисе. Сущность агглютинации состоит в склеивании частиц (эритроцитов, частиц латекса и т.д.), несущих антиген, в присутствии антител. Антитела вызывают перекрестное связывание молекул антигена, находящихся на разных частицах, что приводит к их склеиванию. В результате стабильность суспензии частиц, поддерживаемая их взаимным электростатическим отталкиванием, нарушается и образуются агрегаты, обнаруживаемые визуально. В реакциях иммунного гемолиза, помимо антигенов и антител, участвует комплемент, обуславливающий лизис связавших антитела эритроцитов. Аналогичный подход лежит в основе метода лимфоцитотоксичности. Результаты этого метода оценивают по снижению жизнеспособности лимфоцитов, связавших антитела, в присутствии комплемента; гибель клеток выявляют по окрашиваемости витальными красителями (эозин, трипановый синий). Реакции, основанные на агглютинации и гемолизе, в настоящее время применяют в ограниченных масштабах (для экспрессной полуколичественной оценки содержания антител или антигенов).

### 3.2.2. Главный комплекс гистосовместимости и антигены, распознаваемые Т-клетками

Решение проблемы распознавания антигенов Т-клетками потребовало значительных усилий. Уже при анализе распознавания конъюгатов гаптенов с белками-носителями было установлено, что В- и Т-клетки узнают разные эпитопы конъюгата: В-клетки распознают гаптены, а Т-клетки — детерминанты белка-носителя. Вскоре было обнаружено еще более кардинальное различие в распознавании антигенов, осуществляемом Т- и В-лимфоцитами. Оказалось, что, в отличие от В-клеток, распознающих антиген как в свободной форме (в растворе), так и на поверхности клеточных мембран, Т-клетки распознают только мембраносвязанный антиген. Более того, благодаря исследованиям Р. Цинкернагеля (*R.M. Zinkernagel*) и П. Догерти (*P.C. Dogherty*), проведенным в 70-е годы прошлого века, стало ясно, что Т-клетки распознают не столько «чужое», сколько «измененное свое». На протяжении последующих десятилетий было установлено, что

TCR совместно с корцепторами распознает фрагменты антигена (эпитопы), включенные в состав молекул МНС на поверхности специализированных АПК (в отличие от BCR и иммуноглобулинов, распознающих эпитопы в составе любых молекул белков). Так были заложены основы современного учения о распознавании антигенов Т-лимфоцитами. Из сказанного выше следует, что понимание природы антигенов, распознаваемых Т-клетками, невозможно без представлений о МНС и его продуктах.

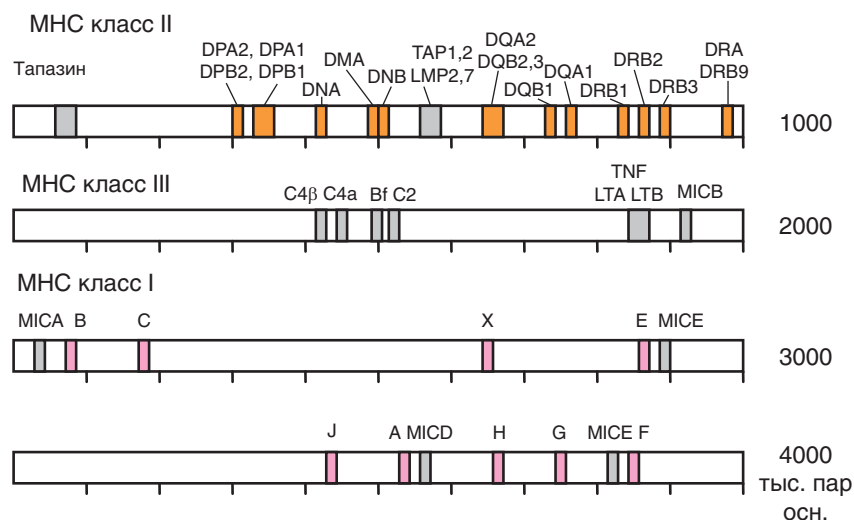
### 3.2.2.1. Главный комплекс гистосовместимости

#### *Генетика главного комплекса гистосовместимости*

В 20-е годы XX века в Джексонской лаборатории (Бар Харбор, США) была проведена масштабная работа по получению генетически чистых линий мышей путем длительного инбридинга. В опытах с межлинейной пересадкой опухолей сотрудники этой лаборатории Дж.Д. Литтл (*G.D. Little*), Дж. Снелл (*G. Snell*) и другие американские исследователи установили существование нескольких десятков (более 30) генетических локусов, различие по которым обуславливает отторжение трансплантируемых тканей. Они были обозначены как **локусы гистосовместимости** (Н-локусы, от английского *Histocompatibility*). Одновременно сходную задачу решал английский иммунолог П. Горер (*P. Gorer*), изучая группы крови мышей. В 1948 г. в совместной работе Дж. Снелла и П. Горера был описан locus гистосовместимости, определяющий наиболее сильную реакцию отторжения. Он был назван Н-2, поскольку соответствовал гену 2-й группы крови мышей. Вскоре была установлена сложная структура этого генетического комплекса, включающего очень большое число генов. К тому времени уже была доказана иммунологическая природа отторжения трансплантата и было ясно, что эффект несовместимости по Н-локусам обусловлен различиями в антигенах, кодируемых генами этого локуса. Такие антигены стали называть аллоантигенами, или антигенами гистосовместимости.

В 60-е годы XX века французский иммуногематолог Ж. Доссе (*J. Dausset*) описал несколько антигенов лейкоцитов, аналогичных некоторым аллельным продуктам Н-2. Вскоре Ж. Доссе вместе с другими специалистами по генетике трансплантаций на основе анализа накопленных к тому времени данных об аллоантигенах человека постулировал существование у человека генетического комплекса, аналогичного локусу Н-2 мышей. Была выявлена принадлежность к этому комплексу нескольких аллоантигенов, открытых ранее благодаря использованию сывороток многократно рожавших женщин. В этих сыворотках присутствовали антитела к аллоантигенам плодов. Открытый генетический комплекс был назван **HLA** (от *Human leukocyte antigens*). Аналогичные комплексы были обнаружены у всех изучавшихся млекопитающих и птиц. В связи с этим было введено общее обозначение для генетических комплексов такого рода — **МНС** (от *Major histocompatibility complex*). Это обозначение было перенесено и на продукты генов — МНС-антигены.

Комплекс Н-2 локализуется в хромосоме 17 мыши; комплекс HLA — в коротком плече хромосомы 6 человека (6p). Структура локуса HLA человека схематично представлена на рис. 3.28. Он занимает очень большое



**Рис. 3.28.** Карта генов главного комплекса гистосовместимости (МНС) на примере комплекса лейкоцитарных антигенов человека (HLA). Участок хромосомы разделен на 4 отрезка, представленные на рисунке последовательно. Справа указаны номера 3'-нуклеотидов каждого отрезка

пространство — 4 млн пар нуклеотидов и содержит больше 200 генов. Выделяют 3 класса генов *МНС* — I, II и III. В отторжении несовместимых трансплантатов и презентации антигена Т-клеткам участвуют продукты генов классов I и II, расположенные соответственно в 3'- и 5'-частях комплекса. Первоначально их разделяли по индукции их продуктами преимущественно гуморального (I класс) или клеточного (II класс, описанный несколько позже, чем I) иммунитета. Выделяют 2 группы генов I класса. Первую образуют гены *A*, *B* и *C*, отличающиеся беспрецедентно высоким полиморфизмом — известно по несколько сотен их аллельных форм (например, *HLA-B* — 830) — см. табл. 3.7. Это классические гены I класса. Другую группу образуют неклассические гены *E*, *F*, *G*, *H* (гены с ограниченным полиморфизмом). Только продукты классических генов I класса участвуют в презентации антигена Т-лимфоцитам.

**Таблица 3.7.** Полиморфизм генов лейкоцитарных антигенов человека (HLA)

Класс	Локус	Число аллелей, выявленных ДНК-типированием
I	<i>HLA-A</i>	489
	<i>HLA-B</i>	830
	<i>HLA-C</i>	266
	<i>HLA-E</i>	9
	<i>HLA-F</i>	21
	<i>HLA-G</i>	23

Окончание табл. 3.7

Класс	Локус	Число аллелей, выявленных ДНК-типированием
II	<i>HLA-DRA</i>	3
	<i>HLA-DRB1</i>	463
	<i>HLA-DRB2–9</i>	82
	<i>HLA-DQA1</i>	34
	<i>HLA-DQB1</i>	78
	<i>HLA-DPA1</i>	23
	<i>HLA-DPBI</i>	125
	<i>HLA-DOA</i>	12
	<i>HLA-DOB</i>	9
	<i>HLA-DMA</i>	4
	<i>HLA-DMB</i>	7
Всего		2478

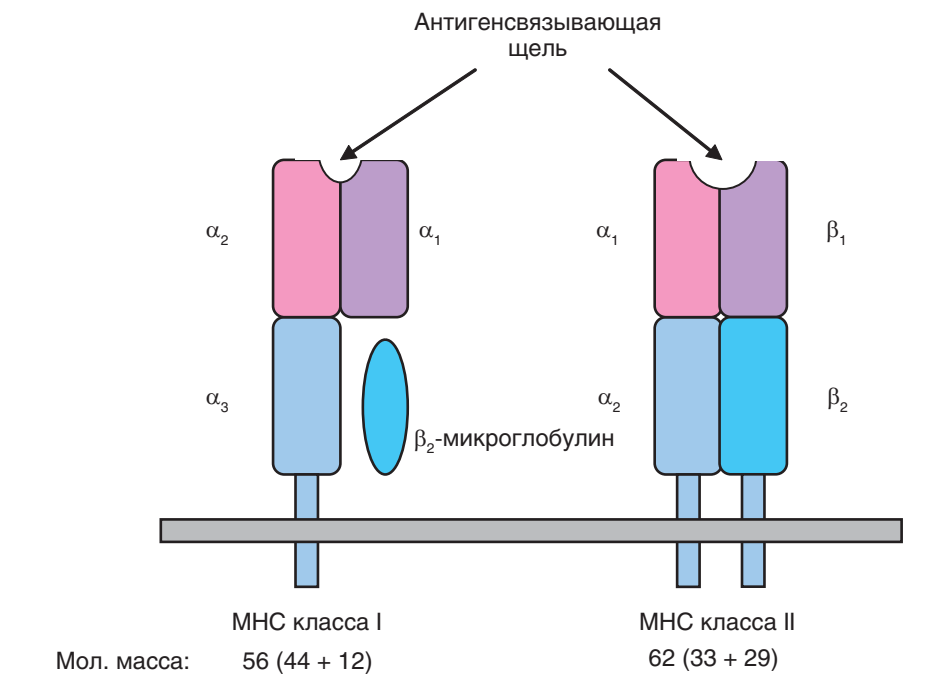
Гены *MHC* класса II также включают несколько вариантов. В презентации антигена непосредственно участвуют продукты генов *DR* ( $\alpha$  и  $\beta$ ), *DP* ( $\alpha$  и  $\beta$ ) и *DQ* ( $\alpha$  и  $\beta$ ), кодирующие соответствующие полипептидные цепи молекул. Во всех случаях для генов  $\beta$ -цепей характерен значительно более высокий полиморфизм, чем для генов  $\alpha$ -цепей. Более позднее обнаружение этих генов связано с трудностями идентификации их продуктов: сыворотки многократно рожающих женщин, использованные для выявления продуктов МНС, содержали антитела к молекулам МНС почти исключительно I класса. С их помощью выявлены только аллоантигенные варианты гена *HLA-DRB*. Для определения молекул II класса применяли смешанную культуру лимфоцитов (т.е. Т-клеточную реакцию), предоставляющую значительно меньше возможностей для выявления тонкостей антигенных различий. В настоящее время антигены обоих классов определяют в полимеразной цепной реакции (т.е. определяют именно гены, а не их продукты, как раньше). К классу II относят несколько генов с невысоким уровнем полиморфизма, продукты которых не презентруют антиген, но участвуют в его внутриклеточной обработке — процессинге (гены *TAP*, *LMP*) или способствуют встраиванию антигенного пептида в молекулы МНС-II (*HLA-DM*, *HLA-DO*).

Гены МНС класса III, как уже упоминалось, не причастны к молекулам гистосовместимости и осуществляемой ими презентации. Они кодируют некоторые компоненты комплемента, цитокины семейства фактора некроза опухоли, белки теплового шока.

Строение мышиного локуса H-2 аналогично описанному выше строению локуса HLA человека. Основное различие касается локализации генов класса I (*K* и *D*), которые у мышей пространственно разобщены, тогда как расположение генов классов II (*A*, *E*) и III соответствует таковому в локусе HLA человека.

**Молекулы МНС — полиморфные продукты главного комплекса гистосовместимости классов I и II**

При значительном сходстве общего плана строения молекул МНС классов I и II они имеют ряд различий. Схема доменной структуры этих молекул представлена на рис. 3.29. Молекулы обоих типов образованы двумя полипептидными цепями, содержащими 1–3 домена (табл. 3.8). Каждый домен содержит около 90 аминокислотных остатков. Молекулы МНС классов I и II имеют сходную молекулярную массу — около 60 кДа.



**Рис. 3.29.** Схема строения молекул МНС

**Таблица 3.8.** Характеристика полипептидных цепей молекул HLA классов I и II

Молекула	Название цепи	Мол. масса, кДа	Внеклеточные домены	Трансмембранный участок	Число S-S-связей	Число остатков в доменах		
						Внеклеточный	Трансмембранный	Цитоплазматический
HLA, класс I	$\alpha_1$	45	$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$	есть	2	90–90–90	25	30
	$\beta_2$ -микроглобулин	12	$\beta_2$ -микроглобулин	нет	0	100	–	–
HLA, класс II	$\alpha$	33–35	$\alpha_1, \alpha_2$	есть	1	90–90	25	варьирует
	$\beta$	29	$\beta_1, \beta_2$	есть	2	90–90	25	варьирует

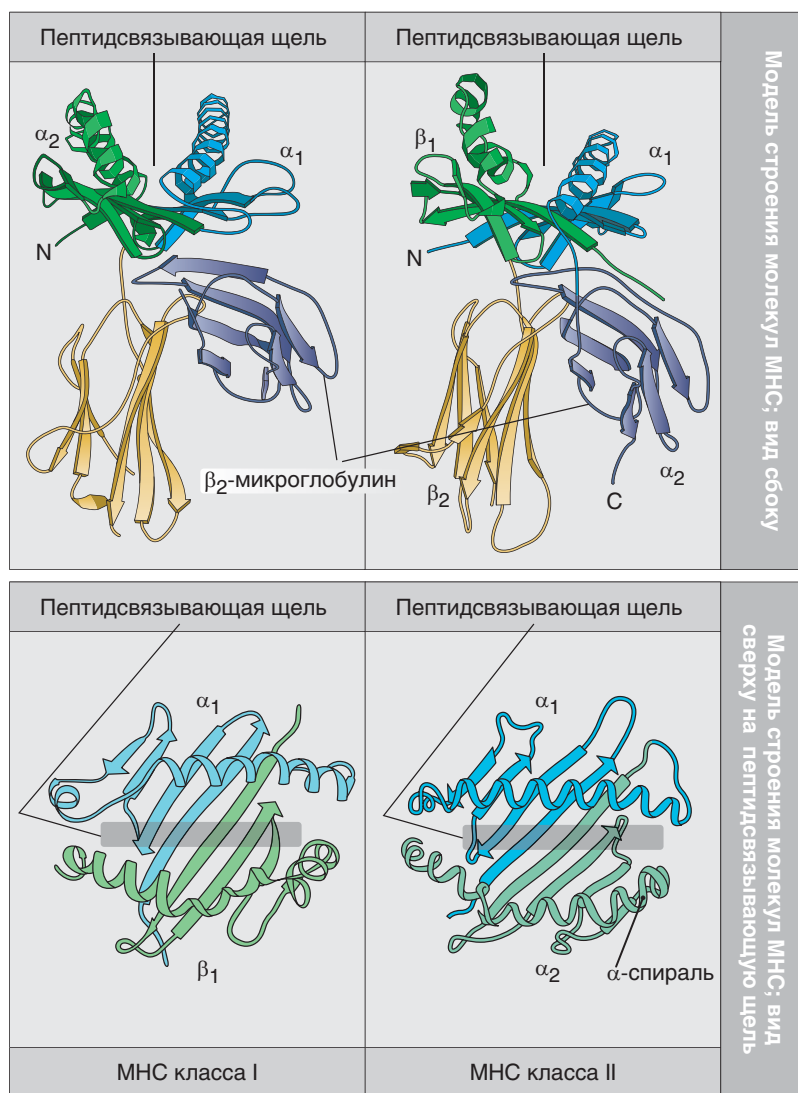
В молекулах класса I полипептидные цепи сильно отличаются друг от друга. Цепь  $\alpha$  состоит из трех внеклеточных доменов, из которых 3-й (прилежащий к мембране) принадлежит суперсемейству иммуноглобулинов, а 2 других имеют иное строение, которое рассмотрим ниже.  $\alpha$ -Цепь закорена в мембране; помимо трансмембранного, она имеет короткий цитоплазматический участок (30 остатков), не обладающий ферментативной активностью и не связанный с ферментами.  $\beta$ -Цепь, называемая также  $\beta_2$ -микроглобулином, относится к суперсемейству иммуноглобулинов. Она нековалентно связана с  $\alpha_3$ -доменом  $\alpha$ -цепи и не имеет трансмембранного участка.  $\beta_2$ -Микроглобулин кодируется геном, расположенным вне комплекса MHC (в хромосоме 15). Описанная структура свойственна молекулам HLA-A, HLA-B и HLA-C человека, а также молекулам H-2K и H-2D мыши и молекулам MHC-I всех других видов животных.

Молекулы MHC-II тоже имеют одинаковое строение для HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR человека, а также H-2A и H-2E мыши. В их состав входят 2 цепи аналогичного строения —  $\alpha$  и  $\beta$ . Обе цепи пронизывают мембрану, имеют 2 домена во внеклеточной части и короткий (12–15 остатков) цитоплазматический участок. Домены  $\alpha_2$  и  $\beta_2$ , прилежащие к мембране, принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов, а дистальные домены  $\alpha_1$  и  $\beta_1$  по своей структуре сходны с доменами  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$  молекул MHC-I.

Таким образом, все молекулы MHC в общей сложности содержат 2 трансмембранных домена суперсемейства иммуноглобулинов и 2 дистальных домена другой (сходной между собой) структуры. Дистальные домены в молекулах MHC-I образованы одной цепью ( $\alpha$ ), а в молекулах MHC-II — разными цепями ( $\alpha$  и  $\beta$ ). Именно эти дистальные домены молекул MHC связывают антигенный пептид и играют ключевую роль в формировании лиганда TCR.

Схематично строение антигенсвязывающих полостей (или желобков, щелей — от английского — *groove*) представлено на рис. 3.30. Полости имеют дно и стенки. Дно — плоский участок, выстланный  $\beta$ -слоистой (N-концевой) частью доменов полипептидной цепи, тогда как стенки сформированы C-концевыми  $\alpha$ -спирализованными участками доменов. В молекулах MHC-I вся эта структура образована непрерывной полипептидной цепью  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$ -доменов единой  $\alpha$ -цепи, тогда как в молекулах MHC-II пептидсвязывающая полость образована доменами двух разных цепей ( $\alpha_1$ - и  $\beta_1$ -доменами соответствующих цепей), примыкающих друг к другу в области  $\beta$ -структурированного дна желобка.

Выше говорилось о чрезвычайно высоком полиморфизме классических молекул MHC обоих классов: существует по несколько сотен аллельных вариантов генов и, следовательно, их белковых продуктов. Если наложить расположение варьирующих аминокислотных остатков на схему молекул MHC, оказывается, что, во-первых, они расположены в основном в дистальных доменах ( $\alpha_1$  и  $\alpha_2$  — в молекулах MHC-I,  $\alpha_1$  и  $\beta_1$  — в молекулах MHC-II), во-вторых, они связаны почти исключительно со стенками антигенсвязывающей полости. В молекулах MHC-II вариабельность преобладает в той части стенок, которая образована  $\beta_1$ -доменом. Таким образом, эта полость имеет стандартную организацию, но в зависимости от MHC-генотипа, тонкие детали ее строения варьируют. Сродство различных пептидов к антигенсвяз-



**Рис. 3.30.** Трехмерные модели строения молекул главного комплекса гистосовместимости. Пространственные модели молекул главного комплекса гистосовместимости, представленные под разными углами зрения (по Bjorkman *et al.*, 1987)

зывающей щели молекул МНС изменяется в широких пределах. Достаточно высоким считается сродство порядка  $10^{-5}$  М.

Подчеркнем одно очень важное обстоятельство, касающееся вариабельности ключевых молекул иммунной системы. Исключительно высокий уровень вариабельности свойствен как антигенраспознающим структурам (антителам, TCR), так и молекулам МНС, участвующим в построении лиганда TCR. Однако все варианты антител и TCR (порядка  $10^6$ ) присутствуют в одном организме, являясь продуктами одновременно присутствующих в нем генов, в то время как вариабельность молекул МНС проявляется на

уровне популяций человека и животных, тогда как в каждом конкретном организме может присутствовать не более 2 вариантов молекул — продуктов аллельных генов. Если учесть, что у человека есть 8 высокополиморфных генов МНС (А, В, С, а также  $\beta$ -гены DP, DQ и DR и  $\alpha$ -гены DP и DQ), то число вариантов полипептидных цепей МНС не может превышать 16.

Молекулы МНС-I и МНС-II представлены на поверхности клеток, но существенно различаются по тканевому распределению. Молекулы МНС-I присутствуют практически на всех ядросодержащих клетках организма и отсутствуют на эритроцитах и клетках ворсинчатого трофобласта. На каждой клетке обычно содержится около 7000 молекул МНС-I. Плотность их экспрессии может изменяться под влиянием различных факторов, в частности, цитокинов. Молекулы МНС-II присутствуют на поверхности ограниченного числа клеточных типов. Они экспрессируются прежде всего на АПК — дендритных клетках, В-лимфоцитах и активированных макрофагах. Содержание молекул на поверхности этих клеток сильно варьирует. На одной дендритной клетке обычно содержится порядка 100 000 молекул МНС-II. При определенных условиях (например, при воспалении) они могут появляться на поверхности других активированных клеток — эпителиальных, эндотелиальных и т.д. Классический индуктор молекул МНС-II —  $IFN\gamma$ . Особенность мембранных молекул МНС — их быстрый обмен на поверхности клеток, особенно характерный для МНС-I (время обновления молекул — около 6 ч).

Особую группу антигенпрезентирующих молекул образуют гомологи продуктов МНС-I — молекулы CD1 (CD1a, CD1b, CD1c и CD1d), кодируемые пятью полиморфными генами (*CD1 A-D*), локализованными у человека в хромосоме 1. По своей структуре молекулы CD1 сходны с МНС-I (гомология составляет 20–25%). Они обладают сходной доменной структурой (домены  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  и  $\alpha_3$ ). CD1 — трансмембранные белки, связанные с молекулой  $\beta_2$ -микроглобулина. Молекулярная масса белковой части CD1-комплекса — 33 кДа. Домены  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$  образуют антигенсвязывающую полость, закрытую с обоих концов (как и в молекулах МНС-I). Ее вместимость несколько больше, чем в молекулах МНС-I. CD1 связывает бактериальные и аутологичные липиды (диацилглицерол, миколевую кислоту и т.д.) и липопептиды. От других молекул CD1 по ряду свойств отличается CD1d. Эта молекула связывает аутологичные гликолипиды. Ее наиболее известный лиганд —  $\alpha$ -галактозилцерамид. Молекулы CD1a, CD1b и CD1c экспрессируются на поверхности дендритных клеток, моноцитов и макрофагов, причем у человека CD1c служит маркером всей популяции дендритных клеток, а CD1a — клеток Лангерганса. CD1d в малом количестве экспрессируется на дендритных клетках (кроме клеток Лангерганса), моноцитах и макрофагах.

### 3.2.2.2. Процессинг антигена для Т-клеток

Как уже упоминалось выше, продукты генов МНС в силу своей чрезвычайно высокой вариабельности в пределах популяции обуславливают отторжение пересаживаемых тканей. Долгое время эти молекулы изучали преимущественно в контексте трансплантологии, что определило их обозначение как генов и антигенов гистосовместимости. Однако пересадка тканей — искусственная процедура, практически не имеющая аналогов в естественных условиях (наиболее близкая аналогия — развивающийся плод

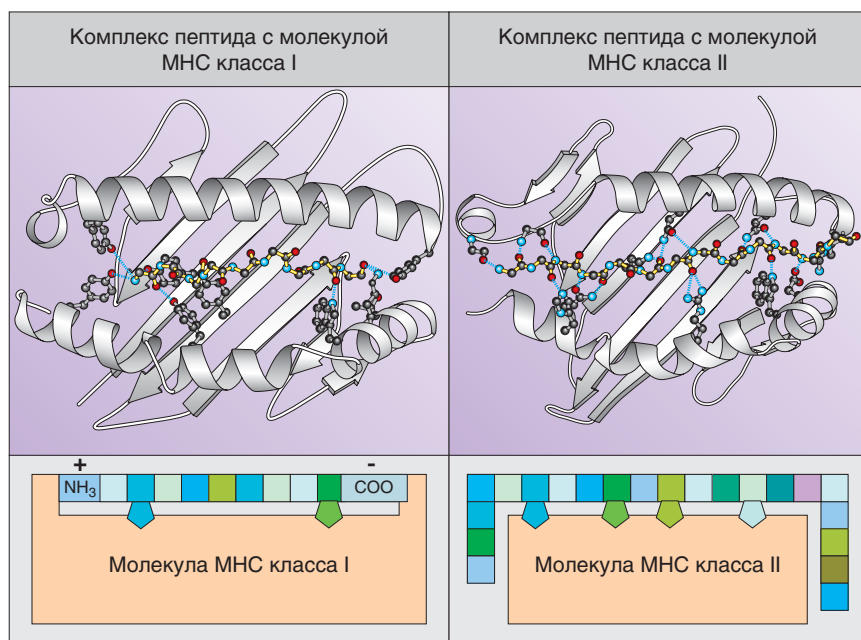
млекопитающих — скорее служит примером противостояния отторжению несовместимых тканей). Поэтому вскоре после описания генов МНС и их продуктов возник вопрос об их функциях. Их биологическое назначение было осмыслено в 70-х годах XX века в уже упоминавшихся исследованиях Р. Цинкернагеля (*R. Zinkernagel*) и П. Догерти (*P. Doherty*), которые показали, что Т-клетки распознают «измененное свое» — фрагмент антигена, встраивающийся в состав молекулы МНС, вместе с модифицированной этим пептидом молекулой МНС (Нобелевская премия 1996 г.). Таким образом, антиген распознается Т-клеткой только при встраивании его фрагментов в состав молекул МНС, которые при этом выступают не только в роли каркаса, несущего пептид, но и в качестве распознаваемого лиганда. Только в таком виде антиген может быть распознан Т-лимфоцитами. Поскольку Т-клетки участвуют как в индукции иммунного ответа, так и в его регуляции и осуществлении ряда эффекторных функций, презентация антигенного пептида Т-лимфоцитам может рассматриваться как одно из ключевых событий иммунного ответа. Это определяет исключительную важность процесса встраивания пептида в молекулы МНС.

Молекулы МНС, не содержащие пептида, встроенного в антигенсвязывающую полость, нестабильны. На поверхности клеток присутствуют молекулы МНС, содержащие в своем составе пептиды. Таким образом, встроенный в молекулу МНС пептид следует рассматривать как ее интегральную часть. В каждой клетке в составе молекул МНС презентуются тысячи разных пептидов, что еще больше увеличивает вариабельность рассматриваемых молекул.

В структуре антигенсвязывающей полости молекул МНС-I и МНС-II имеются некоторые особенности (табл. 3.9). В МНС-I полость замкнута, т.е. ограничена не только с боков, но и с концов. В результате размер пептида, способного встроиться в нее, строго ограничен 8–10 аминокислотными остатками (чаще всего — 9). В отдельных случаях, если размеры пептида превышают указанные значения, он «выпирает» из щели, формируя арку. В МНС-II полость ограничена только с боков и имеет открытые концы. Поэтому размер встраивающихся в нее пептидов может варьировать в широких пределах — от 12 до 25 аминокислотных остатков; концы пептида могут выступать за пределы полости.

**Таблица 3.9.** Характеристика антигенсвязывающих полостей антигенпрезентирующих молекул

Параметр	МНС класса I	МНС класса II	CD1
Домены, формирующие полость	$\alpha_1$ и $\alpha_2$	$\alpha_1$ и $\beta_1$	$\alpha_1$ и $\alpha_2$
Встраиваемый олигомер	Пептид	Пептид	Липиды и гликолипиды
Число аминокислотных остатков в пептиде	8–10	12–25	—
Тип полости	Закрытая	Открытая	Закрытая
Число (типичная локализация) «якорных» остатков	2 (позиции 2/6, 9)	Разное (2–4)	2



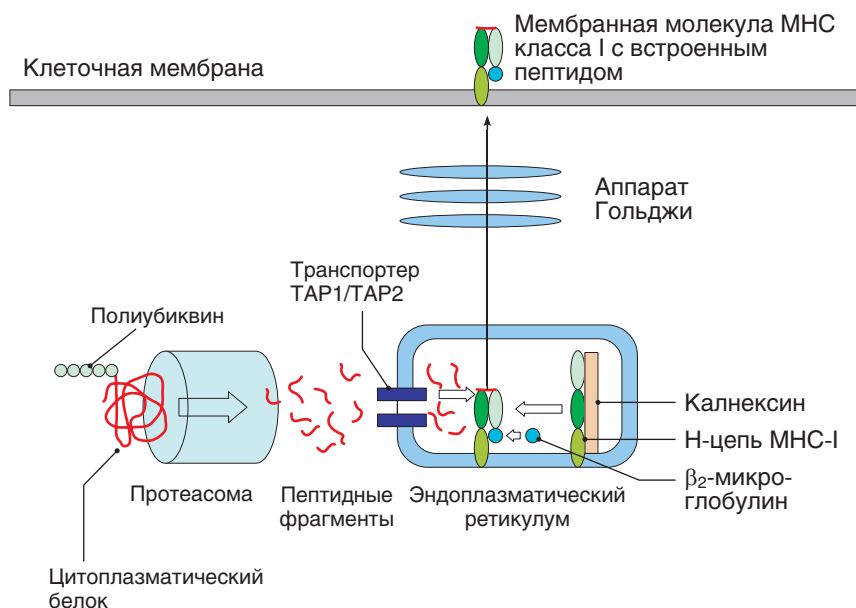
**Рис. 3.31.** Схема расположения пептида в молекулах главного комплекса гистосовместимости. На схеме в пептидсвязывающую щель «встроены» пептиды. Аминокислотные остатки изображены в виде разноцветных квадратов; пятиугольниками отмечены заякоренные остатки

В молекулах МНС-I и МНС-II пептид закрепляется в полости путем заякоривания в ее дно (рис. 3.31). В молекулах МНС-I заякоривание осуществляется в двух «карманах» dna пептидсвязывающей полости. Один из этих карманов обычно связан с С-концевым остатком dna полости, расположение второго варьирует в зависимости от аллельного варианта молекулы (обычно он соответствует 9 позиции). В МНС-II пептид заякорен в нескольких (обычно четырех) карманах в разных участках dna полости (в типичных случаях — на уровне остатков 1, 4, 6 и 9; см. рис. 3.31). Процессы встраивания пептидов в состав молекул МНС изучены к настоящему времени достаточно детально. Для молекул МНС-I и МНС-II принципиально различны как источники пептидов, так и механизмы их встраивания.

В молекулы МНС-I встраиваются пептиды — образующиеся в цитоплазме клетки в процессе естественной деградации цитоплазматических белков в специальных образованиях (протеасомах). Протеасомы — надмолекулярные структуры с константой седиментации 20S (молекулярная масса — 1500 кДа). Они сформированы наружным и внутренним кольцами, каждое из которых образовано семью субъединицами —  $\alpha$  (наружное кольцо) и  $\beta$  (внутреннее кольцо). Три  $\beta$ -субъединицы —  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  и  $\beta_3$  обладают протеолитической активностью и участвуют в расщеплении белков цитозоля. Под влиянием

IFN $\gamma$  (образуется при иммунных процессах NKT-, NK- и Th1-клетками) синтезируются цепи  $i\beta_1$  (LMP2),  $i\beta_2$  (MECL1) и  $i\beta_5$  (LMP-7), замещающие соответствующие протеолитические субъединицы. Обновленную протеасому называют иммунопротеасомой. Смысл замены субъединиц состоит в усилении хемотриписно- и трипсиноподобной активности и ослаблении каспазоподобной активности протеасомы, что приводит к повышению эффективности образования пептидов с основными и гидрофобными С-концами (именно они встраиваются в молекулы МНС-I) и уменьшению доли пептидов с кислыми С-концами (не встраиваются в МНС-I).

Образовавшиеся пептиды транспортируются из цитоплазмы в эндоплазматический ретикулум, в котором на рибосомах синтезируются полипептидные цепи молекулы МНС-I —  $\alpha$ -цепь и  $\beta_2$ -микроглобулин. Транспорт пептидов происходит с участием транспортных систем TAP (*Transporter associated with antigen processing*), кодируемых МНС-генами *TAP1* и *TAP2*.  $\alpha$ -Цепь молекул класса I сразу после синтеза и встраивания в мембрану эндоплазматического ретикулума соединяется с  $\beta_2$ -микроглобулином. Однако, как уже упоминалось, молекулы МНС, не содержащие пептид, нестабильны. Их конформация стабилизируется временно с помощью специальных молекул — шаперонов (в данном случае — калнексина и калретикулина). Доставленные в эндоплазматический ретикулум пептиды при контакте с молекулами МНС-I встраиваются в их полость, после чего молекулы шаперонов отделяются от готовой и стабилизированной молекулы класса I. В составе мембран эндоплазматического ретикулума молекулы класса I перемещаются сначала в аппарат Гольджи, а затем при помощи секреторных везикул — на поверхность клетки. В результате на клеточной поверхности



**Рис. 3.32.** Процессинг молекул главного комплекса гистосовместимости класса I и цитоплазматических пептидов. Белки и пептиды отмечены красным

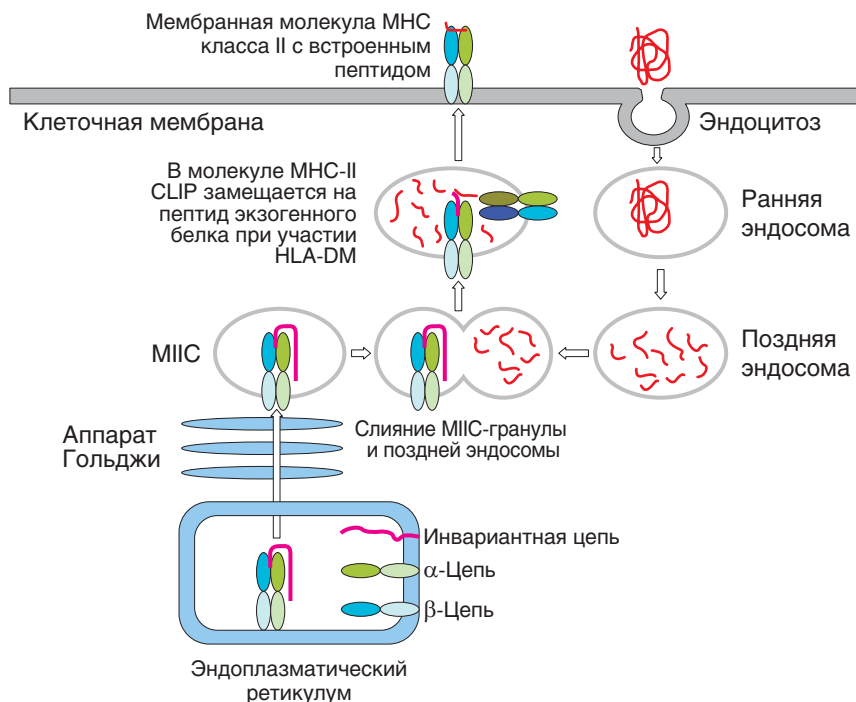
оказываются молекулы МНС-I, содержащие различные фрагменты внутриклеточных белков (рис. 3.32).

Пептиды, презентруемые в составе молекул МНС-II, имеют внеклеточное происхождение. Дендритные и другие АПК поглощают экзогенные молекулы в процессе эндоцитоза. Выделяют 4 разновидности эндоцитоза:

- фагоцитоз;
- макропиноцитоз;
- клатринопосредованный эндоцитоз;
- кавеолопосредованный эндоцитоз.

Фагоцитарный механизм относительно слабо используется любыми АПК, кроме моноцитов/макрофагов, для которых этот путь интернализации является основным. Макропиноцитоз широко распространен при интернализации экзогенных веществ макрофагами и незрелыми дендритными клетками. Клатринзависимый механизм чаще всего бывает задействован при поглощении иммунных комплексов и других формах рецепторного эндоцитоза (одинаково выражен у незрелых и зрелых дендритных клеток). Кавеолозависимый эндоцитоз происходит несколько реже. Среди рецепторов, усиливающих эндоцитоз, наиболее важную роль (особенно для дендритных клеток) играет лектиновый рецептор DEC-205. В результате эндоцитоза формируются ранние эндосомы, содержащие интернализованные белки из межклеточного пространства. Некоторые ранние эндосомы возвращаются на наружную мембрану со сроком полужизни 1–2 мин. Около 25% эндосом транспортируется вглубь клетки и сливается с секреторными везикулами, формирующимися из эндоплазматического ретикулума и содержащими встроенные в мембрану молекулы МНС-II. В эндосомы может проникать также содержимое цитозоля (по механизму аутофагии), что приводит к презентации фрагментов цитоплазматических белков в составе молекул МНС-II. Структуру еще не связавших пептид молекул МНС-II стабилизирует полипептидная цепь *Ii* (от англ. — *Invariant chain*), заполняющая антигенсвязывающую полость и примыкающая к боковой поверхности цепей молекулы класса II. Участок внутриклеточного пространства, в котором происходят описываемые процессы, называют МПЦ (*MHC class II compartment*).

При перемещении в глубь клетки внутренняя среда эндосом закисляется, что способствует активации содержащихся в них протеаз — катепсинов L и S. С такой закисленной эндосомой сливаются везикулы, содержащие молекулы МНС-II. Катепсины расщепляют белки, содержащиеся в эндосоме, с образованием пептидов. Одновременно они расщепляют *Ii*-цепь таким образом, что в составе молекулы класса II остается только фрагмент *Ii*-цепи, встроенный в пептидсвязывающую полость. Этот пептид обозначают как CLIP (*Class II associated invariant chain peptide*). Пептиды, образующиеся из экзогенных белков, вытесняют CLIP из полости. В этом процессе задействована молекула HLA-DM (продукт гена МНС класса II), присутствующая в везикуле. Взаимодействие HLA-DM с МНС-II катализирует высвобождение CLIP, в результате чего пептидсвязывающая полость МНС становится доступной для встраивания других пептидов. У мышей с мутациями гена HLA-DM этот процесс не осуществляется, в результате чего все молекулы МНС-II содержат один и тот же пептид — CLIP. После слияния эндосом с везикулами поздняя эндосома перемещается к поверхности клетки.



**Рис. 3.33.** Процессинг молекул главного комплекса гистосовместимости класса II и внеклеточных пептидов. Белки и пептиды отмечены красным

Происходит экзоцитоз ее содержимого. При этом мембрана везикулы сливается с мембраной клетки, в результате чего молекулы МНС-II, несущие пептид, оказываются на поверхности клетки (рис. 3.33).

Еще недавно считали, что два описанных пути процессинга антигенов и их встраивания в молекулы МНС автономны и изолированы друг от друга, в результате чего пептидные фрагменты внутриклеточных белков могут попасть только в состав молекул МНС-I, а пептиды экзогенного происхождения — только в состав молекул МНС-II. Поэтому было неясно, как происходит запуск цитотоксического иммунного ответа на внеклеточные патогены с участием молекул МНС-I. Ответом на этот вопрос послужило описание перекрестной презентации. Этот процесс заключается в том, что белки, поступившие из внеклеточной среды в эндосомы, могут проникнуть в цитозоль (где они расщепляются в протеосомах, а пептиды транспортируются в эндоплазматический ретикулум) или непосредственно доставляются в эндоплазматический ретикулум по механизму ретроградного транспорта. В ретикулуме пептидные фрагменты этих экзогенных белков встраиваются в молекулы МНС-I и затем транспортируются на мембрану. Кроме того, допускают возможность реализации других механизмов, например, проникновения внеклеточных белков в цитозоль, минуя эндосомы. Возможно также расщепление попавших в эндосомы белков до пептидов с участием связанных с эндосомами протеасом. Образованные при этом пептиды встраиваются в молекулы МНС-I.

Рассматривая встраивание пептидов в молекулы МНС, предполагалось, что эти фрагменты будут выполнять роль антигенных эпитопов, и сам процесс предназначен для формирования лигандов для TCR. Однако при встраивании пептидов в молекулы МНС отсутствует какая-либо предпочтительность в отношении антигенных пептидов. О том же свидетельствуют результаты исследования пептидов, извлекаемых из состава мембранных молекул МНС при закислении среды. Оказалось, что из молекул МНС-II элигируются в основном (до 90%) собственные белки клетки. Остальные 10% — внеклеточные белки, происходящие из межклеточной жидкости и окружающих клеток. Даже при инфекционном поражении на долю чужеродных пептидов приходится не более 0,1% от общего числа выделенных из мембранных молекул МНС пептидов. Таким образом, из примерно 100 000 молекул МНС, присутствующих на поверхности клетки, чужеродный эпитоп будет входить в состав всего лишь 100 молекул.

Описанные процессы встраивания фрагментов внутриклеточных и внеклеточных белков в молекулы МНС отражают важные для клетки процессы, назначение которых пока непонятно. Всем клеткам организма зачем-то нужно представлять на своей поверхности фрагменты собственных белков, а АПК — еще и фрагменты белков из их окружения. Очевидно, иммунная система лишь воспользовалась готовым механизмом для формирования антигенных структур, распознаваемых Т-клетками, и запуска иммунных процессов.

Выше говорилось исключительно о встраивании в молекулы МНС пептидных фрагментов антигенов. Однако известно, что аналогичным образом липидные эпитопы могут встраиваться в МНС-подобные молекулы семейства CD1. Полость молекулы CD1 обладает высоким сродством к липидам ( $10^{-7}$ – $10^{-8}$  М). Встраивание липида происходит в эндоплазматическом ретикулуме по схеме, аналогичной таковой при встраивании пептидов в молекулы МНС-I и с участием тех же шаперонов. В обновлении мембранных молекул, несущих антигенный липид, важную роль играет рециклинг (повторное использование) мембранных комплексов. CD1 поглощаются клеткой и проходят путь, аналогичный таковому при формировании комплексов молекул МНС-II с пептидами.

Отдельно следует упомянуть о презентации гликолипидных молекул NKT-клеткам, осуществляемой с помощью неклассической МНС-I-подобной молекулы CD1d. CD1d синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме и там же связывает гликолипиды. Доставка гликолипидов в эндоплазматический ретикулум происходит с участием белкового переносчика липидов — фактора МТР (*Microsomal transfer protein*). Нагруженная молекула CD1d транспортируется на поверхность АПК, а затем в процессе эндоцитоза попадает в позднюю эндосому. Здесь молекулы CD1d с помощью белковых переносчиков липидов сапозина (Saps) и Gm2-активатора могут нагружаться содержащимися в эндосоме гликолипидами и снова транспортироваться на поверхность клетки. Поглощение экзогенных гликолипидов происходит с помощью липопротеинового рецептора. Затем эти гликолипиды доставляются в эндосому, где они могут вытеснять из комплекса с CD1d эндогенные лиганды.

В настоящее время нет данных о встраивании в молекулы МНС или родственные им молекулы олигосахаридов. Вероятно, углеводные эпитопы не презентуются Т-клеткам. Именно поэтому полисахариды выступают

в качестве ТН-антигенов, а тимусзависимые свойства приобретают только в комплексе с белками, т.е. в форме гликопротеинов.

### 3.2.2.3. Особенности распознавания антигенных лигандов рецепторными комплексами Т-клеток

Из сказанного выше следует, что антигенные пептиды, распознаваемые Т-клетками, не существуют в свободном виде, а формируются в результате процессинга нативных молекул в АПК. Поскольку продукты генов МНС — трансмембранные молекулы, Т-клетки распознают антигены только в мембраносвязанной форме. Чтобы яснее представить процесс распознавания комплексов МНС–пептид, необходимо вспомнить структуру TCR. Антигенраспознающий участок TCR ( $\alpha\beta$ ) формируют V-домены  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей. Эти домены содержат по 3 гипервариабельных участка, из которых CDR3 обладает наибольшим разнообразием. С TCR связаны корецепторы CD4 и CD8. Эти молекулы инвариантны и обладают сродством к молекулам МНС, соответственно классов II и I.

Использование для характеристики Т-клеточных антигенов тех характеристик, которые рассматривали ранее как условия проявления антигенности молекул в отношении В-лимфоцитов: чужеродности, специфичности и иммуногенности (см. раздел 3.2) позволяет более четко представить различия в механизмах распознавания антигена В- и Т-лимфоцитами. Эпитоп, распознаваемый Т-клетками, включает 2 составляющие — собственно пептид, встроенный в молекулу МНС (вариабельная часть антигена) и прилегающие к пептиду части молекулы МНС (они сами по себе константны, но их конформация изменяется при взаимодействии с пептидом). Таким образом, антиген, распознаваемый TCR, не является ни чисто чужеродным, ни собственным. Р. Цинкернагель и П. Догерти обозначили этот антиген как «измененное свое». Таким образом, антигены, распознаваемые Т-клетками, существенно отличаются от распознаваемых В-лимфоцитами. Установлено, что решающий вклад в распознавание TCR пептидной части антигена вносит гипервариабельный участок CDR3, тогда как менее вариабельные участки CDR1 и CDR2 распознают прилегающие участки молекул МНС. При этом  $\alpha$ -цепь TCR контактирует с N-концевой, а  $\beta$ -цепь — с С-концевой частью молекул МНС. Наконец, корецепторы CD4 и CD8 взаимодействуют с инвариантными участками молекул МНС: CD4 — с доменом  $\beta_2$  молекулы МНС-II, CD8 — с доменом  $\alpha_3$  молекулы МНС-I.

Специфичность распознаваемого Т-клеткой эпитопа обусловлена, таким образом, не только пептидом, но и — пусть в меньшей степени — молекулой МНС. В отличие от распознаваемых BCR эпитопов, представляющих часть нативной молекулы антигена, Т-клеточные эпитопы в комплексе с молекулами МНС, как правило, не сохраняют нативную конформацию. Состав этих пептидов зависит от точек приложения протеаз-катепсинов, расщепляющих молекулу белка, и от способности пептида встроиться в антигенсвязывающую полость молекулы МНС. Т-клеточные пептиды не могут быть конформационными — они всегда линейные. Их специфичность определяется первичной структурой (последовательностью аминокислот), характером укладки пептида в полости и возможностью формирования вторичной структуры —  $\alpha$ -цепи. Протяженность эпитопов, распознаваемых TCR, соответствует длине

пептидов, презентруемых в составе молекул МНС. Именно поэтому для антигенов, распознаваемых  $CD4^+$  Т-клетками, которые распознают пептиды в составе молекул МНС-II, длина эпитопов несколько больше, чем для антигенов, распознаваемых  $CD8^+$  Т-клетками в составе МНС-I.

Таким образом, принципы формирования специфичности эпитопов, распознаваемых Т- и В-клетками, различны. Именно поэтому их картирование в одних и тех же молекулах показывает, что эпитопы для В- и Т-клеток почти не перекрываются. Как и в случае В-клеточных эпитопов, существует явление доминантности Т-клеточных эпитопов: одни из них индуцируют более выраженный ответ, чем другие. Хотя не все механизмы иммунодоминантности выяснены, очевидно, что наибольшую роль при этом играет степень родства различных участков молекулы, вырезаемых катепсинами, к антигенсвязывающим полостям молекул МНС, присутствующих на клетках данного организма. Для теоретического предсказания локализации Т-клеточных эпитопов (это важно для конструирования синтетических вакцин) используют совсем другие принципы, чем для конструирования эпитопов, распознаваемых антителами и BCR.

Аффинность взаимодействия эпитопов с TCR значительно ниже, чем эпитопов с активными центрами антител. Обычно аффинность TCR имеет порядок  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  М. Вовлечение в реакцию корцепторов позволяет повысить аффинность взаимодействия на 2 порядка. Но даже величина  $10^{-7}$ – $10^{-8}$  М слишком мала для запуска сигнала, необходимого для активации Т-клеток. Эта проблема решается с помощью дополнительных механизмов, связанных с формированием в зоне контакта АПК с Т-лимфоцитом специальной супрамолекулярной структуры — иммунного синапса (см. раздел 3.4.1.3).

Сродство корцепторов  $CD4$  и  $CD8$  к молекулам МНС разных классов (соответственно, II и I) имеет важное значение для «разделения труда» Т-клеток, несущих эти корцепторы.  $CD4^+$  Т-клетки получают сигнал от АПК и отвечают на внеклеточные антигены, т.е. на молекулы, локализованные вне клеток или в эндосомах.  $CD4^+$  Т-клетки участвуют в защите от таких патогенов. Активирующий сигнал эти лимфоциты получают от дендритных клеток, представляющих им антиген в составе молекул МНС-II. В связи с выполняемыми ими функциями,  $CD4^+$  Т-клетки называют Т-хелперами.  $CD8^+$  Т-клетки, распознавая внутриклеточные белки, презентруемые в составе молекул МНС-I, участвуют в защите от внутриклеточных патогенов. Основная функция  $CD8^+$  Т-клеток — цитотоксичность (убийство, киллинг) инфицированных клеток. Выполнение этой функции  $CD8^+$  Т-клетками облегчается тем, что молекулы МНС-I присутствуют на всех ядродержащих клетках организма.  $CD8^+$  Т-клетки называют цитотоксическими Т-лимфоцитами, или Т-киллерами.

Иммуногенность Т-клеточных антигенов зависит от структуры исходной белковой молекулы. Прежде всего она должна быть чувствительна к действию внутриклеточных протеаз (иначе из нее не будут выщепляться пептиды, встраивающиеся в молекулу МНС). Второе условие иммуногенности Т-клеточных антигенов — способность пептида встраиваться в антигенсвязывающую полость молекулы МНС. Очевидно, это наиболее важное условие, поскольку через этот механизм реализуется генетический

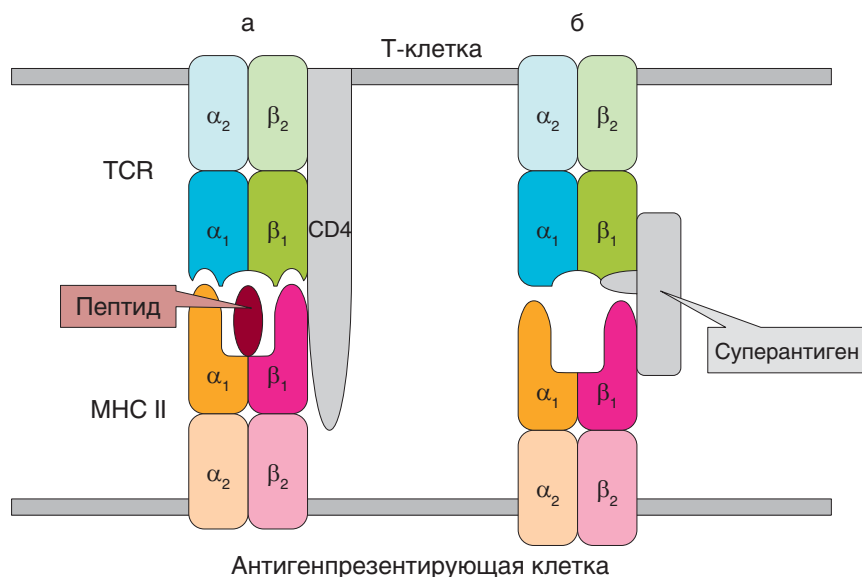
контроль иммунного ответа. Он определяется генами МНС. Тонкие особенности структуры антигенсвязывающей полости молекул МНС определяют предпочтение в связывании одних пептидов и невозможность связывания других. В первом случае формирующийся Т-клеточный антиген будет высоко иммуногенным, во втором — он может вообще не обладать иммуногенностью. Таким образом, МНС-генотип определяет эффективность защиты от патогенов, влияя на формирование Т-клеточных эпитопов. Когда рассматривали особенности иммуногенности В-клеточных антигенов (см. 3.2.1.2), упоминалось, что некоторые свойства, придающие молекуле иммуногенность, реализуются через вовлечение в гуморальный иммунный ответ Т-клеток. Действительно, поскольку антитела образуются клетками В-ряда при участии Т-хелперов, на иммуногенность В-клеточных антигенов косвенно влияет способность этих молекул активировать  $CD4^+$  Т-хелперы и способность эпитопов встраиваться в молекулы МНС класса II.

Т-клеточные эпитопы обладают чрезвычайно широкой перекрестной реактивностью, существенно превосходящей таковую для эпитопов, распознаваемых В-клетками. Такая перекрестная реактивность в значительной степени определяется особенностями распознавания Т-клеточных эпитопов, в частности низкой аффинностью TCR к комплексу МНС–пептид. Вовлечение корцепторов влияет на уровень перекрестной реактивности. При распознавании с участием  $CD4$  кросс-реактивность выше, чем с участием  $CD8$ . Перекрестная реактивность TCR играет важную роль при развитии и селекции Т-клеток: как будет показано далее, в тимусе выживают только Т-лимфоциты, чьи клеточные рецепторы способны распознавать с умеренной степенью сродства собственные молекулы МНС, несущие аутологичные пептиды. После созревания Т-клетки должны распознавать «собственные» молекулы МНС, несущие чужеродные антигенные пептиды, что они и осуществляют на основе перекрестной реактивности.

Важная особенность Т-клеточного распознавания проявляется в ситуации, когда объектом распознавания являются сами молекулы МНС, как это имеет место при трансплантации чужеродных клеток и тканей, особенно аллогенных, т.е. принадлежащих тому же виду, но генетически отличных. В этом случае могут быть задействованы 2 механизма распознавания. С одной стороны, Т-клетки могут распознавать пептидные фрагменты донорских молекул МНС, в составе молекул МНС хозяина. Так распознаются продукты «слабых» генов гистосовместимости (т.е. не МНС) и частично — продукты МНС. Другой вариант — «прямое» распознавание чужеродной молекулы МНС рецептором Т-клетки. Детали этого распознавания не выяснены. По-видимому, чужеродная молекула МНС, независимо от специфичности презентуемого пептида, «рассматривается» рецептором Т-лимфоцита как «измененное свое».

#### 3.2.2.4. Суперантигены

Особый вариант распознавания Т-клетками чужеродных молекул был открыт при изучении **суперантигенов**. Так называют продукты патогенов (экзотоксины, белковые компоненты вирусов), распознаваемые Т-лимфоцитами с помощью TCR, но без участия его активного центра. АПК презентуют суперантигены Т-клеткам, но не поглощают и не процессируют их. Суперантигены обладают сродством к молекулам МНС-II (но не МНС-I) и



**Рис. 3.34.** Стерические основы распознавания Т-клетками комплекса молекулы главного комплекса гистосовместимости с антигенным пептидом и суперантигенов

связываются с их «боковой» поверхностью.  $CD4^+$  Т-лимфоциты распознают суперантигены при помощи TCR, но во взаимодействие вовлекается участок V-домена  $\beta$ -цепи, не связывающий антиген (рис. 3.34). Например, стафилококковый экзотоксин — суперантиген SEB — связывается с одной стороны с  $\alpha_1$ -доменом молекулы MHC-II, а с другой — с  $\beta$ -цепью TCR, семейств  $V\beta 7$  и  $V\beta 8$ . В результате в реакцию на суперантигены вовлекаются не отдельные клоны, а все Т-клетки, экспрессирующие TCR семейств, к которым обладает сродством данный суперантиген. Обычно доля вовлекаемых  $CD4^+$  Т-клеток составляет 20–30% от их общего числа.  $CD8^+$  Т-клетки при этом не активируются, поскольку их TCR не обладают сродством к молекулам MHC-II, с которыми взаимодействует суперантиген. В результате массовой активации Т-хелперов происходит неадекватный выброс цитокинов, а затем массовая гибель Т-клеток по механизму апоптоза. Деления реагирующих клонов осуществляется в 3 стадии: острую (в течение 12–20 ч — апоптоз без делений), подострую (апоптоз после 3–5-дневной пролиферации) и хроническую (после длительной персистенции суперантигена). Это вносит свой вклад в патогенез соответствующих инфекционных заболеваний.

### 3.3. ЛИМФОИДНЫЕ КЛЕТКИ

Лимфоциты — ключевые клетки адаптивного иммунитета. Они несут антигенраспознающие рецепторы и выполняют основные эффекторные и регуляторные функции. Лишь естественные киллеры, или НК-клетки, не способны распознавать индивидуальные антигены и относятся к клеткам врожденного иммунитета, занимая в нем обособленное место. К клеткам врожденного иммунитета или к «промежуточной зоне» между врожденным

и адаптивным иммунитетом относят также  $\gamma\delta$ T-, NKT-, B1- клетки, а также В-лимфоциты маргинальной зоны селезенки. Тем не менее, учитывая общность происхождения этих лимфоцитов и «классических» Т- и В-клеток, рассмотрим их в разделе, посвященном адаптивному иммунитету.

В главе 1 были приведены основные характеристики лимфоцитов и в общих чертах охарактеризована их роль в иммунитете. Лимфоциты — клетки малого размера (6–8 мкм), имеющие округлую форму с большим бобовидным ядром, занимающим почти всю клетку, и слабо выраженной цитоплазмой, бедной гранулами. Однако морфология не может служить специфичным и надежным признаком для идентификации лимфоцитов, поскольку сходной морфологией обладают и другие клетки в период функционального покоя (например, кроветворные стволовые клетки). Специфическим признаком Т- и В-лимфоцитов является наличие на их поверхности антигенраспознающих рецепторов. Популяции Т- и В-клеток имеют клональную структуру: в процессе дифференцировки каждая клетка приобретает рецептор уникальной специфичности. При встрече с антигеном и активации лимфоциты пролиферируют, образуя клон, каждая клетка которого несет рецептор точно такой же специфичности, что и «материнская» клетка. Клетки разных клонов отличаются по структуре и специфичности антигенраспознающих рецепторов. Напомним, что Т-лимфоциты дифференцируются в тимусе, а В-лимфоциты развиваются у птиц в бурсе (сумке) Фабриция, а у млекопитающих — в костном мозгу.

Наиболее общие свойства и маркеры клеток, принадлежащих к основным популяциям лимфоцитов, а также внутриклеточные факторы, определяющие их дифференцировку (дифференцировочные факторы), представлены в табл. 3.10 и на рис. 3.35. На рис. 3.36 показана сравнительная характеристика мембранного фенотипа зрелых Т- и В-лимфоцитов.

**Таблица 3.10.** Характеристика основных популяций лимфоцитов человека

Признак	В-лимфоциты	Т-лимфоциты	НК-клетки
Органы, в которых развиваются клетки	Костный мозг	Тимус	Костный мозг
Рецептор для антигена	В-клеточный рецептор	Т-клеточный рецептор ( $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$ )	Нет
Распознаваемые молекулы	Свободный антиген	Пептиды или липиды в составе молекул гистосовместимости	Стрессорные молекулы, молекулы главного комплекса гистосовместимости
Основные мембранные маркеры	CD19, мембранный иммуноглобулин (менее специфичны CD20, CD21, CD72)	Комплекс CD3–TCR (менее специфичны CD2, CD7)	CD56 (менее специфичны NKG2, KIR и др.)
Маркеры субпопуляций	CD5, CD43	CD4, CD8	CD16
Содержание в крови, %	10–18	65–75	10–20
Рециркуляция	Слабая	Сильная	Отсутствует

Окончание табл. 3.10

Признак	В-лимфоциты	Т-лимфоциты	НК-клетки
Функция	Предшественники клеток, секретирующих антитела	Предшественники эффекторных (хелперных, цитотоксических) и регуляторных Т-клеток	Цитотоксические клетки

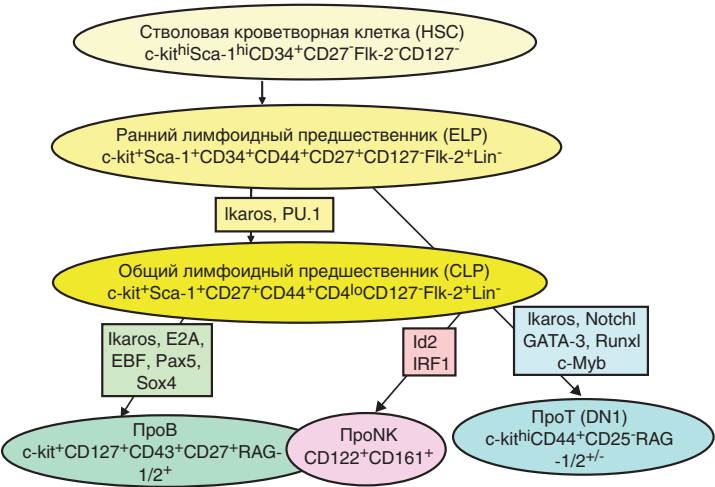


Рис. 3.35. Ранние этапы дифференцировки Т- и В-лимфоцитов с указанием дифференцировочных факторов и мембранных маркеров. Эллипсы означают клетки (указаны их мембранные маркеры), в прямоугольниках указаны дифференцировочные факторы

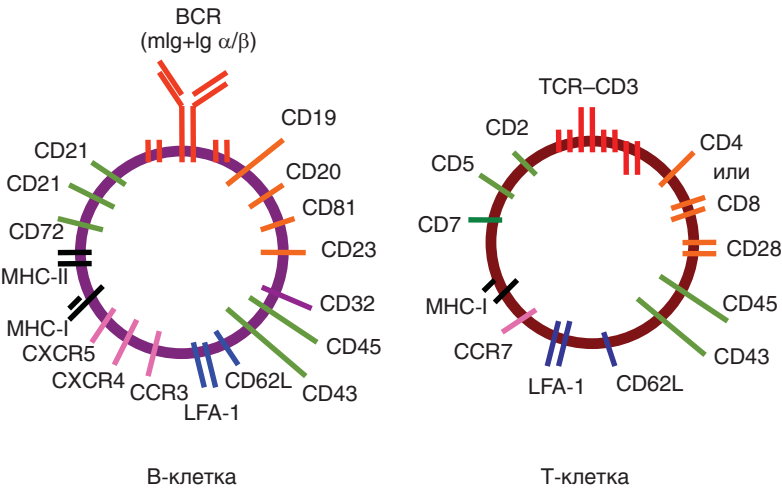


Рис. 3.36. Мембранные маркеры Т- и В-клеток. Мембранные молекулы отмечены линиями, пересекающими круг. Цветом выделены разные функциональные группы молекул

### 3.3.1. В-лимфоциты

Выделяют несколько субпопуляций В-клеток: В1, В2 и В клетки маргинальной зоны (МЗВ). Основная из них — В2-лимфоциты, или «обычные» В-клетки. Практически все данные о В-лимфоцитах получены на В2-клетках. Им посвящен материал, представленный в двух первых разделах главы. Другие субпопуляции будут рассмотрены в специальном разделе (3.1.1.3).

#### 3.3.1.1. Характеристика В-лимфоцитов

Основное свойство В-лимфоцитов — экспрессия иммуноглобулинового рецептора для распознавания антигенов — BCR. На поверхности зрелой В-клетки содержится около 150 000 комплексов BCR.

Напомним, что на мембране зрелой наивной В-клетки (т.е. В-клетки, ранее не контактировавшей с антигеном), содержатся иммуноглобулины классов IgM и IgD. Если IgM-антитела, секретируемые клеткой, являются пентамерами (т.е. содержит 5 мономерных структур IgM), мембранный IgM В-клеточного рецептора представляет собой мономер. Для зрелых В2-клеток характерна низкая экспрессия мембранного IgM и высокая — IgD. После активации антигеном (т.е. в ходе иммунного ответа) класс антигенраспознающего рецептора В-клетки может изменяться: вместо IgM и IgD на мембране появляются иммуноглобулины других классов — IgG, IgE и IgA. Н-цепи мембранных иммуноглобулинов отличаются от соответствующих молекул растворимых иммуноглобулинов-антител наличием на С-конце двух дополнительных участков — трансмембранного и цитоплазматического. При помощи трансмембранного участка молекула иммуноглобулина встраивается в мембрану клетки (о переключении изотипов, а также переходе от мембранной к растворимой форме иммуноглобулинов см. раздел 3.1.4.4).

Антигенраспознающий рецептор В-клеток (BCR) уже рассматривался выше (см. рис. 3.7). В состав BCR входит также ряд молекул, относящихся к суперсемейству иммуноглобулинов. С мембранными иммуноглобулинами нековалентно связаны 2 пары молекул — гетеродимеры, содержащие полипептидные цепи Ig $\alpha$  (CD79a) и Ig $\beta$  (CD79b). Обе полипептидные цепи встроены в мембрану В-лимфоцита. Их цитоплазматическая часть контактирует с тирозинкиназами Fyn, Lck, Blk, что позволяет им участвовать в передаче сигнала о связывании антигена внутрь клетки. С BCR ассоциировано еще несколько мембранных молекул — CD19, CD21 (рецептор для комплемента CR2) и CD81. Они не являются интегральной частью рецептора, но при взаимодействии с антигеном между ними и В-клеточным рецептором устанавливается связь, и они вносят существенный вклад в усиление активационного сигнала, поступающего в клетку от рецептора. Особенно четко это показано для молекулы CD21, являющейся рецептором для комплемента (CR2) и связывающего фрагмент C3b после взаимодействия с антигеном (см. 3.6.2.1). Молекулы, связанные с BCR, рассматривают как маркеры В-лимфоцитов и их экспрессию определяют (с помощью моноклональных антител) для подсчета численности В-клеток. Однако строгоспецифичной для В-лимфоцитов является только молекула CD19. Маркером фолликулярных, В2-клеток является мембранная молекула CD23.

На поверхности В-лимфоцитов конститутивно или под влиянием активации экспрессируются также молекулы, необходимые для выполнения функ-

ций, не связанных с распознаванием антигена и выработкой антител. Так, В-клетки несут на поверхности молекулы МНС не только I, но и II класса, а также костимулирующие молекулы CD40, CD86, а при активации — также CD80. Благодаря экспрессии этих молекул В-лимфоциты могут выполнять роль «профессиональных» АПК. В-клетки экспрессируют молекулы адгезии ( $\beta_1$ -интегрины VLA-2 и VLA-4,  $\beta_2$ -интегрин LFA-1, L-селектин CD62L и др.), позволяющие им мигрировать из сосудов и перемещаться в тканях. Присутствие на их поверхности Fc-рецепторов (Fc $\gamma$ RIIB — CD32) и уже упомянутых рецепторов для комплемента (CR2) в регуляции активности В-клеток играет большую роль, чем для выполнения ими эффекторных функций.

В-клетки экспрессируют многочисленные рецепторы для цитокинов, из которых наиболее важны рецепторы для IL-4, IL-5, IL-6, IL-2, IL-1, IL-10 и некоторых других. На их поверхности присутствуют рецепторы для цитокинов семейства TNF: BAFF (*B-cell activating factor of TNF family*) — BAFF-R, BCMS, TAC-1, а также APRIL (*A proliferation inducing ligand*) — HSPG. Эти цитокины защищают В-клетки от развития апоптоза и выполняют гомеостатическую функцию, поддерживая численность этих клеток на постоянном уровне. На В-лимфоцитах представлены рецепторы для хемокинов: например, CXCR4 (для SDF-1), CXCR5 (для BLC, служащего основным хемоаттрактантом для наивных В-клеток), CCR3 (для эотаксинов), CCR6 (для LARC).

Главное средоточие В2-клеток — лимфоидные фолликулы — наиболее универсальная лимфоидная структура, которая может входить в состав вторичных лимфоидных органов или существовать самостоятельно. В связи с этим В2-клетки иногда называют фолликулярными В-лимфоцитами. В2-клетки выявляют в костном мозгу, в пространстве вокруг синусоидов. Кроме того, В-клетки, относящиеся к различным субпопуляциям, присутствуют в значительных количествах в межфолликулярных областях, в мозговых шнурах лимфатических узлов, краевых зонах белой пульпы селезенки. В виде диффузно распределенных клеток В-лимфоциты представлены в соединительнотканых отделах барьерных тканей — дерме, собственной пластине слизистых оболочек, подслизистом слое. В2-лимфоциты рециркулируют, хотя и значительно слабее, чем Т-клетки. Их содержание в кровотоке невелико: по данным разных авторов, В-клетки составляют 10–13% от общего числа лимфоцитов крови (нормальный разброс — 5–25%). Абсолютное содержание В-лимфоцитов в крови составляет  $110\text{--}375 \times 10^9/\text{л}$ .

Ранее В-лимфоциты считали короткоживущими клетками. Действительно, вне фолликулов В2-клетки живут около недели. Однако в их естественном микроокружении В-клетки способны существовать достаточно долго — в течение нескольких недель и даже месяцев. Срок полуобновления пула В-клеток при действии повреждающих факторов составляет 13 сут. Главные факторы, поддерживающие жизнеспособность В-лимфоцитов, — цитокины семейства TNF — BAFF и APRIL.

### 3.3.1.2. Развитие В-лимфоцитов

У взрослого человека и большинства млекопитающих, включая грызунов, В-лимфоциты развиваются в костном мозгу, а в период эмбрионального развития — в фетальной печени. У птиц В-клетки развиваются в бурсе Фабриция, у жвачных млекопитающих — в кишечнике (см. раздел 3.4.1.3).

Заключительные этапы развития В-клетки проходят вне костного мозга во вторичных лимфоидных органах.

#### **Общий лимфоидный предшественник**

В-клетки, как и другие популяции лимфоцитов, развиваются из общего лимфоидного предшественника — CLP (от англ. *common lymphoid progenitor*), который, в свою очередь, происходит от полипотентной кроветворной стволовой клетки (см. раздел 2.1.1). Наиболее ранним признаком обособления лимфоидного предшественника от общего ствола считают экспрессию транскрипционного фактора Icaos, обеспечивающего ремоделирование хроматина, что делает доступными для действия ядерных дифференцировочных факторов гены, важные для развития лимфоцитов.

Как и более ранние родоначальные клетки, а также общий миелоидный предшественник, CLP лишен маркеров, свойственных основным линиям кроветворных клеток (линейных маркеров). Подобно стволовым клеткам, CLP экспрессируют молекулу CD34, но помимо нее несут мембранную молекулу CD45RA. Обычно CLP имеют также рецепторы для гемопоэтических факторов — c-Kit (для SCF) и Flt-3 (для лимфопоэтического фактора Flt-3L). Все это отличает CLP от общих миелоидных предшественников. Одна часть CLP несет на своей поверхности молекулу CD7, другая — CD10.

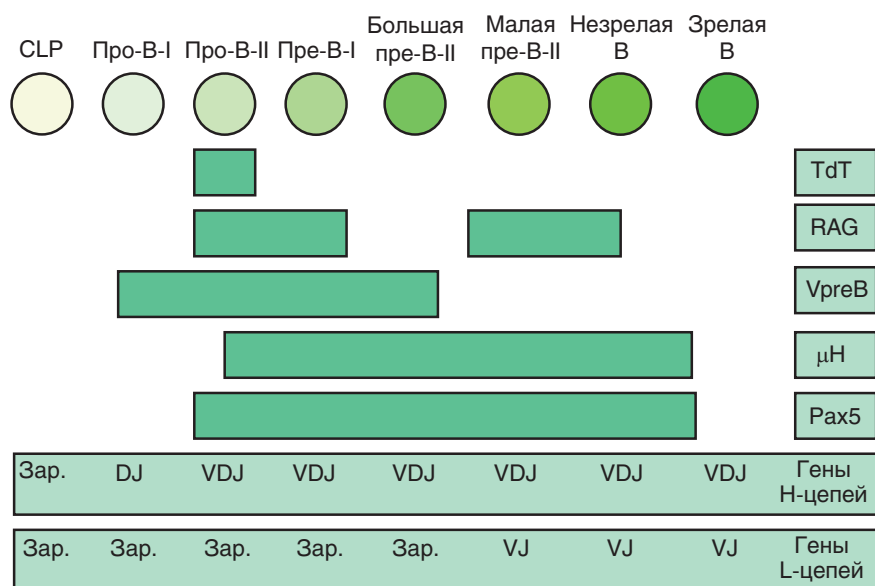
CD10<sup>+</sup> CLP со временем дополнительно экспрессирует рецептор для IL-7 (CD127) — фактора роста для всех незрелых форм лимфоидных клеток. Они дают начало В-лимфоцитам и, частично, плазмцитоподобным дендритным клеткам.

#### **Дифференцировка В-лимфоцитов**

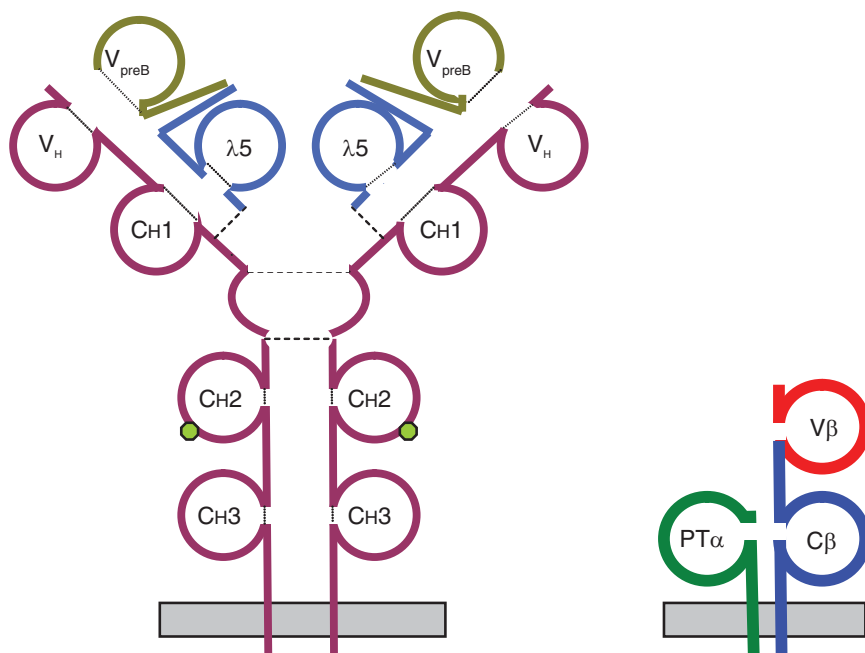
Основное событие дифференцировки В-клеток — формирование BCR, а точнее, лежащая в его основе перестройка V-генов иммуноглобулинов. Выделяют несколько стадий развития В-лимфоцитов: про-В (от англ. *progenitor* — предок), пре-В (от англ. *precursor* — предшественник), незрелые В и зрелые наивные В-клетки. Стадии про-В- и пре-В-клеток в свою очередь подразделяют на подстадии I и II (соответственно, ранние и поздние). На стадии про-В-II перестраиваются гены H-цепей. На стадии пре-В «проверяется» правильность прошедшей реаранжировки и перестраиваются гены L-цепей. На стадии незрелой В-клетки белковый продукт перестроенных генов иммуноглобулинов экспрессируется на мембране клетки в виде мембранного IgM, на стадии зрелой В-клетки к нему присоединяется IgD.

Реаранжировка V-генов иммуноглобулина описана выше (см. раздел 3.1.4.1). В этом разделе рассмотрим осуществление этого процесса в связи со стадиями дифференцировки В-лимфоцитов. Перестройку V-генов в В-клетках контролирует микроокружение, индуцирующее экспрессию в них вышеупомянутых дифференцировочных факторов. Развитие лимфоцитов в направлении В-клеток направляют факторы E2A, EBF и Pax5 (см. рис. 3.35). Экспрессию Pax5 (*Paired box protein 5*) рассматривают как ключевой маркер обособления В-линии. Pax5 имеет прямое отношение к включению реаранжировки V-генов в В-клетках и экспрессии молекулы CD19. Фактор EBF отвечает за экспрессию гена корцептора Igα — наиболее раннего белкового маркера В-лимфоцитов, появляющегося (вначале внутриклеточно) уже на стадии про-В-I. Затем (на стадии про-В-II) на поверхности В-клетки экспрессируется молекула CD19.

Периоды экспрессии генов, участвующих в формировании зрелого BCR в процессе развития В-лимфоцитов, представлены на рис. 3.37. На стадии про-В-II экспрессируются гены *RAG1* и *RAG2*, продукты которых (эндонуклеазы) отвечают за включение процесса реаранжировки V-генов, а также ген, кодирующий фермент терминальную дезоксирибонуклеотидилтрансферазу (TdT), обеспечивающий нематричное добавление нуклеотидов при D-J рекомбинации. Первыми перестраиваются V-гены H-цепей ( $V_H$ -гены). Этот процесс осуществляется на стадии про-В-II. Сначала перестраиваются случайно выбранные D- и J-сегменты, в результате чего формируется объединенный участок DNJH. Этот процесс может происходить одновременно на обоих хромосомах. Неудачи при такой перестройке редки, поскольку обычная их причина — сдвиг рамки считывания последовательности ДНК — не влияет на копирование D-сегментов (они могут считываться без ограничения конкретной рамкой). Второй наиболее ответственный этап состоит в соединении случайного зародышевого V-сегмента и перестроенного DJ-сегмента и формировании «зрелого» гена VDJ. Этот процесс проходит на стадии про-В-II клеток сначала только в одной из двух хромосом. Вероятность успешной перестройки на этом этапе (соответствия допустимой рамке считывания) составляет 1/3, поскольку кодон включает 3 нуклеотида. При успешном завершении этого процесса экспрессируется готовый продукт — перестроенная H-цепь, а перестройка гомологичного гена на другой хромосоме блокируется. Если реаранжировка прошла неудачно, перестраивается  $V_H$ -ген на другой хромосоме. Частота успешных



**Рис. 3.37.** Динамика перестройки V-генов иммуноглобулинов и экспрессии генов, продукты которых участвуют в реализации этого процесса. Прямоугольники обозначают стадии, на которых экспрессируются указанные гены. Внизу указано состояние перестройки V-генов H- и L-цепей: Зар. — зародышевая конфигурация гена



**Рис. 3.38.** Структура пре-В-клеточного и пре-Т-клеточного рецепторов. Обращает на себя внимание присутствие необычных доменов в суррогатных L-цепях и продукте гена PTα

перестроек генов на обеих хромосомах составляет около 55% в соответствии с расчетом:  $0,33 + (0,33 \times 0,67) = 0,55$ , т.е. 55%. Неудачная реаранжировка гена на второй хромосоме приводит к гибели клетки по механизму апоптоза.

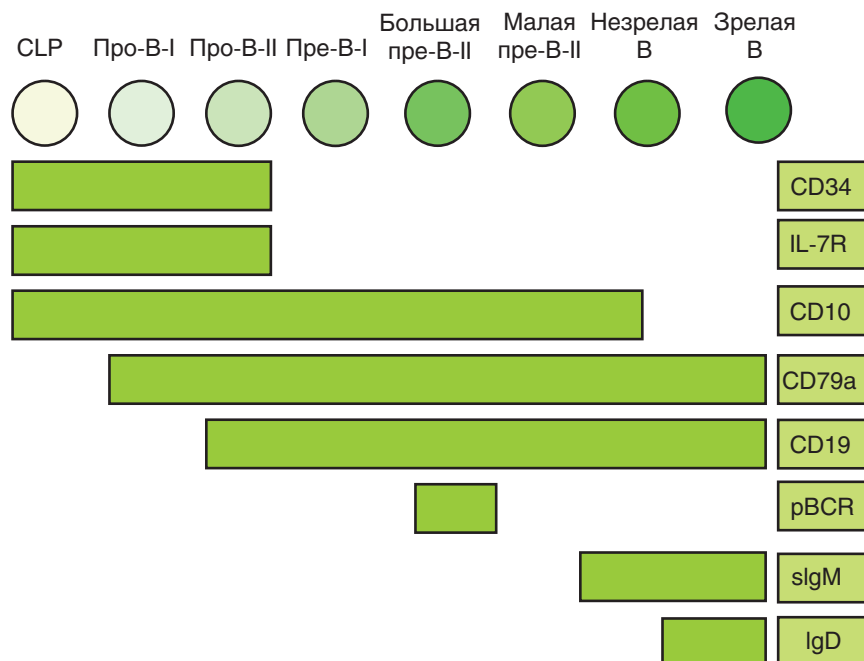
Успешная перестройка V<sub>H</sub>-гена приводит к экспрессии μ-цепи, что знаменует переход клетки-предшественника на стадию пре-В-I клеток. μ-Цепь появляется в цитоплазме пре-В-клетки, а также в составе мембранного продукта, называемого pre-BCR (рис. 3.38). Экспрессия pre-BCR сигнализирует об успешном завершении перестройки V<sub>H</sub>-генов. Помимо μ-цепи, pre-BCR содержит так называемую суррогатную L-цепь. Она состоит из продуктов двух генов — V<sub>preB</sub> и λ5. Эти молекулы уже присутствуют в клетке на момент окончания перестройки гена μ-цепи. Как и при построении нормального зрелого BCR, к пре-В-рецептору присоединяются сигнальные корецепторные молекулы Igα и Igβ. Полагают, что в данном случае сигнал от пре-В-рецептора возникает не вследствие связывания какого-то лиганда, а как результат правильной сборки и встраивания данной молекулы в мембрану клетки. Это событие представляет первую контрольную точку в процессе развития В-клетки. Сигнал от pre-BCR необходим для выживания пре-В-клеток (при этом усиливается экспрессия антиапоптотического фактора Bcl-2), их пролиферации (на стадиях пре-В-I и пре-В-II) и перехода к очередному этапу перестройки V-генов. В результате пролиферации число пре-В-клеток увеличивается в 20 раз. Выполнив свою функцию, пре-В-рецептор исчезает с поверхности В-клетки и больше не экспрессируется.

Перестройка  $V_L$ -генов происходит на стадии пре-В-II. Ей предшествует возобновление временно прекращавшейся экспрессии генов *RAG1* и *RAG2*. Последовательность перестройки в принципе такая же, как и для  $V_H$ -гена, однако имеется 2 основных отличия. Во-первых, в комплексе зародышевого  $V_L$ -гена отсутствует D-сегмент, поэтому соединяются сразу V- и J-сегменты зародышевого гена. Во-вторых, существует 2 гена L-цепей, кодирующие взаимозаменяемые  $\kappa$ - и  $\lambda$ -цепи. Они подвергаются перестройке в определенной последовательности. Сначала перестраивается V-ген  $\kappa$ -цепи на одной их хромосом. При неудаче перестраивается ген  $\kappa$ -цепи на другой хромосоме. Только при неудачной перестройке обоих  $V_\kappa$ -генов в процесс вовлекаются поочередно  $V_\lambda$ -гены сначала одной, затем другой хромосомы. В результате вероятность успешной перестройки  $V_L$ -генов увеличивается в 2 раза. Кроме того, при неудачной перестройке  $V_L$ -генов процесс повторяется с вовлечением «дистальных» (т.е. удаленных от J-сегмента) V-сегментов, редко вовлекаемых в перестройку при «первой попытке». То обстоятельство, что в перестройку сначала вовлекаются гены  $\kappa$ - и лишь затем  $\lambda$ -цепи, обуславливает более частое использование для построения молекулы иммуноглобулина  $\kappa$ -, чем  $\lambda$ -цепей. При перестройке генов L-цепей TdT не экспрессируется, а следовательно нематричной достройки олигонуклеотидов не происходит, т.е. N-вставки в V-генах L-цепей отсутствуют.

Успешная перестройка  $V_L$ -генов завершается экспрессией L-цепей, которые, соединяясь с H-цепями, формируют полноценную молекулу иммуноглобулина. «Зрелая» молекула иммуноглобулина, встроенная в мембрану эндоплазматического ретикула, доставляется на поверхность В-клетки. При этом на поверхности лимфоцита уже присутствуют все остальные компоненты BCR. При успешной сборке и экспрессии зрелого рецептора, В-клетка получает второй контрольный сигнал, приводящий к прекращению экспрессии генов *RAG1* и *RAG2*.

Первым типом H-цепей, который синтезируется в созревающей клетке и появляется на ее поверхности, является IgM. Стадию, на которой на поверхности В-клетки присутствуют иммуноглобулины только этого изотипа, называют стадией незрелой В-клетки. Завершающее событие в созревании В-лимфоцита — экспрессия на его поверхности IgD (вместе с IgM, а не вместо него). Хотя суммарная экспрессия мембранных иммуноглобулинов и, в целом, BCR при этом возрастает, экспрессия IgM несколько снижается. Кроме того, при созревании В2-лимфоциты экспрессируют мембранные молекулы CD21 и CD23. Изменение экспрессии наиболее значимых мембранных молекул В-лимфоцитов в процессе их развития отражено на рис. 3.39.

Поскольку успешная перестройка каждого V-гена блокирует перестройку аллельных генов (т.е. осуществляется «аллельное исключение»), все молекулы иммуноглобулина, присутствующие на поверхности В-клетки, идентичны по изотипу L-цепей и по структуре V-генов. Это обуславливает одинаковую специфичность рецепторных иммуноглобулинов В-клетки, т.е. все рецепторы конкретного В-лимфоцита имеют одинаковое сродство к антигену. Поскольку перестройка V-генов происходит в каждой клетке автономно, все созревающие В-лимфоциты уникальны по специфичности их рецепторов. Последующая пролиферация В-клеток приводит к образованию клонов, в пределах каждого из которых В-клетки несут идентичные по специфичности

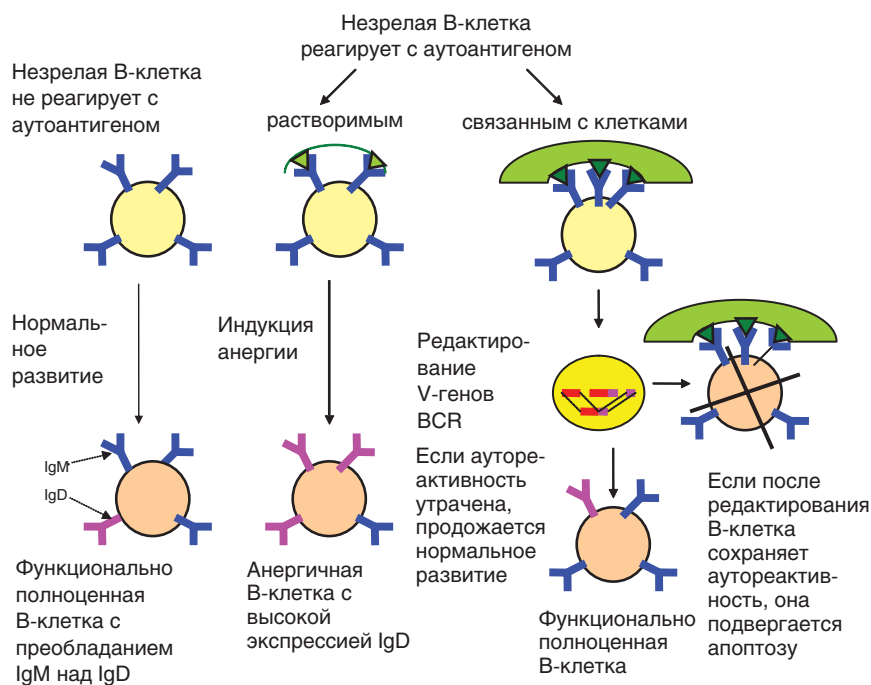


**Рис. 3.39.** Экспрессия мембранных маркерных молекул при созревании В-лимфоцитов. Указаны стадии дифференцировки В-клеток, на которых они экспрессируют соответствующие молекулы

BCR, отличающиеся от таковой В-клеток других клонов. Таким образом формируется клonalная структура — популяция В-лимфоцитов.

В процессе созревания В-лимфоциты подвергаются действию факторов, обеспечивающих их жизнеспособность и пролиферацию. В отсутствие таких факторов созревающие В-клетки погибают. Основным ростовым фактором В-лимфоцитов на ранних этапах их развития — IL-7 (у мышей), вырабатываемый клетками стромы костного мозга и лимфоидных органов. IL-7 поддерживает жизнеспособность и обеспечивает пролиферацию CLP, а также предшественников Т- и В-лимфоцитов. Все эти клетки несут на мембране рецепторы для IL-7, состоящие из  $\alpha$ - и  $\gamma$ -цепей ( $\gamma$ -цепь — общая для рецепторов нескольких цитокинов, о чем уже упоминалось). Однако у человека IL-7 не играет такой важной роли в развитии В-клеток: мутации генов IL-7 или его рецептора приводят к блокированию развития Т-, но не В-лимфоцитов. Природа фактора-двойника IL-7, обеспечивающего развитие В-лимфоцитов человека в этой ситуации, неизвестна.

Установлено, что 55–75% В-клеток, образующихся в костном мозгу, специфичны к собственным антигенам организма — аутоантигенам. Уже в костном мозгу значительная часть новообразованных В-клеток распознает аутоантигены. Однако незрелые В-клетки не активируются при связывании их BCR с антигеном. Распознавание аутоантигенов служит сигналом к «редактированию» генов BCR. Этот процесс заключается в повторной перестройке V-генов с вовлечением сегментов, не задействованных



**Рис. 3.40.** Отрицательная селекция В-лимфоцитов в костном мозгу: реакции незрелых В-клеток на распознавание аутоантигенов — индукция анергии, редактирование V-генов и апоптоз

в предыдущей реаранжировке. При успешном редактировании В-клетка теряет аутореактивность. Если же этого не происходит, клетки выбраковываются путем апоптоза или подвергается очередным этапам селекции в периферическом отделе иммунной системы (рис. 3.40).

### *Переходные фазы развития и селекция В-клеток*

В-клетки эмигрируют на периферию, полностью не завершив своего развития. Переходные стадии развития, которые они проходят на периферии, обозначают T1, T2 и T3 (от англ. *Transient*). Фенотип В-клеток на стадии T1 —  $\text{IgM}^{\text{hi}} \text{IgD}^{-/\text{lo}} \text{CD23}^{-} \text{CD21}^{\text{lo}} \text{CD24}^{\text{hi}}$  (молекула CD24 показывает, что клетка недавно покинула костный мозг). T1 В-клетки получают через BCR-сигнал, обеспечивающий их выживание, по-видимому, без участия антигенов (положительная селекция) (табл. 3.11).

Затем В-клетки переходят на стадии T2 и T3, характеризующиеся фенотипом  $\text{IgM}^{\text{hi}} \text{IgD}^{\text{hi}} \text{CD21}^{\text{int}} \text{CD23}^{+}$  (*int* — промежуточная экспрессия) и  $\text{IgM}^{\text{lo}} \text{IgD}^{\text{hi}} \text{CD21}^{\text{int}} \text{CD23}^{+}$ . На этих этапах выживаемость клеток и их пролиферацию регулирует комбинация сигналов, поступающих через BCR (теперь уже под действием антигенов) и рецепторов для BAFF — BAFF-R, TAC-1, BCMA. Активирующие сигналы через BCR и BAFF приводят к экспрессии транскрипционных факторов NFκB, (классический и альтернативный факторы, имеющие состав, соответственно, p50RelA и p52RelB). Взаимодействие этих факторов играет важную роль в поддержании жизнеспособности В-клеток. Особенность T2 В-клеток —

Таблица 3.11. Селекция клонов лимфоцитов в процессе развития

Тип селекции	Объект селекции	Клетки, осуществляющие селекцию	Локализация процесса	Содержание процесса	Назначение процесса
<b>Селекция В-лимфоцитов</b>					
Положительная селекция	Незрелые В-клетки, стадия Т1	Клетки стромы костного мозга	Костный мозг, селезенка, лимфоузлы	Сигнал через В-клеточный рецептор, обеспечивающий выживаемость	Выход незрелых клеток в периферический пул В-лимфоцитов
Отрицательная селекция	Незрелые В-клетки, стадия Т2	Осуществляется без участия дополнительных клеток	Костный мозг, селезенка, лимфоузлы	Дефицит рецепции BAFF при ответе на аутоантиген	Элиминация аутоспецифических В-клеток
<b>Селекция Т-лимфоцитов</b>					
β-Селекция	DN3-тимоциты (дважды отрицательные CD44 <sup>-</sup> CD25 <sup>+</sup> тимоциты)	Осуществляется без участия дополнительных клеток	Субкапсулярный слой тимуса	Выживают и пролиферируют клетки, правильно перестроившие Vβ-ген TCR	Выборка клеток с дефектным геном Vβ. Подготовка к перестройке гена Vα
Положительная селекция	Дважды положительные тимоциты	Кортикальные эпителиальные клетки тимуса	Кора тимуса	Выживают клетки, способные распознавать молекулы МНС	Удаление клеток, не способных распознавать пептиды в составе молекул МНС (до 90%)
Отрицательная селекция	Дважды положительные/моноположительные тимоциты	Дендритные клетки, медуллярные эпителиальные клетки тимуса	Кортико-медуллярная зона, мозговой слой тимуса	Погибают клетки, распознающие аутологичные пептиды с высокой степенью сродства	Выборка потенциально аутоагрессивных Т-клеток (до 5% от числа незрелых тимоцитов)

низкая экспрессия рецепторов для BAFF. В результате В-клетки, связавшие антиген, не получают дополнительного сигнала через BAFF-рецепторы и подвергаются апоптозу. Поскольку на этом этапе развития в лимфоидных органах В-клетки реагируют исключительно с аутоантигенами, гибнут преимущественно В-лимфоциты аутореактивных клонов. Описанный механизм представляет периферический этап отрицательной селекции клонов В-клеток. Усиленная экспрессия рецепторов для BAFF на стадии T2 В-клеток приводит к индукции аутоиммунных процессов. Установлено, что наряду с механизмом апоптотической элиминации аутоспецифических В-клеток срабатывает менее радикальный механизм индукции анергии (т.е. неответственности) аутореактивных В-лимфоцитов. Обычно срок жизни таких клеток укорачивается, и они в конечном счете элиминируются в процессе естественного обновления популяции В-клеток. Несмотря на «щадающий» режим селекции, на этом этапе сохраняется лишь 10–30% В-клеток, вышедших из костного мозга, общие же потери В-клеток в процессе их развития превышают 95%. Экспрессия хемокинового рецептора CXCR5 позволяет выжившим клеткам мигрировать в фолликулы по градиенту хемокина CXCL13 (BLC).

После завершения переходной стадии развития В-клеток на их поверхности устанавливается нормальная экспрессия рецепторов для BAFF/APRIL и в ответ на связывание BCR с антигеном они не гибнут, а активируются и пролиферируют (см. раздел 3.5.2). Выжившие клетки представляют собой зрелые наивные В-лимфоциты, в совокупности образующие антигенраспознающий репертуар В-лимфоцитов, необходимый для обеспечения развития гуморального адаптивного иммунного ответа.

### 3.3.1.3. Субпопуляции В-лимфоцитов

Под субпопуляциями понимают разновидности клеток определенного типа, характеризующиеся наличием устойчивых различий по функциям и связанным с ними молекулярным маркерам. Выделяют 3 основные субпопуляции В-клеток (табл. 3.12, рис. 3.41). Одна из них рассмотрена выше — В2-клетки (иногда их называют обычными В-клетками), локализирующиеся преимущественно в селезенке, костном мозгу, лимфоузлах, пейеровых бляшках и отдельных фолликулах лимфоидной ткани кишечника. Гистологическая единица, являющаяся местом сосредоточения В2-клеток — лимфоидный фолликул. Эти клетки составляют подавляющее большинство циркулирующих В-лимфоцитов и играют основную роль в гуморальном иммунном ответе. Две другие субпопуляции — **В1- и В-клетки маргинальной зоны (МЗВ-клетки)**. Большинство данных о различных субпопуляциях В-лимфоцитов получено на мышах. Сведения о субпопуляциях В-клеток человека крайне скудны.

В1-клетки локализируются преимущественно в серозных полостях — брюшной и плевральной. Небольшое количество В1-лимфоцитов, преимущественно клетки, секретирующие антитела, выявляют в селезенке, где на их долю приходится 1–5% от числа В-клеток. Некоторые В1-клетки мигрируют (через сальник) в слизистую оболочку кишечника и брыжеечные лимфоузлы (до 50% IgA-продуцентов в лимфоидной ткани кишечника — В1-клетки). В лимфатических узлах у мыши они отсутствуют. Выделяют 2 субпопуляции В1-клеток. Основной дифференциальный признак при

Таблица 3.12. Субпопуляции В-лимфоцитов

Субпопуляция	Особенности V-генов иммуноглобулинов	Происхождение	Локализация	Маркеры	Оборот (T <sub>1/2</sub> восстановления пула)	Продуцируемые антитела
В1а	Без следов мутаций и N-вставок	Печень плода	Брюшная и другие серозные полости; частично — селезенка, <i>lamina propria</i> кишечника, единичные клетки в костном мозгу	IgM, IgD, CD5, CD45	Очень медленный	Антитела к бактериальным поли- и липополисахаридам, а также к другим тимуснезависимым антигенам, аутоантитела (IgM, IgA; редко IgG3)
В1b	Есть N-вставки, могут быть мутации (но значительно меньше, чем в В2)	Печень плода, частично костный мозг	То же	IgM, IgD, CD45	Нет данных	То же
ВМЗ	Мало мутаций	Костный мозг	Маргинальная зона селезенки	IgM, (IgD — +/-), CD38	21 нед	Антитела к бактериальным полисахаридам, поступающим из крови
В2 (обычные)	Перестроены, есть N-вставки, активный гипермутационный процесс	Костный мозг	В-зоны вторичных лимфоидных органов; рециркуляция, костный мозг	IgM, IgD, CD23, CD45, CXCR5	13 нед	Адаптивные антитела (IgM, IgG, IgA, IgE)

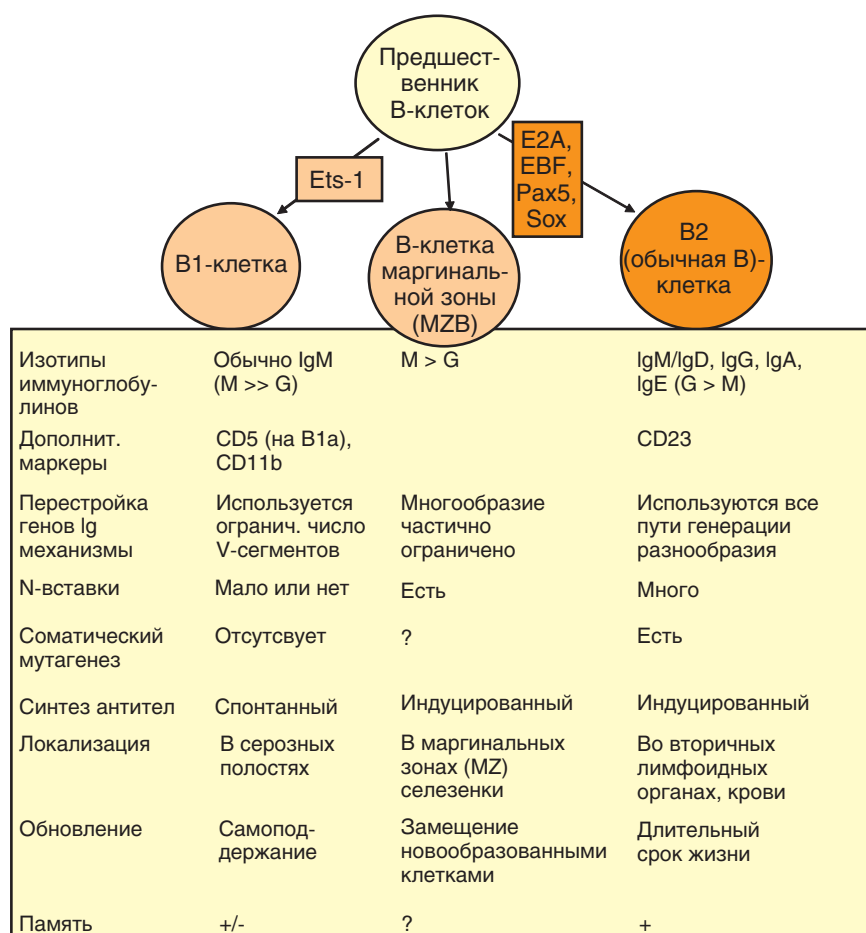


Рис. 3.41. Характеристика субпопуляций В-клеток

этом — экспрессия мембранной молекулы CD5 (известной как один из маркеров Т-клеток). В1а-клетки одновременно несут на поверхности молекулы IgM и CD5. CD5 отсутствует на всех остальных В-лимфоцитах, в том числе на В1b-клетках, в остальном очень схожих с В1а-клетками. Для В1-клеток характерен «активированный фенотип», что проявляется в экспрессии на их поверхности костимулирующих молекул CD80 и CD86. Это свойство обеспечивает способность В1-лимфоцитов выполнять функции АПК.

В1а- и В1b-клетки экспрессируют BCR, содержащий мембранную форму IgM. Известны исключения: описано переключение IgM на IgA в *lamina propria* кишечника. Перестроенные V-гены мембранного IgM В1а-клеток не содержат N-вставок (т.е. в их перестройке не участвует фермент TdT). Разнообразие V-генов В1-клеток существенно ниже, чем у В2-клеток. Это связано с различиями в условиях развития: В1а-клетки в онтогенезе появляются раньше других субпопуляций — еще до рождения. Они развиваются в печени плода при участии IL-5 и IL-10 из клеток-предшественников, отличных от таковых у обычных В-клеток. Еще в эмбриональном периоде В1-клетки мигрируют

в серозные полости, где они существуют в течение всей жизни организма. В1-клетки способны к самоподдержанию путем очень медленной пролиферации, восполняющей убыль клеток, погибающих по механизму апоптоза. В1b-клетки также развиваются в печени эмбрионов, а после рождения — в костном мозгу из других клеток-предшественников. В1b-лимфоциты расселяются на периферии несколько позже В1a-клеток — непосредственно перед рождением и сразу после него. При перестройке V-генов в В1b-клетках формируется некоторое количество N-вставок. В1b-клетки также мигрируют в серозные полости и сохраняются там путем самоподдержания.

Обе разновидности В1-клеток могут дифференцироваться в антителообразующие клетки без стимуляции антигеном. При этом они секретируют преимущественно IgM-антитела (в кишечнике — также IgA). Большинство этих антител специфично к собственным белкам организма (ДНК, гистонам, коллагену, компонентам цитоскелета, антигенам групп крови и т.д.); многие из них полиспецифичны, т.е. способны взаимодействовать с несколькими антигенами, в том числе аутологичными. Эти антитела имеют низкое сродство (аффинность) к антигенам, включая аутоантигены, и не способны вызвать повреждение тканей. Примерно половина сывороточного IgM секретируется В1-клетками. Естественные антитела, продуцируемые В1a-лимфоцитами, часто специфичны к микробным антигенам и опсонизируют патогены, играя важную роль в реакциях врожденного иммунитета. Эти клетки могут принимать участие в адаптивном иммунном ответе, что в большей степени свойственно В1b-клеткам. Ответ В1-клеток преимущественно тимуснезависимый (см. раздел 3.6.4.2). В1-клетки постоянно циркулируют между селезенкой и брюшной полостью, но не поступают в фолликулы, поскольку не экспрессируют CXCR5 — рецептор хемокина ВЛС (CXCL13). С этим связано то обстоятельство, что процессы «усовершенствования» гуморального иммунного ответа в виде переключения изотипов и повышения сродства к антигенам, не затрагивают или минимально затрагивают В1-клетки. В V-генах антител, продуцируемых В1b-клетками, выявляют следы мутационного процесса, значительно более слабого, чем в «классических» фолликулярных В2-клетках. Это также свидетельствует о том, что развитие В1b-антителопродуцентов происходит вне зародышевых центров.

Еще одна разновидность В-лимфоцитов — В-клетки маргинальной зоны (МЗВ). Они локализуются почти исключительно в маргинальной зоне селезенки, отделяющей белую пульпу от красной. Фенотипически эти клетки более сходны с В2-, чем с В1-клетками. Они происходят от тех же костномозговых клеток-предшественников. Основным мембранным иммуноглобулином МЗВ-клеток — IgM, экспрессируемый сильнее, чем на В2-клетках. В то же время IgD присутствует на мембране в очень малом количестве. Эти клетки сходны по своему фенотипу с активированными В-лимфоцитами. На них присутствуют молекулы CD69, CD25, CD38, в малом количестве CD23. Обращает на себя внимание наличие молекулы CD1d, участвующей в презентации липидных антигенов.

Отделение линии МЗВ-клеток от общей линии В2-клеток происходит на переходной стадии транзиторных клеток (Т3), когда будущие МЗВ-клетки ослабляют экспрессию не IgM (как В2-клетки), а IgD и утрачивают молекулу CD23. На МЗВ-лимфоцитах не экспрессируется хемокиновый рецептор

CXCR5, позволяющий клеткам мигрировать в фолликулы. Ключевой фактор дифференцировки MZB-клеток — Notch-2. Под влиянием сфингозин-1-фосфата и при участии молекул адгезии LFA-1 и VLA-4 они мигрируют в маргинальные зоны селезенки. MZB-клетки не участвуют в рециркуляции, но осуществляют «челночные» миграции до лимфоидных фолликулов и обратно, получая информацию об антигенах, поступающих в селезенку с кровью. Срок жизни MZB-лимфоцитов сопоставим со сроком жизни организма. Снижение численности MZB-клеток, вызываемое повреждающими факторами, достаточно быстро устраняется.

MZB-клетки участвуют в гуморальном иммунном ответе на возбудители, поступающие в кровотоки. Они осуществляют тимуснезависимый иммунный ответ на инкапсулированные патогены. Благодаря сильной экспрессии молекул MHC-II и костимулирующих молекул MZB-клетки обладают выраженной способностью к взаимодействию с Т-хелперами, однако их участие в тимусзависимом иммунном ответе изучено плохо. При ответе на антигены MZB-клетки дифференцируются в короткоживущие антителообразующие клетки. V-гены MZB-клеток редко затрагиваются мутациями, что характерно для развития плазматических клеток вне зародышевых центров. В этих клетках не происходит переключения классов иммуноглобулинов и даже MZB-клетки памяти несут на своей поверхности IgM, а не IgG. IgM<sup>+</sup> клетки памяти преобладают в маргинальной зоне селезенки человека.

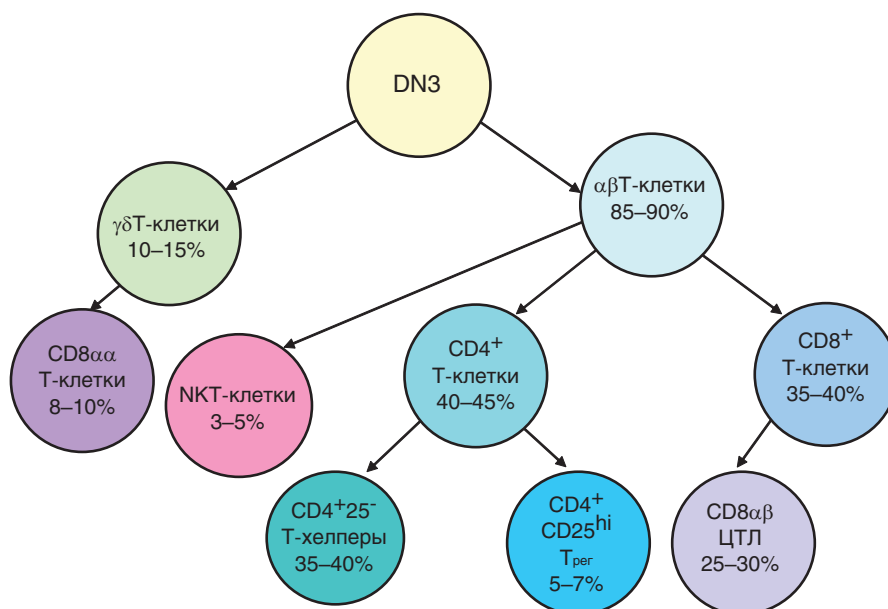
### 3.3.2. Т-лимфоциты

Т-клетки — разновидность лимфоцитов, основные этапы развития которых проходят в тимусе, что и определило их название (тимусзависимые, или Т-лимфоциты). Для них характерен определенный способ распознавания антигенов (большинство Т-клеток распознает комплекс антигенов с молекулами MHC) и участие в реализации иммунного ответа в качестве исполнительных и регуляторных клеток.

Т-лимфоциты морфологически неотличимы от В-лимфоцитов. Эти клетки дифференцируют по экспрессии на их поверхности маркерных молекул. Общий маркер для всех разновидностей этих Т-лимфоцитов, отсутствующий у других клеток, — молекулярный комплекс TCR—CD3. Как уже упоминалось, этот комплекс включает антигенраспознающий димер TCR и вспомогательный молекулярный комплекс CD3. Выявление CD3 — константных молекул, общих для всех разновидностей Т-лимфоцитов — применяют для идентификации Т-клеток (моноклональные анти-CD3-антитела обычно распознают  $\epsilon$ -цепь этого комплекса).

#### 3.3.2.1. Субпопуляции Т-клеток

Субпопуляции Т-клеток различаются по мембранным маркерам, а также способу распознавания антигена и функциям. Наивные Т-лимфоциты включают 2 основных варианта клеток, отличающихся по структуре TCR:  $\gamma\delta$ Т-клетки (TCR образован цепями  $\gamma$  и  $\delta$ ) и  $\alpha\beta$ Т-клетки (TCR образован цепями  $\alpha$  и  $\beta$ ). Т-клетка может нести только один вариант рецептора. Разделение на  $\gamma\delta$ Т- и  $\alpha\beta$ Т-клетки — наиболее фундаментальное проявление разнообразия Т-лимфоцитов. Однако этим гетерогенность Т-лимфоцитов не ограничивается. Выделяют еще несколько субпопуляций Т-клеток, обоз-



**Рис. 3.42.** Развитие естественных субпопуляций Т-лимфоцитов. Схематично представлена дифференцировка основных естественных субпопуляций Т-лимфоцитов, начиная от стадии DN3

начаемых как естественные, т.е. формирующиеся в процессе нормального развития, независимо от поступления в организм чужеродных антигенов (рис. 3.42). Это важно для отличия этой формы гетерогенности клеток от адаптивного разнообразия Т-клеток — их субпопуляций, формирующихся в ходе иммунного ответа (см. раздел 3.5.3).

В составе αβТ-клеток выявляют 4 субпопуляции. Две основные субпопуляции αβТ-лимфоцитов различают по экспрессии корецепторов CD8 или CD4 и, соответственно, по способу распознавания антигена — в составе молекул МНС-I или МНС-II (см. раздел 3.2.2). CD8+ Т-лимфоциты выполняют функции цитотоксических клеток, что и определило их название — цитотоксические Т-лимфоциты, или Т-киллеры. Большинство CD4+ Т-клеток относят к Т-хелперам (от англ. *helper* — помощник), поскольку Т-хелперы поставляют вспомогательные сигналы при активации В-лимфоцитов и макрофагов. Взаимодействие Т-хелперов с дендритными клетками служит пусковым событием Т-зависимого иммунного ответа.

Некоторые CD4+ Т-клетки, экспрессирующие внутриклеточный фактор FOXP3 и мембранные молекулы CD25 и CTLA-4 (CD152), образуют самостоятельную субпопуляцию естественных регуляторных Т-клеток (T<sub>per</sub>). Их основная функция — предотвращение реакции других Т-клеток на аутоантигены, а также ограничение (супрессия) любых форм иммунного ответа.

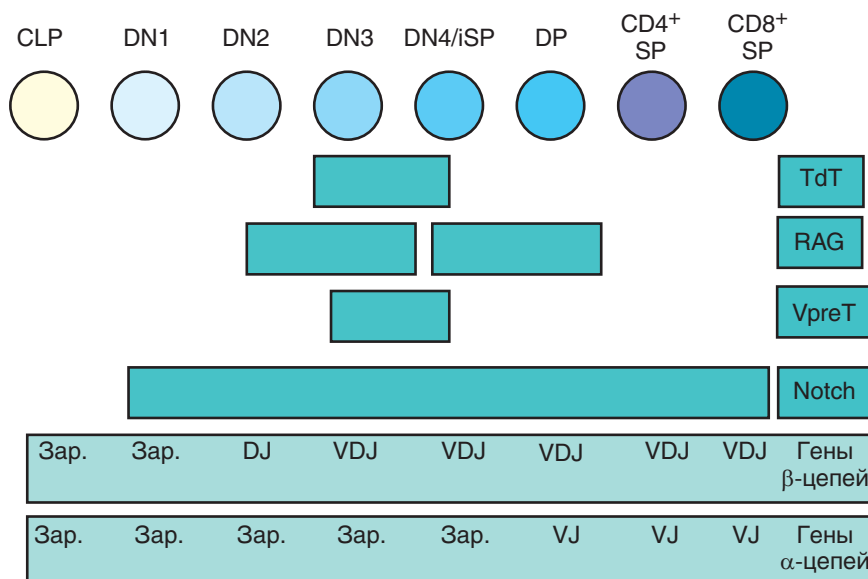
Особую субпопуляцию Т-лимфоцитов (а не НК-клеток!) образуют NKT-клетки, формирующиеся в процессе Т-лимфопоэза, но на поздних этапах развития приобретающие признаки НК-клеток. В результате они коэкспрессируют ключевые маркеры Т- и НК-клеток: на их поверхности представ-

лены комплекс TCR–CD3 и типичные молекулы NK-клеток CD56 и CD16, а также ингибирующие (KIR, NKRG2) и активирующие (NKG2D) рецепторы.

Вариабельность  $\gamma\delta$ TCR ограничена и спектр антигенов, распознаваемых  $\gamma\delta$ T-клетками, узок.  $\gamma\delta$ T-клетки распознают антиген независимо от молекул МНС. Поэтому корецепторы CD4 и CD8 не обязательно присутствуют на их поверхности. Эти клетки, слабо представленные во вторичных лимфоидных органах, сосредоточены преимущественно в барьерных тканях. Среди  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов выделяют субпопуляцию клеток, экспрессирующих гомодимерный вариант молекулы CD8 — CD8 $\alpha\alpha$  (CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$ T-клетки). Такие T-лимфоциты локализованы почти исключительно в лимфоидной ткани слизистых оболочек. У мышей CD8 $\alpha\alpha^+$  T-клетки выявляют среди как  $\gamma\delta$ T-, так и  $\alpha\beta$ T-клеток, тогда как у человека они принадлежат исключительно  $\gamma\delta$ T-субпопуляции.

Возможно, существуют и другие субпопуляции T-клеток. Так, в печени и костном мозгу (в значительно меньшей степени — в крови и вторичных лимфоидных органах) выявляют T-клетки, лишенные корецепторов (CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD8 $^-$ ). На периферии обнаруживают очень немногочисленные CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD8 $^+$  лимфоциты, по ряду свойств отличающиеся от незрелых кортикальных тимоцитов того же мембранного фенотипа. Функции тех и других клеток не установлены.

Среди большого числа субпопуляций T-клеток только две можно безусловно отнести к системе адаптивного иммунитета. Это CD4 $^+$  и CD8 $^+$   $\alpha\beta$ T-клетки. Все остальные субпопуляции в настоящее время обычно относят к клеткам врожденного иммунитета. Однако более справедливо присвоить им статус клеток «промежуточного типа» (*Innate-like*) (рис. 3.43).



**Рис. 3.43.** Динамика перестройки V-генов T-клеточного рецептора и экспрессии генов, продукты которых участвуют в реализации этого процесса. Прямоугольники обозначают стадии, на которых экспрессируются указанные гены. Внизу — состояние перестройки V-генов H- и L-цепей. Зар. — зародышевая конфигурация гена

В связи с тем, что их гистогенез неразрывно связан с развитием «классических» адаптивных Т-лимфоцитов, а также с наличием у всех субпопуляций Т-клеток клональной структуры и способности к антигенспецифическому распознаванию, рассматриваем все эти клетки в едином контексте.

### 3.3.2.2. «Классические» $\alpha\beta$ Т-клетки

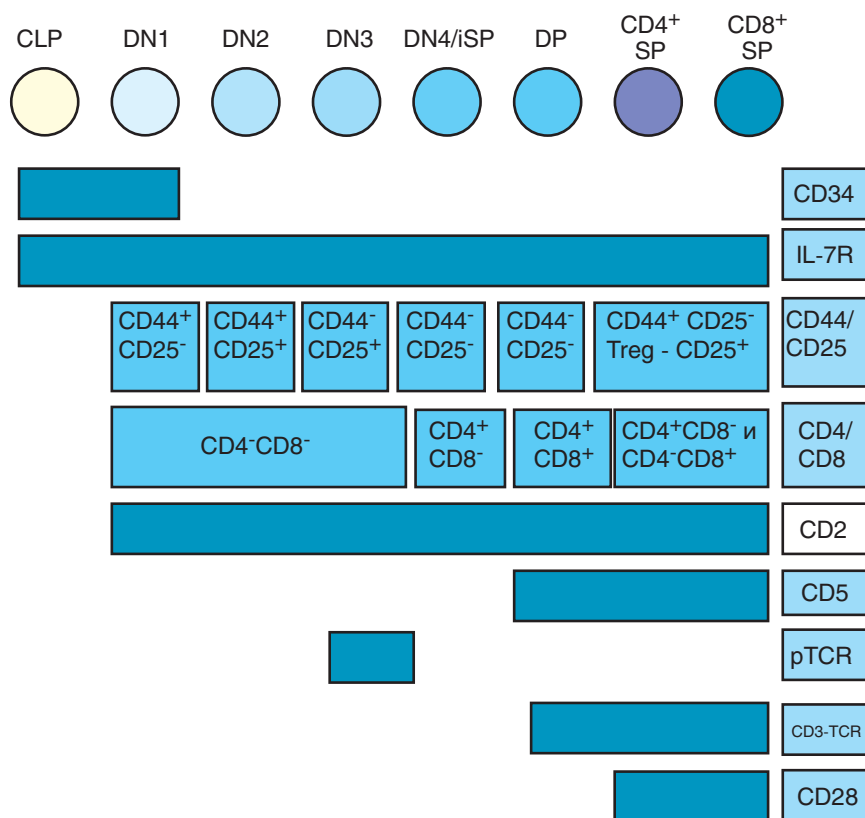
Подобно тому, как представление о В-клетках связано в первую очередь с «обычными» В2-лимфоцитами, так понятие о Т-клетках ассоциируется преимущественно с  $\alpha\beta$ Т-лимфоцитами, циркулирующими в крови и локализующимися во вторичных лимфоидных органах. Относительное содержание Т-лимфоцитов в крови составляет в среднем около 73% (55–85%) от общего числа лимфоцитов; абсолютное —  $(950\text{--}2100)\times 10^9$  клеток в литре. В большинстве лимфоидных структур Т-лимфоцитов содержится больше, чем В-клеток.

На поверхности  $\alpha\beta$ Т-клеток экспрессируется примерно в 5 раз меньше молекул TCR, чем BCR на поверхности В-лимфоцитов (30 000–40 000 TCR на клетку). Содержание комплексов CD3 примерно в 10 раз больше, чем TCR — около 300 000 молекул на клетку, что свидетельствует о присутствии на мембране молекул CD3, не связанных с TCR. Помимо TCR–CD3 зрелые Т-клетки экспрессируют молекулы CD2, CD5, CD7 (рис. 3.44). Иногда их используют в качестве маркеров для определения Т-лимфоцитов, однако это не вполне корректно, поскольку эти молекулы содержатся на некоторых других клетках (CD2 и CD7 — на NK-клетках, CD5 — на В1-лимфоцитах). Наиболее важные в функциональном отношении мембранные молекулы Т-клеток — корцепторы CD4 и CD8, служащие маркерами основных субпопуляций  $\alpha\beta$ Т-клеток (см. далее), а также костимулирующая молекула CD28, экспрессируемая на большинстве (около 80%) Т-клеток. Эти молекулы были охарактеризованы ранее (см. раздел 3.1.3.3).

Для наивных (не контактировавших с антигеном)  $\alpha\beta$ Т-клеток характерен высокий уровень экспрессии селектина L (CD62L) и хемокинового рецептора CCR7 (см. рис. 3.36). Эти молекулы определяют пути миграции Т-клеток (см. раздел 3.4.2.5). На Т-клетках содержатся также  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -интегрины (особенно LFA-1 и VLA-4) и рецепторы для цитокинов (для IL-7, IL-1, IL-2, IL-4, IL-15 и др.). Маркером наивных Т-клеток, отличающим их от клеток памяти, служит полноразмерная форма молекулы CD45 — CD45RA.

Т-лимфоциты — активно рециркулирующие клетки, о чем свидетельствует их высокое содержание в крови (см. выше). Основное место локализации Т-лимфоцитов в лимфоидных органах — тимусзависимые зоны. К ним относят паракортикальные зоны лимфатических узлов и параартериальные муфты селезенки. Вне Т-зон Т-лимфоциты непосредственно соседствуют с В-клетками.  $\alpha\beta$ Т-клетки локализованы также в барьерных тканях, где они численно преобладают над  $\gamma\delta$ Т-клетками.  $\alpha\beta$ Т-лимфоциты диффузно распределены в эпителиальных пластах барьерных тканей — слизистых оболочках и эпидермисе. Их выявляют также в соединительнотканых отделах барьерных тканей — субмукозе и дерме.

Т-лимфоциты относят к долгоживущим клеткам. Срок жизни различных субпопуляций наивных  $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов составляет месяцы и годы. Для



**Рис. 3.44.** Экспрессия мембранных маркерных молекул при созревании Т-лимфоцитов. Прямоугольники обозначают стадии дифференцировки В-клеток, на которых представлены соответствующие молекулы. Отражена коэкспрессия молекул CD44 и CD25, а также CD4 и CD8 на Т-клетках на разных стадиях развития

выживания Т-лимфоцитов необходим IL-7, а также сигналы от TCR, при распознавании ими молекул МНС и аутологических пептидов (см. раздел 3.4.3).

### 3.3.2.3. Развитие $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов

При значительном сходстве путей развития В- и Т-лимфоцитов дифференцировка Т-клеток более продолжительна (табл. 3.13). Это объясняется главным образом особенностями распознающего аппарата Т-клеток, требующего сложной «настройки». Т-лимфоциты — единственные клетки крови, развитие которых не может осуществляться в микроокружении костного мозга — основные этапы дифференцировки они проходят в специальном органе — вилочковой железе, или тимусе. Тимус содержит эпителиальные клетки, отсутствующие в костном мозгу. Они и являются тем уникальным и ключевым фактором микроокружения, который способен обеспечить развитие Т-лимфоцитов. Структура тимуса и его роль в развитии Т-клеток будут рассмотрены далее (см. раздел 3.4.1.2).

Таблица 3.13. Стадии развития и субпопуляции тимоцитов человека

Стадия развития	Фенотип	Содержание, %	Локализация	Функция, процессы
Дважды отрицательные (DN)	Стадия DN1: CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD3 <sup>-</sup> ; CD44 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	4–5	Кортикомедуллярная и перимедуллярная зона	Полипотентные предшественники
	Стадия DN2 (про-Т-клетки): CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD3 <sup>-</sup> ; CD44 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>		Субкапсулярная зона	Подготовка перестройки генов
	Стадия DN3 (пре-Т-клетки): CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD3 <sup>-</sup> ; CD44 <sup>-</sup> CD25 <sup>+</sup>		То же	Перестройка Vβ-гена
Незрелые моноположительные (iSP)	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD3 <sup>-</sup>	0,5–0,7	Наружные слои коры	Нет данных
Дважды положительные (DP) TCRαβ <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> TCRαβ <sup>lo</sup> CD69 <sup>-</sup> CD5 <sup>lo</sup>	70–75	Кора	Перестройка Vα-гена. Незрелые Т-клетки; положительная селекция
	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> TCRαβ <sup>hi</sup> CD69 <sup>-</sup> CD5 <sup>+</sup>		Глубокие слои коры	Отрицательная селекция. Дифференцировка CD4/CD8
Моно-положительные (SP) TCRαβ <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> TCRαβ <sup>hi</sup> CD25 <sup>-</sup>	6–7	Мозговой и кортикомедуллярный слои	Предшественники Т-хелперов
	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> TCRαβ <sup>hi</sup>	4–5	То же	Предшественники цитотоксических Т-лимфоцитов
	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> TCRαβ <sup>hi</sup> CD25 <sup>hi</sup>	2–3	— << —	Естественные регуляторные Т-клетки
Дважды отрицательные (DN) TCRγδ <sup>+</sup>	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> TCRγδ <sup>+</sup>	1	Наружные слои коры	Предшественники Т-клеток барьерных тканей

**Миграция в тимус клеток-предшественников**

Из кроветворных органов в тимус мигрируют ранние лимфоидные предшественники ELP (от *Early lymphoid progenitors*) — клетки с широким потенциалом дифференцировки, включая миелоидный путь. Фенотипически эти клетки можно охарактеризовать как CD34<sup>+</sup> SCA-1<sup>+</sup> CD117 (c-Kit)<sup>+</sup> Flt-3<sup>+</sup> CCR9<sup>+</sup> CD4<sup>lo</sup>. Эта стадия развития предшествует стадии CLP. ELP отличаются от CLP отсутствием α-цепи рецептора для IL-7 и слабой экспрессией CD4. У человека фенотип этих клеток — CD34<sup>+</sup> CD38<sup>lo</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD7<sup>+</sup> (главное отличие от предшественников В-клеток состоит в экспрессии CD7 вместо CD10).

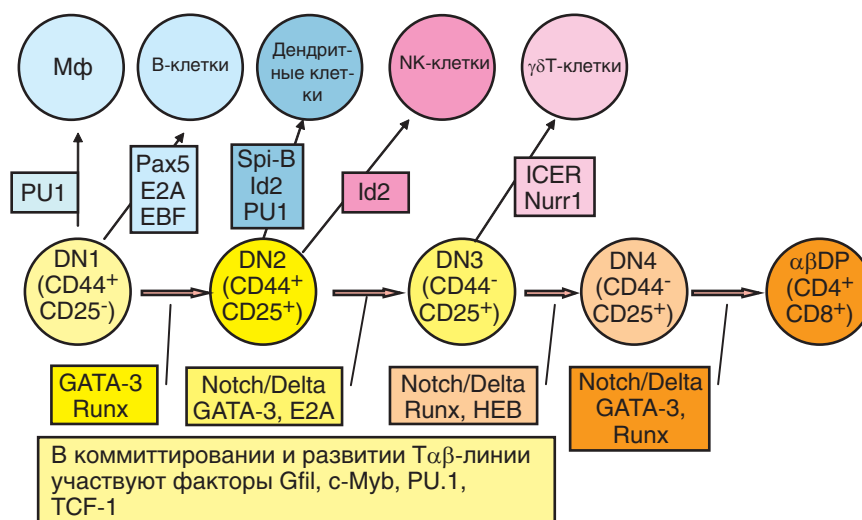
ELP попадают в тимус через венулы кортикомедуллярного сочленения тимуса (см. раздел 3.4.1.2), откуда они мигрируют в наружные слои коры. Затем начинается их возвратное движение в сторону кортикомедуллярного сочленения. В ходе этих перемещений происходит созревание Т-клеток. Уже на 1-м этапе (движение в сторону коры) клетки последовательно утрачивают способность дифференцироваться в В-лимфоциты, миелоидные клетки, естественные киллеры и дендритные клетки. Вероятно, на этом этапе внутри тимуса от клеток-предшественников Т-линии ответвляются предшественники перечисленных «не-Т-клеток» (например, дендритных для обеспечения потребности в этих клетках внутри тимуса). На этом отрезке миграции проходят первые этапы развития самих Т-лимфоцитов.

Для маркирования стадий развития Т-лимфоцитов чаще используют экспрессию на их поверхности корецепторов CD4 и CD8, а также рецепторного комплекса CD3–TCR (см. рис. 3.44). Наиболее ранние представители Т-клеточного ряда имеют фенотип  $CD4^+CD8^-$ , в связи с чем их называют дважды отрицательными или дважды негативными (DN — от *Double-negative*) клетками. Поскольку они лишены также CD3, эти клетки иногда называют трижды негативными клетками. Более зрелая популяция  $\alpha\beta$ -timoцитов экспрессирует оба корецептора и обозначается как дважды положительные клетки —  $CD4^+CD8^+$  (дважды позитивные, DP — от *Double-positive*). Они уже экспрессируют на своей поверхности (как правило, слабо) CD3. Наконец, зрелые тимоциты, как и периферические Т-клетки, экспрессируют один из корецепторов и поэтому их называют моноположительными клетками (SP — от *Single-positive*). Как уже упоминалось выше, фенотип  $CD4^+CD8^-$  характерен для Т-хелперов и регуляторных Т-клеток, а  $CD4^-CD8^+$  — для цитотоксических Т-лимфоцитов.

Развитие Т-клеток сходно, но не идентично развитию В-лимфоцитов. Как и в случае В-клеток, основные события при Т-лимфопоэзе — перестройка рецепторных V-генов и формирование TCR с последующей селекцией клонов Т-лимфоцитов, обеспечивающей формирование антигенраспознающего репертуара. Перестройка V-генов TCR и другие события, приводящие к экспрессии рецептора, происходят на стадии дважды отрицательных тимоцитов в поверхностных слоях коры тимуса (субкапсулярной зоне). Для удобства рассмотрения этого процесса в стадии дважды отрицательных DN (timoцитов) выделяют подстадии по экспрессии двух мембранных молекул — CD44 (рецептор, распознающий гиалуронат и ответственный за миграцию клеток-предшественников в тимус) и CD25 ( $\alpha$ -цепь рецептора для IL-2). DN1-клетки, мигрирующие в тимус, имеют фенотип  $CD44^+CD25^-$ , DN2 —  $CD44^+CD25^+$ , DN3 —  $CD44^-CD25^+$ .

***Развитие дважды отрицательных тимоцитов и перестройка генов Т-клеточного рецептора*** (см. табл. 3.13)

Самые ранние  $CD44^+CD25^-$  тимоциты локализуются в перимедуллярной зоне коры тимуса. Они представляют собой полипотентные кроветворные предшественники, их V-гены имеют зародышевую, т.е. неперестроенную конфигурацию. Только в некоторых клетках на этой стадии проходит начальный, малоспецифичный этап перестройки генов — сближение сегментов D и J в генах  $\beta$ - и  $\delta$ -цепей (см. рис. 3.43). На стадии DN1 клетки

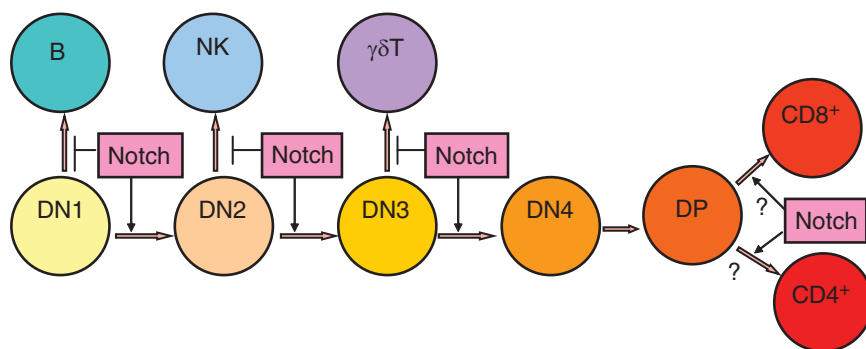


**Рис. 3.45.** Полипотентность ранних тимических предшественников и роль дифференцировочных факторов в выборе пути их развития. Клетки-предшественники, поступающие в тимус, обладают широким дифференцировочным потенциалом, который они в процессе развития постепенно утрачивают. В конце стадии дважды отрицательных клеток тимоциты сохраняют способность дифференцироваться только в  $\alpha\beta$ Т-клетки

интенсивно пролиферируют (до 10 делений), что приводит к 1000-кратному увеличению их числа. Это наиболее продолжительный этап развития Т-клеток (10 сут — 50% времени развития Т-клеток в тимусе). Основной ростовой фактор на этом этапе — SCF (C-Kit лиганд). В это время рецептор для IL-7 экспрессирован слабо или вообще не экспрессирован. Факторами дифференцировки на этом этапе развития служат Wnt и Hedgehog, а также Notch, коммиттирующий клетки-предшественники к дифференцировке в Т-лимфоциты. Дальнейшие стадии дифференцировки Т-клеток представлены на рис. 3.45.

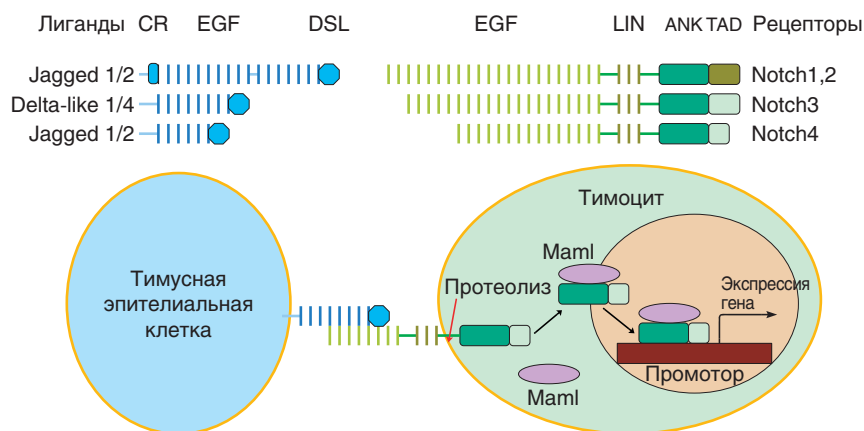
На стадии DN2 тимоциты перемещаются в сторону наружных слоев коры по градиенту CXCL12, секретируемого эпителиальными клетками наружной коры. Длительность стадии — 2 сут. Клетки продолжают пролиферировать уже преимущественно под действием IL-7 и в меньшей степени — SCF. На этой стадии сигналы от Notch коммиттируют Т-клетки к дифференцировке в различные линии ( $\gamma\delta$  или  $\alpha\beta$ ) и экспрессируется ген, кодирующий pTCR $\alpha$ , — знак выбора  $\alpha\beta$ -направления развития. Это коммиттирование становится необратимым только после реаранжировки генов TCR на стадии DN3. Тогда же экспрессируются гены рекомбинационного комплекса.

При переходе на стадию DN3 запускается основное событие дифференцировки Т-лимфоцитов — перестройка V-генов TCR. Включение этого процесса является следствием экспрессии в тимоцитах группы дифференцировочных факторов под влиянием эпителиального микроокружения. Для раннего развития Т-клеток необходима экспрессия генов Notch, Runx-1,



**Рис. 3.46.** Роль Notch-рецепторов в развитии Т-клеток в тимусе. Показано стимулирующее влияние Notch на разные стадии развития  $\alpha\beta$ Т-клеток в тимусе и ингибирующее — на альтернативные пути дифференцировки

GATA-3, Ikaros, Gfi1, c-Myb, PU.1, E2A/HEB, TCF-1. Особенно важную роль играют факторы семейства Notch (особенно Notch-1 и Notch-3), действующие почти на всех этапах раннего развития тимоцитов и блокирующие другие пути дифференцировки клеток-предшественников (в направлении В-, NK-, дендритных клеток) (рис. 3.46). Механизм действия этого основного дифференцировочного фактора Т-клеток представлен на рис. 3.47. Для запуска перестройки V-генов TCR наиболее важна передача сигнала, осуществляемая Notch-1 на стадиях DN2 и DN3. Рецептор для этого фактора экспрессируется тимоцитами на указанных стадиях развития. Лиганды Notch-рецептора — молекулы Delta и Jagged — находятся на поверхности



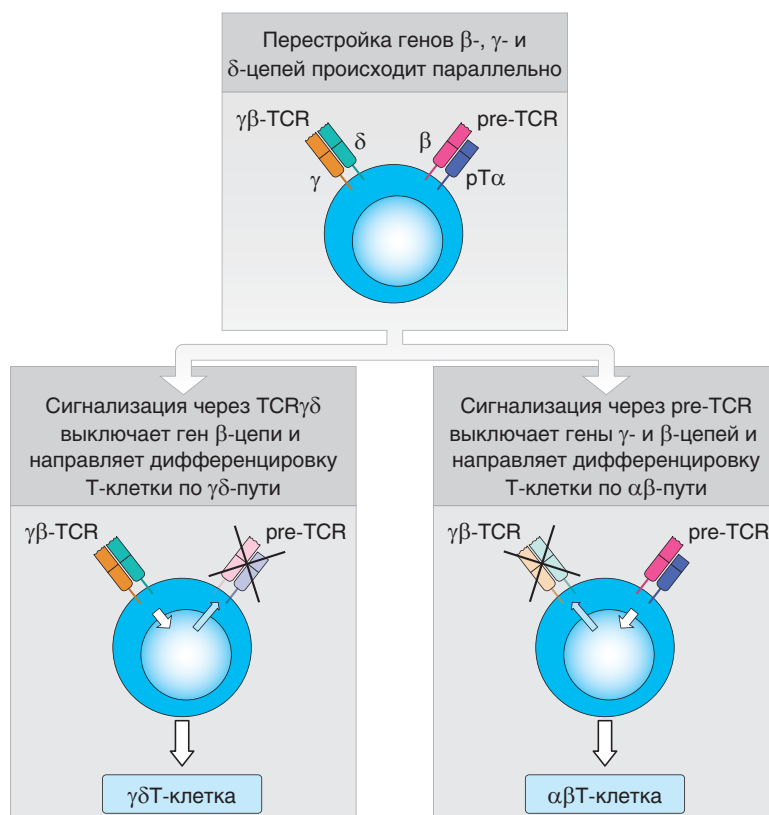
**Рис. 3.47.** Notch-рецепторы, их лиганды и Notch-опосредованная передача сигнала. Схема иллюстрирует строение Notch-рецепторов и Notch-лигандов (основные компоненты их внеклеточной части — EGF-подобные повторы). Показано гомотипическое взаимодействие лиганда и рецептора, освобождение внутриклеточной части рецептора вследствие протеолиза и ее функционирование в качестве ядерного транскрипционного фактора

эпителиальных клеток тимуса. Определенную роль в индукции перестройки V-генов играют цитокины, в частности IL-7, который особенно важен для запуска перестройки V-гена  $\gamma$ -цепи. Еще более существенна роль IL-7 в качестве фактора выживания, индуцирующего экспрессию антиапоптотического фактора Bcl-2. На этом этапе развития после запуска перестройки V-генов TCR развитие макрофагов и В-лимфоцитов становится невозможным.

Рearанжировка происходит в основном при переходе от стадии DN2 (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) к стадии DN3 (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>), которые называют также стадиями про-Т и пре-Т, соответственно (см. рис. 3.43). На этих стадиях экспрессируются гены **RAG1** и **RAG2**, ген фермента **TdT** и гены других компонентов рекомбинационного комплекса. Перестройка V-генов TCR происходит, как принято считать, в последовательности  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$ . Однако это правило соблюдается не очень строго: все 3 гена начинают перестраиваться практически одновременно. Как и в случае V-генов иммуноглобулинов, сначала перестраиваются гены только на одной хромосоме. В генах  $\beta$ - и  $\delta$ -цепей сближаются сегменты D и J, а затем происходит полномасштабная перестройка с вовлечением основного сегмента V-гена и формированием непрерывных последовательностей VDJ. Рearанжировка генов  $\gamma$ -цепи проходит так же, но с одним отличием: поскольку в гене  $\gamma$ -цепи отсутствует D-сегмент, в результате перестройки формируется последовательность VJ. Как и при реаранжировке V-генов иммуноглобулинов, при неудачной перестройке V-гена на одной хромосоме процесс повторяется на другой хромосоме. Успешная перестройка служит сигналом к прекращению этого этапа реаранжировки. Это обуславливает экспрессию клеткой только одного варианта продуктов перестроенных V-генов. Рearанжировка V-генов TCR делает невозможной дифференцировку про-Т-клеток в направлении NK- и дендритных клеток.

При удачной перестройке V-гена  $\beta$ -цепи экспрессируется пре-Т-рецептор, аналогичный рассмотренному выше пре-В-рецептору (см. рис. 3.38). Он представляет собой димер, состоящий из полноценной  $\beta$ -цепи и инвариантной (т.е. лишенной варибельного участка) цепи, называемой пре-TCR $\alpha$ . Экспрессия этой молекулы на мембране сопровождается ее спонтанной олигомеризацией, что само по себе (т.е. без связывания какого-либо лиганда) сигнализирует о благополучной перестройке. Экспрессия пре-Т-рецептора и передача сигнала с этой молекулы служит 1-й контрольной точкой перестройки TCR. Ответ на этот сигнал — усиление экспрессии фактора, блокирующего развитие апоптоза (Bcl-2), и запуск пролиферации клеток (индуцируется преимущественно IL-7). Если после двух попыток перестройки проторецептор не экспрессируется, клетка подвергается апоптозу. Как и при реаранжировке V-генов иммуноглобулинов, успешная перестройка V-гена  $\beta$ -цепи происходит в 55% клеток. Отбор тимоцитов, успешно перестроивших V-ген  $\beta$ -цепи, путем подавления их апоптоза и индукции пролиферации, называют  $\beta$ -селекцией. В период  $\beta$ -селекции временно прекращается экспрессия генов **RAG1** и **RAG2** и приостанавливается процесс перестройки генов.

Сложным и не до конца понятным остается вопрос о механизмах выбора между  $\gamma\delta$ - и  $\alpha\beta$ -путями дифференцировки Т-клеток (рис. 3.48). На стадии DN3, когда тимоцит экспрессирует мембранный пре-Т-рецептор, он уже



**Рис. 3.48.** Выбор пути  $\alpha\beta/\gamma\delta$ -дифференцировки Т-клеток

может нести на своей поверхности полноценный  $\gamma\delta$ -TCR. Известно, что каждая Т-клетка может экспрессировать TCR одного типа ( $\alpha\beta$  или  $\gamma\delta$ ). Таким образом, на этапе DN3 клетка должна сделать выбор: продолжать перестройку V-гена  $\alpha$ -цепи для формирования TCR  $\alpha\beta$ -типа или довольствоваться уже сформированным  $\gamma\delta$ TCR. В настоящее время наиболее широко принята концепция «силы сигнала», согласно которой, если  $\gamma\delta$ TCR передают сигналы достаточной силы (заведомо превосходящей силу сигнала от пре-Т-рецепторов), Т-клетки прекращают перестройку V-генов и развиваются как  $\gamma\delta$ Т-лимфоциты. В противном случае экспрессия генов  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепей блокируется и клетки продолжают перестройку V-генов. Перестройка V-гена  $\alpha$ -цепи делает физически невозможным развитие тимоцитов в направлении  $\gamma\delta$ -клеток, т.к. гены  $\alpha$ - и  $\delta$ -цепи образуют единый локус (см. 3.1.4), и перестройка гена  $\alpha$ -цепи приводит к удалению последовательностей, кодирующих  $\delta$ -цепь.

По-видимому, микроокружение эмбрионального и взрослого тимуса существенно различается по способности поддерживать формирование субпопуляций Т-клеток  $\gamma\delta$ - и  $\alpha\beta$ -линий. В тимусе эмбрионов развиваются преимущественно  $\gamma\delta$ Т-клетки, затем эмигрирующие в периферический

отдел иммунной системы (см. раздел 3.4.1.2). В тимусе взрослых животных на долю  $\gamma\delta$ T-клеток приходится около 1% тимоцитов, что отражает безусловное преобладание  $\alpha\beta$ -тимопоэза. Кроме того,  $\gamma\delta$ -timoциты по мере завершения перестройки генов TCR быстро эмигрируют из тимуса, а  $\alpha\beta$ T-клетки продолжают развитие, подвергаясь селекции. Образование  $\alpha\beta$ T-клеток во взрослом организме происходит практически только в тимусе и  $\alpha\beta$ T-лимфопоэз является основной функцией тимуса взрослых животных.

К концу фазы DN3 тимоциты приобретают фенотип CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Длительность фазы DN3 до  $\beta$ -селекции составляет 2 сут, а период  $\beta$ -селекции — еще 1 сут. На заключительном этапе фазы DN3 на клетках экспрессируется корецептор CD4 (стадия ISP — от *Immature single-positive*, т.е. незрелых моноположительных тимоцитов).

Ранее полагали, что существует особая стадия развития DN-timoцитов — DN4, однако оказалось, что тимоциты приобретают фенотип CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> одновременно с экспрессией корецепторов CD4 и CD8 (точнее, экспрессией молекулы CD8 в дополнение к уже присутствующей на мембране молекулы CD4). Продолжительность стадии дважды положительных тимоцитов невелика (1,5–2 сут), однако в это время происходит несколько событий, принципиально важных для развития T-лимфоцитов. Одно из этих событий — реализация завершающего этапа формирования  $\alpha\beta$ TCR — перестройка V-гена  $\alpha$ -цепи. Поскольку в  $\alpha$ -гене отсутствуют D-сегменты, реаранжировка приводит к образованию VJ-продукта. Хотя вероятность возникновения ошибки при этом почти такая же, как при перестройке V-гена  $\beta$ -цепи, результативность реаранжировки  $\alpha$ -гена выше. При неудачной перестройке генов, расположенных на обеих хромосомах, процесс начинается заново, причем в него вовлекаются другие V- и J-сегменты. Такой «перебор» сегментов продолжается до успешной перестройки, что может занять 3–4 сут. Все это время не прекращаются экспрессии генов, кодирующих **RAG-1**, **RAG-2** и **TdT**. Именно поэтому вероятность неудачи на этом этапе реаранжировки даже ниже, чем на этапе перестройки V-генов L-цепи иммуноглобулинов в B-клетках.

После перестройки V-генов обеих цепей происходит сборка их продуктов и экспрессия «зрелого» TCR на поверхности клетки. Важно, что специфичность TCR у каждого индивидуального тимоцита различна, поскольку процесс перестройки осуществляется в них независимо от других клеток и вероятность совпадения нуклеотидной последовательности в перестроенных генах разных клеток практически равна нулю. Зрелый TCR экспрессируется в комплексе с CD3 и  $\zeta$ -цепями. Поскольку CD3 и  $\zeta$ -димер отвечают за передачу сигнала от рецептора в ядро, клетки уже на этом этапе имеют функционально полноценный рецептор. Вероятно, появление на поверхности тимоцита зрелого рецептора служит сигналом, необходимым для прекращения экспрессии T-клеткой генов *RAG1* и *RAG2* и для поддержания ее жизнеспособности. В этом состоит суть второй «контрольной точки» при формировании TCR. Плотность экспрессии TCR на поверхности тимоцитов сначала невелика. Выживаемость клеток в этот период обеспечивается взаимодействием молекулы семейства TNF — CD70 тимоцита и молекулы семейства TNFR — CD27 эпителиальной клетки.

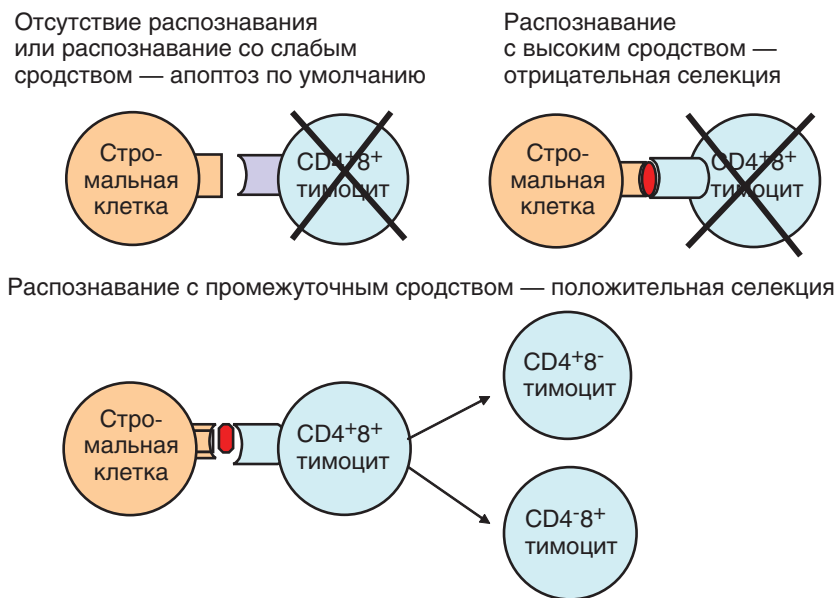
### 3.3.2.4. Селекция тимоцитов и формирование субпопуляций $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток

Многие особенности селекции Т-клеток (по сравнению с селекцией В-лимфоцитов) характеризуются большей сложностью процесса распознавания антигена Т-клетками и их особой ролью в обеспечении толерантности к собственным антигенам организма. Схематично положительная и отрицательная селекция тимоцитов отражены на рис. 3.49.

#### *Положительная селекция*

Дважды положительные клетки очень чувствительны к апоптозу (в связи с низкой экспрессией ими антиапоптотических факторов, таких, как Bcl-2 и Bcl-X<sub>L</sub>). Для выживания дифференцирующимся Т-клеткам нужна поддержка микроокружения, особенно эпителиальных клеток коры тимуса, в которой локализуются  $CD4^+CD8^+$  тимоциты. Сигнал, необходимый для выживания, тимоциты получают в ходе положительной селекции. Набор рецепторов, формируемый в ходе случайной перестройки генов, никак не связан с реальными потребностями иммунной системы. В то же время для нормального функционирования иммунной системы нужно, чтобы Т-клетки несли TCR, распознающие молекулы МНС, содержащие пептидные фрагменты антигенов. Положительная селекция обеспечивает отбор только тех тимоцитов, которые экспрессируют TCR, обладающие средством к молекулам МНС.

Положительной селекции подвергаются дважды положительные тимоциты фенотипа  $CD4^+CD8^+CD3^{lo}CD27^-$ . В качестве «отбирающего фактора» выступают кортикальные эпителиальные клетки, экспрессирующие цито-



**Рис. 3.49.** Селекция клонов тимоцитов. Связь с особенностями распознавания комплекса «аутологичный пептид–МНС»

кератин СК8 и молекулы МНС обоих классов, но лишённые костимулирующих молекул. Тимоциты, перемещаясь от периферии коры к кортикомедуллярной зоне, тесно контактируют с эпителиальным ретикуломом, образующим трехмерный каркас тимуса. При этих механических контактах TCR тимоцитов взаимодействуют с экспрессированными на поверхности эпителиальных клеток молекулами МНС как I, так и II классов, содержащими фрагменты различных эндогенных молекул (чужеродные молекулы в тимусе отсутствуют). Если TCR обладает сродством к молекуле МНС, тимоцит получает поддерживающий сигнал, основными результатами которого служат повышение экспрессии антиапоптотического фактора Bcl-2 и продвижение тимоцита по клеточному циклу. Внешний признак успешного прохождения тимоцитом положительной селекции — экспрессия маркера активации клеток CD69, а также молекул CD5, CD27 и костимулирующей молекулы CD28, сопровождающаяся повышением плотности экспрессии рецепторного комплекса TCR—CD3 на поверхности клетки. Т-лимфоциты, рецепторы которых лишены сродства к МНС, подвергаются апоптозу «по умолчанию», т.е. не в силу сигнала извне, передаваемого через мембранные рецепторы, а вследствие срабатывания внутренних (митохондриальных) механизмов. Поскольку сродством к молекулам МНС обладают TCR лишь незначительной части клонов образующихся тимоцитов, на этапе положительной селекции погибает 90% CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> тимоцитов.

#### **Отрицательная селекция**

Тимоциты, прошедшие положительную селекцию, мигрируют в кортикомедуллярное сочленение и в мозговой слой тимуса, где они проходят следующий этап отбора — отрицательную селекцию. На этом этапе тимоциты представлены дважды положительными клетками или «полузрелыми» моноположительными клетками фенотипа CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>. Отрицательную селекцию осуществляют медуллярные дендритные и эпителиальные клетки. Те и другие клетки экспрессируют молекулы МНС обоих классов и костимулирующие молекулы (CD80, CD86, CD40). Маркеры медуллярных эпителиальных клеток — цитокератин 5 и лектин улитки UEA1.

На этом этапе происходит дискриминация тимоцитов по степени сродства к комплексу МНС—пептид. Клетки, обладающие высоким сродством, подвергаются апоптозу как потенциально опасные (поскольку они хорошо распознают пептидные фрагменты аутологических белков в составе аутологических молекул МНС, они могут индуцировать аутоиммунные реакции). Сигналом к реализации апоптоза служит экспрессия ядерного фактора Nur77, который, таким образом, служит маркером клеток, подлежащих элиминации. В результате жизнеспособность сохраняют только тимоциты, рецепторы которых обладают умеренным (промежуточным) сродством к аутологичным комплексам МНС—пептид. Именно такие клетки мигрируют в периферический отдел иммунной системы и участвуют в развитии иммунного ответа и реализации антигенспецифической иммунной защиты.

Постоянно возникает вопрос, почему сигнал, поступающий в тимоциты через TCR, в одном случае (положительная селекция) обеспечивает поддержание жизнеспособности клеток, а в другом (отрицательная селекция) вызывает их гибель. Основой этих различий являются особенности

клеток, вступающих в соответствующую фазу селекции. В силу различной молекулярной конституции внутриклеточная сигнализация при аналогичных внешних сигналах и использовании практически одних и тех же сигнальных путей приводит к доминированию различных факторов и включению различных результирующих механизмов, приводящих в одном случае к поддержанию жизнеспособности, в другом — к развитию апоптоза. Полностью детали внутриклеточной сигнализации при положительной и отрицательной селекции тимоцитов не выяснены. Однако известно, например, что при положительной селекции в передаче сигнала в большей степени вовлекаются ферменты MAP-каскада, приводящие к образованию транскрипционного фактора *c-Fos*, а также  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый сигнальный путь, обеспечивающий формирование фактора NF-AT. В то же время при отрицательной селекции доминируют JNK- и p38-ветви MAP-каскада, приводящие к образованию транскрипционного фактора *c-Jun*. Маркером отрицательной селекции является киназа MINK.

Из сказанного выше следует, что Т-клетки как бы «натаскиваются» на распознавание собственных антигенов, а не чужеродных молекул, но степень агрессивности Т-клеток в отношении собственных молекул ограничивается отрицательной селекцией. Этим клеткам предстоит распознавать комплексы аутологичных молекул МНС с пептидными фрагментами чужеродных белков, что осуществляется в силу высокой перекрестной реактивности TCR. Тем не менее, риск аутоагрессивности сохраняется и для его ограничения требуются дополнительные механизмы, такие как контроль со стороны регуляторных Т-клеток (см. 3.6.6.4).

При отрицательной селекции удаляются клоны, распознающие с высоким родством антигены, представленные в тимусе. В связи с этим возникает вопрос, насколько набор антигенов, экспрессируемых в тимусе, является представительным для всего организма. Общеизвестно, что существуют органоспецифические антигены — белки, характерные для того или иного органа и выполняющие специфические функции. Из этого следует, что в популяции тимоцитов, прошедших отрицательную селекцию, должны сохраняться клоны, способные распознавать органоспецифические антигены других органов (не тимуса).

Однако такие клетки элиминируются при отрицательной селекции (если не полностью, то в значительной степени) благодаря эктопической экспрессии в тимусе небольших количеств органоспецифических антигенов. Этот процесс контролирует продукты гена *AIRE* (от *Autoimmunity regulator*). Белок, кодируемый геном *AIRE*, содержит домены, предназначенные для взаимодействия с ДНК (т.е. он является транскрипционным фактором), домены, ответственные за взаимодействие с ядерными рецепторами, а также 2 домена со структурой «цинковых пальцев» (zinc finger). Механизмы действия белка *AIRE* неизвестны. Результат его активности — экспрессия генов органоспецифических антигенов различных органов (прежде всего эндокринных) в клетках мозговой зоны тимуса — эпителиальных, в меньшей степени — дендритных и В-лимфоцитах (редких, но тем не менее выявляемых в тимусе). Всего в тимусе экспрессируется 2000–3000 генов внетимусных белков, для экспрессии 500 из них доказана роль *AIRE*. Эта экспрессия мозаична: обычно в каждой клетке может экспрессироваться

один из белков, причем каждый белок экспрессируется всего примерно в 100 клетках. В связи этим возникает вопрос, как столь незначительное количество антигена может обеспечить элиминацию аутореактивных клонов. Считают, что в этом принимают участие дендритные клетки, утилизирувавшие продукты распада эпителиальных клеток или получившие антиген путем «откусывания» фрагментов эпителиальных клеток. О результативности такого механизма отрицательной селекции свидетельствует резкое возрастание аутоиммунных патологий при мутациях гена *AIRE*, ведущих к развитию синдрома APECED (*Autoimmune polyendocrinopathy, candidiasis, endodermal dystrophy* — аутоиммунная полиэндокринопатия, кандидоз, энтодермальная дистрофия).

На этапе отрицательной селекции гибнет почти 50% тимоцитов, прошедших положительную селекцию (около 5% от числа незрелых дважды положительных тимоцитов). Однако в действительности достаточно много аутоспецифических Т-клеток не элиминируется в процессе отрицательной селекции и пополняет пул зрелых Т-лимфоцитов, создавая угрозу аутоагрессии. Для предотвращения этой угрозы необходимы дополнительные механизмы защиты в виде редактирования генов  $\alpha$ -цепей TCR, индукции анергии и контроля иммунного ответа регуляторными Т-лимфоцитами (вопросы формирования и нарушения аутоотолерантности будут специально рассмотрены в разделах 4.3.2.1 и 4.4.1.1).

#### **Дифференцировка $CD4^+$ и $CD8^+$ тимоцитов**

Одновременно с селекцией тимоцитов происходит разделение их на субпопуляции, основанное на избирательной экспрессии корцепторов CD4 или CD8. Поскольку зрелые моноположительные тимоциты локализуются в мозговом слое тимуса, можно предположить, что разделение на субпопуляции происходит на этапе отрицательной селекции, однако не исключено, что этот процесс может быть связан с положительной селекцией. Дифференцировка Т-клеток регулируется как внутренними (дифференцировочные факторы), так и внешними (сигналы, генерируемые при контактах между клетками) стимулами. Несмотря на то, что факторы группы Notch действуют на этом этапе развития тимоцитов, они не оказывают решающего влияния на выбор пути дифференцировки. Считают, что для дифференцировки Т-лимфоцитов в  $CD8^+$  клетки нужен сигнал большей интенсивности, чем для дифференцировки  $CD4^+$  Т-клетки. Более специфично действие других факторов: сочетанная экспрессия в клетках факторов Th-POK и GATA-3 направляет Т-клетку по  $CD4^+$ -пути, тогда как экспрессия факторов Tbx и Runx3 — по  $CD8^+$  пути (рис. 3.50).

Сложнее объяснить механизмы, с помощью которых достигается соответствие корцептора, остающегося на Т-клетке при ее переходе на стадию моноположительных клеток, и специфичности TCR, который различает структуру не только пептида, но и молекулы МНС, в которую пептид встроен (рис. 3.51). Установлено, что на  $CD4^+CD8^+$  клетках в определенный момент ослабляется экспрессия корцептора CD8 (фенотип  $CD4^+CD8^{lo}$ ). Если TCR специфичен к МНС-II, как и доминирующий корцептор (CD4), то в клетке генерируется сильный сигнал, и она переходит на стадию  $CD4^+CD8^-$ . Если TCR обладает более высоким сродством к комплексу

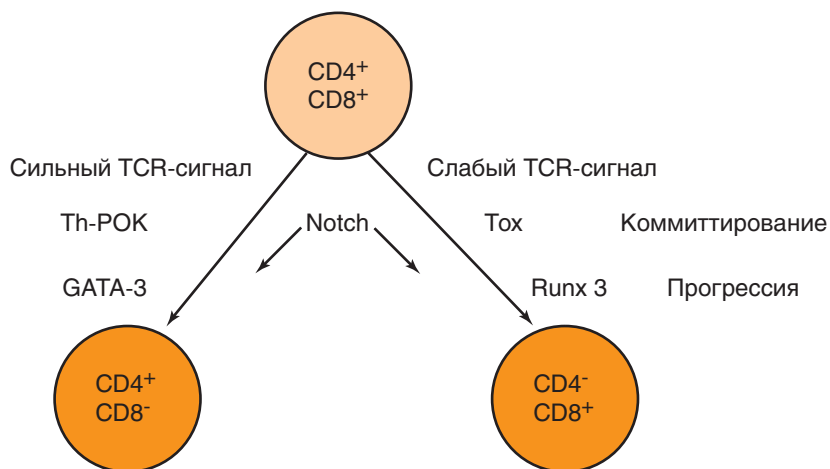


Рис. 3.50. Факторы, контролирующие дифференцировку  $\alpha\beta$ Т-клеток

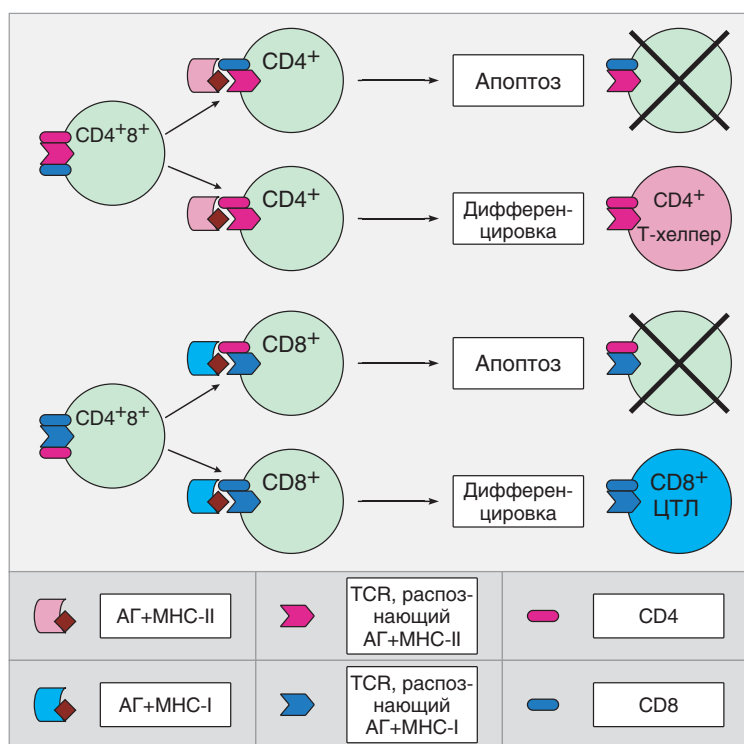


Рис. 3.51. Проверка специфичности корецептора при дифференцировке  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитов (селекционная модель). Клетка выживает, если специфичность корецептора к молекулам главного комплекса гистосовместимости совпадает со специфичностью Т-клеточного рецептора (на схеме в таких вариантах рецептор и корецептор окрашены одним цветом). Несовпадение специфичностей рецептора и корецептора приводит к апоптозу клетки

пептид–МНС-I, т.е. специфичность TCR и CD4 не совпадает, формируется слабый сигнал. Это приводит к усилению экспрессии CD8 и утрате CD4, т.е. к развитию CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

После такой селекции путем подтверждения адекватности корцептора клетка приобретает функциональные свойства, соответствующие ее назначению. Так, CD8<sup>+</sup> Т-клетки (Т-киллеры) приобретают способность формировать цитолитический молекулярный комплекс, что обеспечивает функционирование такой Т-клетки в качестве цитотоксического Т-лимфоцита. В CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах (Т-хелперах) формируются внутриклеточные механизмы, необходимые для выполнения «хелперной» функции, прежде всего — способность активно вырабатывать цитокины при активации. В результате Т-клетки дифференцируются в функционально полноценные субпопуляции цитотоксических и хелперных Т-лимфоцитов.

В результате описанных выше процессов в тимусе образуется популяция функционально полноценных αβТ-лимфоцитов, способных участвовать в иммунном ответе и обеспечивать антигенспецифическую иммунную защиту организма. Популяция зрелых Т-клеток гетерогенна по двум параметрам — специфичности TCR и функциональной активности. Разнообразие специфичностей TCR служит основой клональной структуры популяции Т-клеток. Тимоциты, сформировавшие уникальный по составу и специфичности рецептор, пройдя селекцию, образуют клон — группу потомков родоначальной клетки с рецепторами той же специфичности. В результате селекции клонов сохраняются и поддерживаются только клетки, распознающие комплексы аутологичных молекул МНС и эндогенных пептидов с умеренным сродством, недостаточным для развития ответа на аутоантигены, но достаточным для распознавания чужеродных пептидов в составе молекулы МНС на основе перекрестной реактивности.

Созревшие тимоциты довольно долго (7–14 сут) не покидают тимус, пребывая преимущественно в наружных слоях мозгового слоя, богатых дендритными клетками. В этот период завершается формирование аутоантотолерантности и Т-клетки приобретают свойства, важные для поддержания их жизнеспособности вне тимуса. Так, вследствие активации сиалилтрансфераз происходит сиалирование мембранных гликопротеинов, защищающее лимфоциты от поглощения макрофагами. Созревшие Т-лимфоциты начинают экспрессировать набор мембранных молекул адгезии и рецепторов для хемокинов, необходимые для направленной миграции клеток в специализированные участки иммунной системы и для последующей рециркуляции. Например, под влиянием фактора KLF2 (*Kruppel-like factor 2*) на тимоцитах экспрессируются селектин L (CD62L), β<sub>2</sub>-интегрины, хемокиновый рецептор CCR7 и рецептор SIP-1 для сфингозин-1-фосфата. Последнему фактору приписывают основную роль в эмиграции зрелых Т-клеток из тимуса: созревшие клетки мигрируют в кровяное русло, т.к. их привлекает присутствующий в нем сфингозин-1 фосфат, который выступает в роли хемотаксического фактора.

Развитие Т-клеток в тимусе длится около 20 сут. За это время, с одной стороны, происходит массовая (до 99%) гибель тимоцитов в процессе их созревания (главным образом, на разных этапах селекции), а с другой — пролиферация выживших клеток с образованием клонов. В зрелом возрас-

те из тимуса ежедневно эмигрируют Т-клетки в количестве, равном 1% от общей численности тимоцитов.

Помимо рассмотренных выше субпопуляций  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитов в тимусе дифференцируются «неклассические» субпопуляции Т-клеток. Определенные успехи в изучении этих субпопуляций были достигнуты только в последние годы. Свойства этих клеток представлены в табл. 3.14.

**Таблица 3.14.** Естественные субпопуляции периферических Т-лимфоцитов

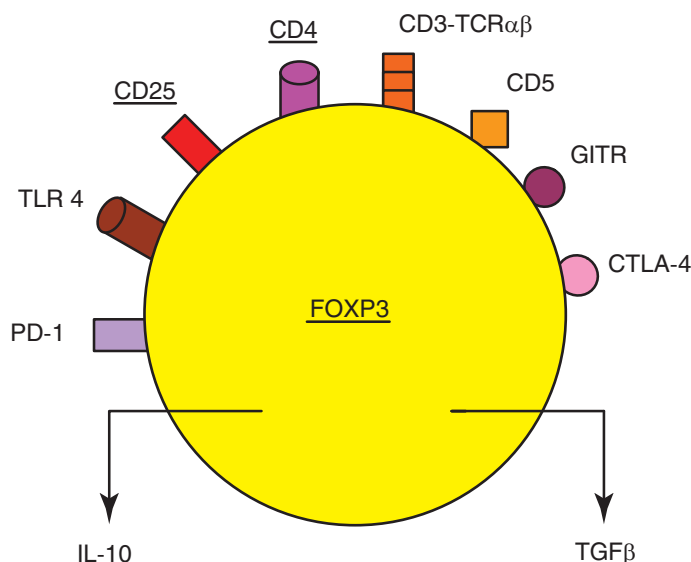
Название	TCR	Корецепторы	Распознаваемые лиганды	Локализация, содержание	Функции
Т-хелперы	$\alpha\beta$ TCR	$CD4^+ CD8^-$	Пептид–МНС-II	Кровь (35–40%), лимфатические узлы (30–40%), селезенка (20–25%), тимус (8–10%), кожа, слизистые	Предшественники Т-хелперов
Т-киллеры		$CD4^- CD8\alpha\beta^+$	Пептид–МНС-I	Кровь (20–25%), лимфатические узлы (15–20%), селезенка (10–15%), тимус (4–5%), слизистые, кожа	Предшественники цитотоксических Т-лимфоцитов
Дважды положительные (DP)		$CD4^+ CD8^+$	Нет данных	Кровь (около 1%)	Нет данных
Дважды отрицательные (DN)		$CD4^- CD8^-$	Нет данных	Печень, брюшная полость, костный мозг	Нет данных
NKT-клетки		$CD4^{+/-} CD8^-$	Липид–CD1d	Печень (>10%), селезенка, слизистые	Первая линия защиты — источник $IFN\gamma$
Регуляторные Т-клетки		$CD4^+ CD8^- CD25^{hi}$	Пептид–МНС-II	Кровь (5–6%), лимфатические узлы, селезенка, тимус (3–6%), слизистые, нелимфоидные органы	Предотвращение аутоагрессии, иммунорегуляция
$\gamma\delta$ Т-клетки	$\gamma\delta$ TCR	$CD4^- CD8^-$	Фосфопротеины и др.	Лимфатические узлы, селезенка, кровь (2–3%), тимус (1%), слизистые, кожа (до 20%)	Первая линия защиты, иммунорегуляция
$CD8\alpha\alpha$ -клетки		$CD4^- CD8\alpha\alpha^+$	Вероятно, пептид–Qa-1/TL	Слизистые, особенно кишечника	Первая линия защиты, иммунорегуляция

### 3.3.2.5. Естественные регуляторные Т-клетки

В 1995 г. С. Сакагучи (*S. Sakaguchi*) и соавт. описали естественные регуляторные Т-клетки ( $T_{reg}$ ). Они выполняют супрессорные функции, и их главная задача — предотвращение развития аутоиммунных процессов (см. разд. 4.4).

У человека регуляторные Т-клетки имеют мембранный фенотип  $CD4^+CD25^{hi}CTLA-4^+GITR^+PD-1^+$  (рис. 3.52). Таким образом, регуляторные Т-клетки сильно экспрессируют  $\alpha$ -цепь рецептора для IL-2 (CD25), что отличает их от активированных Т-хелперов, несущих меньшее число молекул CD25. Кроме того, на их поверхности присутствуют супрессорные аналоги костимулирующих молекул CTLA-4 и PD-1 и представитель семейства TNFR — GITR (*Glucocorticoid-induced TNFR-related*). Регуляторные Т-клетки экспрессируют более широкий спектр мембранных TLR, чем другие Т-клетки.

Показано, что супрессорная активность  $CD4^+$  регуляторных Т-клеток связана с транскрипционным фактором FOXP3 (скурфин): мутации гена **FOXP3** сопровождаются утратой регуляторными Т-клетками супрессорной активности, а трансдукция гена **FOXP3** в  $CD4^+CD25^-$  клетки приводит к появлению у них супрессорной активности, усилению экспрессии CD25 и CTLA-4. В то же время FOXP3 в норме экспрессируется в некоторых  $CD4^+CD25^-$  Т-клетках, также проявляющих супрессорную активность. Скурфин содержит 4 домена, из которых С-концевой — *forkhead*-домен — определяет функционирование этого белка в качестве транскрипционного фактора. Мутация **sf** у мышей проявляется низкорослостью, развитием экземы, тяжелой диареей, анемией, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, активацией



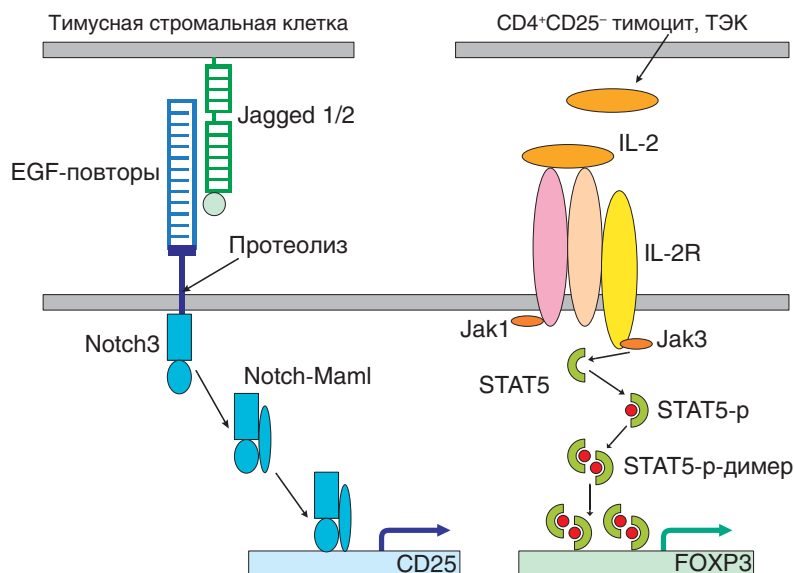
**Рис. 3.52.** Мембранные маркеры регуляторной Т-клетки. Мембранные молекулы обозначены фигурами на поверхности круга; внутриклеточный фактор FOXP3 изображен внутри круга; секретируемые цитокины помечены стрелками, идущими из круга наружу

CD4<sup>+</sup> Т-клеток, гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, ранней гибелью. Аналог этого синдрома у человека — IPeX-синдром (*Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy X-linked syndrome* — X-сцепленный синдром дисрегуляции иммунной системы с полиэндокринопатией и энтеропатией), проявляющийся развитием множественного аутоиммунного поражения эндокринных желез и органов пищеварения с тяжелой энтеропатией, кахексией, низкорослостью, аллергическими и гематологическими проявлениями. Гиперэкспрессия гена *Foxp3* у мышей вызывает развитие тяжелого иммунодефицита с нарушением функции CD4<sup>+</sup> клеток.

Естественные регуляторные Т-клетки развиваются преимущественно в тимусе (табл. 3.15). Необычность их дифференцировки состоит в приобретении ими супрессорных свойств, определяемых экспрессией гена *FOXP3*, а также сохранением способности распознавать аутоантигены с высокой степенью сродства (т.е. эти клетки не проходят отрицательной селекции). До конца механизмы дифференцировки регуляторных Т-клеток не выяснены. Считают, что первое проявление дифференцировки Т-клеток в направлении регуляторных клеток состоит в экспрессии высокоаффинного рецептора для IL-2, индуцируемой при взаимодействии с эпителиальными клетками кортикальной зоны (т.е. во время положительной селекции). Полагают, что дифференцировочный сигнал вырабатывается при взаимодействии Notch-3, экспрессируемого тимоцитами, с его лигандом Jagged 1/2 эпителиальных клеток. При действии IL-2, секретируемого зрелыми CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Т-лимфоцитами и стромальными клетками, на IL-2R тимоцитов индуцируется (при участии STAT5) экспрессия гена *FOXP3*. Это может происходить и на стадии дважды-положительных клеток, и после утраты CD8 — на стадии CD4<sup>+</sup> тимоцитов (рис. 3.53). Важную роль в индукции регуляторных Т-клеток играют дендритные клетки тимуса, активированные цитокином TSLP (*Thymic stromal lymphopietin* — стромальный лимфопоедин тимуса), секретируемым эпителиальными клетками телец Гассала.

**Таблица 3.15.** Особенности развития регуляторных Т-клеток

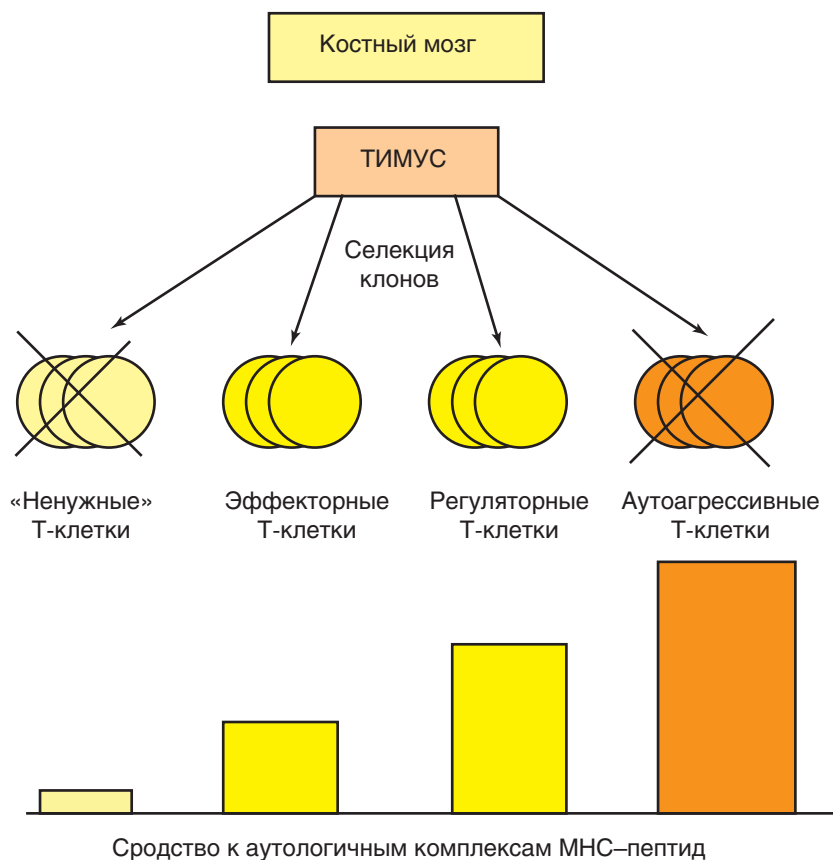
Стадии развития	Особенности регуляторных Т-клеток
Перестройка V-генов Т-клеточного рецептора	В 50–90% регуляторных Т-клеток экспрессируется две перестроенные α-цепи, т.е. есть два отличающихся по специфичности TCR. Спектр семейств β-цепей Т-клеточного рецептора в CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> и CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> Т-клетках в принципе сходен
Селекция	Положительная селекция клонов регуляторных Т-клеток осуществляется с помощью молекул МНС-II, несущих аутологичные пептиды. При мутациях генов, кодирующих МНС-II и AIRE, содержание Т-регуляторов значительно снижено. Отрицательная селекция регуляторных Т-клеток почти отсутствует: порог сродства Т-клеточного рецептора к аутоантигенам, индуцирующего апоптоз этих клеток, значительно выше, чем для других Т-клеток.
Адаптивная дифференцировка	Регуляторные Т-клетки при иммунном ответе дифференцируются под влиянием 3 типов стимулов: стимуляции антигеном (через Т-клеточный рецептор), активации толерогенными дендритными клетками и действием TGFβ.
Факторы дифференцировки	В тимусе: FOXP3, IL-2, IL-2Rα, STAT5, CD28, Jagged 1/2. На периферии: FOXP3, IL-2, IL-2Rα, STAT5, TGFβ, CTLA-4



**Рис. 3.53.** Экспрессия генов CD25 и FOXP3 как ключевые события дифференцировки T<sub>reg</sub>. Указаны внутриклеточные события, лежащие в основе последовательной экспрессии генов CD25 и FOXP3

Экспрессия FOXP3 делает клетки устойчивыми к апоптозу, в результате чего при контакте с дендритными и эпителиальными клетками медуллярной зоны выживают даже клетки, распознающие аутологичные пептиды с высокой степенью сродства (рис. 3.54). В этом и состоит главная отличительная особенность селекции клонов регуляторных Т-клеток в тимусе, называемой агонистзависимой селекцией (что подчеркивает участие аутоантигенов в отборе клеток вместо их элиминации). Именно поэтому у зрелых регуляторных Т-клеток сродство TCR к аутологичным антигенам выше, чем у других Т-лимфоцитов. Функциональные особенности этих клеток (супрессорная, а не эффекторная активность) гарантируют подавление активности аутореактивных эффекторных клеток, избежавших негативной селекции при развитии. По завершении дифференцировки регуляторные Т-клетки начинают экспрессировать мембранные молекулы, важные для выполнения их функций (например, CTLA4, PD-1, GITR). Кроме того, регуляторные Т-лимфоциты приобретают способность вырабатывать суперсessorные цитокины (IL-10, трансформирующий фактор роста  $\beta$ ).

Регуляторные Т-лимфоциты эмигрируют из тимуса в составе популяции зрелых Т-клеток. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> Т-лимфоциты составляют 5% от числа тимоцитов и 3–5% от числа периферических лимфоцитов (5–7% от числа CD4<sup>+</sup> Т-клеток), т.е.  $0,02\text{--}0,06 \times 10^9$  клеток на 1 литр крови. Экспрессия белка FOXP3 регистрируется на несколько большем (10–12%) числе Т-лимфоцитов крови.



**Рис. 3.54.** Особенности отрицательной селекции регуляторных Т-клеток. Схема отражает уровень сродства к аутоантигенам развивающихся Т-лимфоцитов и обусловленную этим судьбу таких клеток. Высокое сродство к аутоантигенам приводит к элиминации обычных, но не регуляторных Т-клеток

### 3.3.2.6. NKT-клетки

Еще одну субпопуляцию Т-клеток обозначают как NKT-клетки, поскольку эти лимфоциты обладают свойствами как Т-лимфоцитов, так и NK-клеток: на их поверхности коэкспрессированы антигенраспознающие рецепторы TCR–CD3 и типичные молекулы NK-клеток — NK1.1, NKR-P1 (CD161), CD56, а также ингибирующие (KIR, NKG2/CD94) и активирующие (NKG2D) рецепторы.

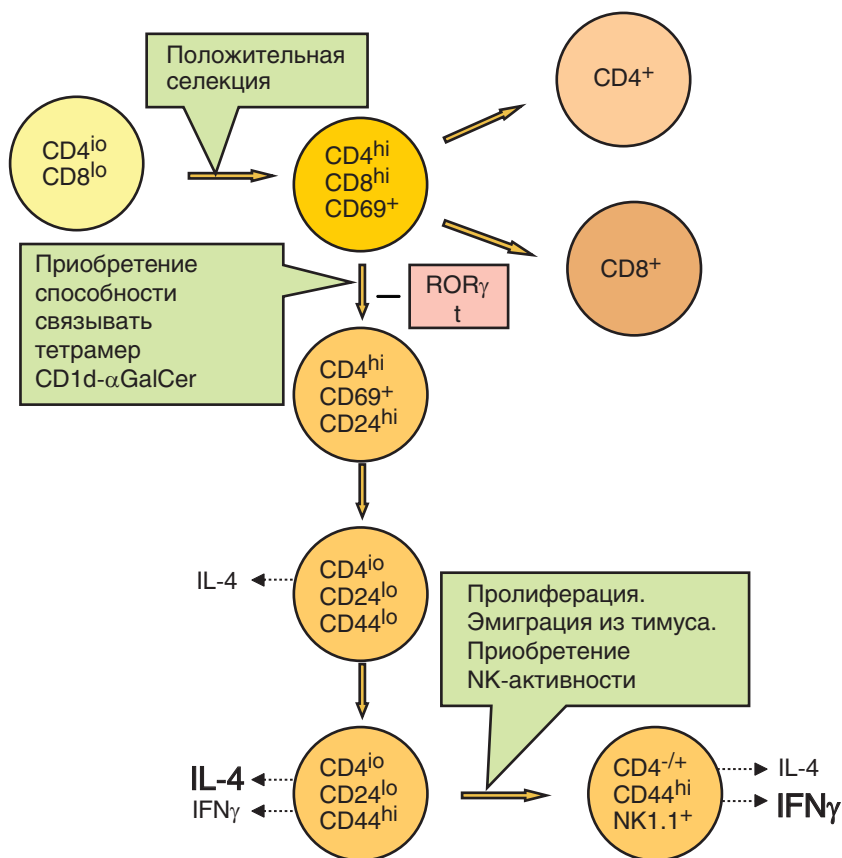
Популяция NKT-лимфоцитов содержит клетки с нормальной гетерогенностью TCR, однако в ней преобладают так называемые инвариантные NKT-клетки (iNKT). TCR инвариантных NKT-клеток содержит вариабельные β-цепи и однородные по составу V-домена α-цепи, которые являются продуктом реаранжировки единственного типа (у мыши в 80% NKT — Vα14-Jα18/Jα28, у человека — Vα24). Значительная часть NKT-клеток экспрессируют оба корцептора, некоторые экспрессируют только CD4. Для

NKT-клеток характерен «активированный» фенотип, т.е. на них представлены мембранные маркеры, свойственные активированным Т-лимфоцитам: CD69, CD95, CD44.

Раньше других лигандов, к которым проявляют сродство рецепторы инвариантных NKT клеток, идентифицирован  $\alpha$ -галактоцерамид ( $\alpha$ GalCer). Этот гликолипид содержится в морских губках. Он распознается NKT-клетками не в контексте классических молекул МНС, а в комплексе с молекулой CD1d. Меченый комплекс этого лиганда с тетрамером CD1d используют для выявления инвариантных NKT-клеток. Однако  $\alpha$ -галактоцерамид едва ли может выполнять роль естественного лиганда NKT-клеток у млекопитающих. Установлено, что эти лимфоциты распознают бактериальный гликолипид  $\alpha$ -глюкуронил, церамиды, гликофинголипиды, презентируемые дендритными клетками в комплексе с молекулой CD1d. NKT-клетки распознают также аутологичные лиганды, в качестве которых может выступать изоглоботригексозилцерамид (iGB3).

По-видимому, в процессе дифференцировки Т-клеток обособление субпопуляции NKT-клеток происходит после перестройки генов TCR («выбора» сегмента V $\alpha$ 14/V $\alpha$ 24). Селекция NKT-клеток имеет ряд важных особенностей. Положительную селекцию NKT-лимфоцитов осуществляют не стромальные клетки, а кортикальные CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> тимоциты, поскольку именно они несут на поверхности молекулу CD1d. После завершения положительной селекции NKT-клетки начинают экспрессировать дифференцировочный фактор ROR $\gamma$ t, определяющий их дальнейшее развитие, а также молекулу CD4. Затем экспрессия CD4 ослабляется или исчезает полностью. Одновременно клетки начинают спонтанно секретировать IFN $\gamma$  и IL-4 (с преобладанием последнего). О существовании отрицательной селекции аутореактивных NKT-клеток свидетельствует снижение их численности при введении их лиганда  $\alpha$ -галактозилцерамида в культуру клеток эмбрионального тимуса. Однако значительная часть NKT клеток сохраняет высокое сродство к аутологичным лигандам (полагают, что они, как и регуляторные Т-лимфоциты, проходят агонист-зависимую селекцию) и выполняет регуляторную функцию. Перед эмиграцией из тимуса NKT-клетки пролиферируют. На периферии секреция IFN $\gamma$  усиливается, тогда как секретировать IL-4 продолжает только CD4<sup>+</sup> фракция этих клеток. Самый последний этап развития NKT-клеток, реализуемый уже на периферии иммунной системы, — экспрессия ими маркеров NK-клеток (рис. 3.55).

Гомеостатическим фактором, поддерживающим численность этих клеток, как и для NK-клеток, служит IL-15. В тимусе NKT-клетки составляют 0,5%, среди покидающих тимус Т-клеток — 5%, среди лимфоцитов крови и лимфатических узлов — менее 1%, в селезенке — 2%. Много NKT-клеток содержится в костном мозгу и печени (у мышей — соответственно 40 и 30% от числа лимфоцитов, у человека почти в 10 раз меньше). Распределение NKT-клеток в тканях регулируется набором экспрессируемых ими рецепторов для хемокинов. NKT-клетки несут CCR7, CCR2, CXCR6. Лиганд CXCR6 (CXCL16) секретируют, главным образом, клетки синусоидов печени; лиганд CCR2 (MCP-1, или CCL2) продуцируется в селезенке, что определяет тропность NKT-клеток к указанным органам. Благодаря наличию CCR7 NKT клетки способны мигрировать в Т-зоны лимфоидных органов.



**Рис. 3.55.** Развитие естественных киллерных Т-клеток (NKT). Признаки Т-клеток (экспрессия Т-клеточного рецептора) проявляются у естественных киллерных Т-клеток значительно раньше, чем признаки естественных киллеров (только после эмиграции из тимуса)

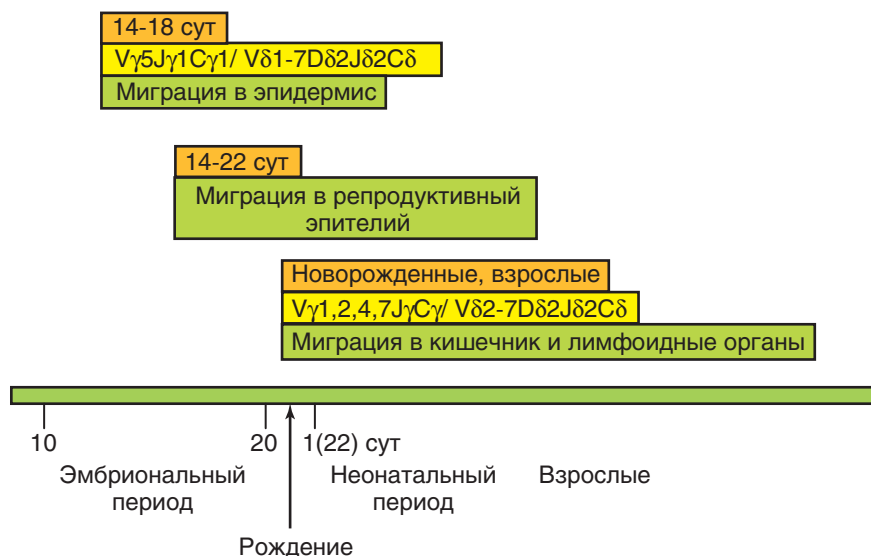
NKT-лимфоциты относят к клеткам врожденного иммунитета. Помимо цитотоксической функции они выполняют роль практически единственного источника цитокинов (в первую очередь  $IFN\gamma$ ) на первом этапе реакции на внедрение патогенов. Кроме того, как уже было отмечено, NKT-клетки могут выполнять регуляторную функцию, ограничивая интенсивность иммунного ответа, а также аутоагрессию.

### 3.3.2.7. $\gamma\delta$ Т-клетки

$\gamma\delta$ Т-клетки — первые Т-лимфоциты, развивающиеся в тимусе эмбрионов: реаранжировка генов  $\gamma\delta$ TCR происходит у мышей на 12-е сутки развития плода (у человека — на 8,5–10-й неделе развития), а перестройка генов  $\alpha\beta$ TCR у мышей — только на 16-е сутки внутриутробного развития (у человека — на 10–14-й неделе).  $\gamma\delta$ Т-клетки составляют основную популяцию Т-лимфоцитов до конца эмбрионального развития. На начальных этапах лимфопоэза в тимусе при формировании  $\gamma\delta$ TCR избирательно используются определенные

зародышевые V-гены, а также сегменты D и J. Так, в тимусе мышей первыми образуются  $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, у которых TCR имеет состав  $V\gamma5J\gamma1C\gamma1/V\delta1D\delta2J\delta2C\delta$ . Эти клетки, начиная с 14-х суток эмбриогенеза, мигрируют в эпидермис. Почти одновременно формируются и эмигрируют в эпителий органов половой системы самок, а также в эпителий языка клетки, несущие TCR состава  $V\gamma6J\gamma1C\gamma1/V\delta1D\delta2J\delta2C\delta$ . Незадолго до рождения и в раннем постнатальном периоде в слизистую оболочку кишечника и лимфоидные органы эмигрируют  $\gamma\delta$ Т-клетки со значительно более разнообразными TCR, содержащими  $\gamma$ -цепи семейств  $V\gamma1$ ,  $V\gamma2$ ,  $V\gamma4$  и  $V\gamma7$  в комбинации с  $V\delta$ -цепями единственного семейства —  $V\delta2$ . Аналогичная картина наблюдается у человека (рис. 3.56). К моменту рождения и особенно после рождения  $\gamma\delta$ Т-клетки перестают доминировать в тимусе — они составляют около 1% от общего числа развивающихся тимоцитов. Это лишь отчасти связано с тем, что  $\gamma\delta$ Т-клетки не подвергаются селекции и быстро покидают тимус.

В периферической крови человека содержание  $\gamma\delta$ Т-клеток также очень мало — около 5% от числа лимфоцитов. Большинство этих клеток содержат в составе TCR  $\delta$ -цепь семейства  $V\delta2$  (обычно  $V\gamma9V\delta2$ ). Преобладающее место локализации  $\gamma\delta$ Т-клеток — барьерные ткани: слизистая оболочка кишечника и респираторного тракта, эпидермис кожи. У мышей содержание  $\gamma\delta$ Т-клеток в пейеровых бляшках, как и в лимфатических узлах — <5% от общего числа клеток, в *lamina propria* — около 10%, а в эпителии слизистой оболочки кишечника — 20–25% (у мышей некоторых линий — до 60–70%). В слизистой оболочке воздухоносных путей  $\gamma\delta$ Т-клеток содержится меньше — 15–20%, в эпидермисе — около 15%. Эпидермальные  $\gamma\delta$ Т-клетки мышей имеют дендритную морфологию (дендритные  $\gamma\delta$ Т-клетки).



**Рис. 3.56.** Периодические волны эмиграции  $\gamma\delta$ Т-клеток из тимуса мышей в эмбриональном периоде. Указаны основные варианты перестройки  $V\gamma$ - и  $V\delta$ -генов эмигрирующих клеток

У человека содержание  $\gamma\delta$ T-клеток во всех названных тканях ниже, чем у мышей. Тем не менее преимущественная локализация  $\gamma\delta$ T-клеток в барьерном эпителии — закономерность, не зависящая от видовой принадлежности.  $\gamma\delta$ T-клетки барьерных тканей преимущественно являются потомками клеток, заселивших эти ткани в эмбриональном периоде. Об этом свидетельствует преобладание в них  $\gamma\delta$ T-клеток с характерным составом TCR: у человека в коже присутствуют T-клетки, содержащие в составе TCR  $V\gamma 3$ , в слизистых оболочках репродуктивного, респираторного трактов и языка —  $V\gamma 4$ , в слизистой оболочке кишечника —  $V\gamma 5$ , во вторичных лимфоидных органах —  $V\gamma 2$  и  $V\gamma 5$ .

Характерная локализация  $\gamma\delta$ T-клеток обусловлена экспрессией соответствующих хемокиновых рецепторов — CCR9 (направляют миграцию этих клеток в тонкий кишечник), CCR4, CCR10 (способствуют миграции в кожу и легкие). Среди  $\gamma\delta$ T-клеток крови >80% экспрессируют хемокиновый рецептор CCR5, что дает им возможность мигрировать в очаги воспаления. С другой стороны,  $\gamma\delta$ T-клетки слизистых оболочек при активации экспрессируют CCR7 и мигрируют в T-зоны лимфоидных органов. Именно поэтому они способны к перемещениям в лимфоидной ткани и в определенных ситуациях могут мигрировать во вторичные лимфоидные органы, несмотря на то, что способность этих клеток к рециркуляции очень ограничена.

Сведения о антигенраспознающей способности  $\gamma\delta$ T-клеток крайне скудны. Поскольку вариабельность  $\gamma\delta$ TCR невелика, спектр антигенов, распознаваемых с его помощью, должен быть ограниченным. Достоверно показана способность  $\gamma\delta$ T-клеток распознавать молекулы T10/T22 — продукты неклассических генов МНС (независимо от презентуемых в них пептидов). Однако эти молекулы распознает лишь 0,2–2%  $\gamma\delta$ T-клеток. Полагают, что экзогенными лигандами  $\gamma\delta$ T-клеток служат микробные фосфопротеины, содержащие изопентенилпирофосфаты, например, белок HMB-PP. Поскольку большинство  $\gamma\delta$ T-клеток лишено CD4 и CD8, они распознают антиген без участия корецепторов, т.е. без ограничения по МНС. В активации  $\gamma\delta$ T-клеток не участвуют костимулирующие молекулы.  $\gamma\delta$ T-клетки способны распознавать также PAMP с помощью TLR-1 и TLR-3, которые они экспрессируют. Подобно естественным киллерам, они распознают стрессорные молекулы MIC с помощью NKG2D и NKG2/CD94.

Показано, что  $\gamma\delta$ T-клетки выполняют по крайней мере 4 функции:

- участвуют в формировании 1-й линии иммунной защиты, играя роль цитотоксических клеток;
- ограничивают чрезмерно интенсивный иммунный ответ и аутоагрессию, выступая в качестве регуляторных T-клеток;
- мигрируя в лимфатические узлы, играют роль АПК (их антигенпрезентирующая способность, по полученным *in vitro* данным, сопоставима с таковой дендритных клеток);
- в барьерных тканях активно взаимодействуют с эпителиальными клетками, поддерживая выживаемость и функциональную активность последних и способствуя регенерации эпителия при его повреждениях.

Как уже отмечено,  $\gamma\delta$ T-клетки не экспрессируют корецепторы CD4 и гетеродимерную форму CD8 $\alpha\beta$ . Однако 20–30% (в некоторых случаях —

до 60%)  $\gamma\delta$ Т-клеток тонкого кишечника несет на поверхности гомодимер  $CD8\alpha\alpha$ . Эти клетки образуют особую субпопуляцию. В толстом кишечнике их содержание значительно ниже — менее 5%. У человека гомодимер  $CD8\alpha\alpha$  экспрессируется только на  $\gamma\delta$ Т-клетках. У мышей выявляют также  $CD8\alpha\alpha$   $\alpha\beta$ Т-клетки. Соотношение  $\gamma\delta$  :  $\alpha\beta$  Т-клеток среди  $CD8\alpha\alpha$  Т-лимфоцитов мышей равно 2 : 1.  $CD8\alpha\alpha$   $\alpha\beta$ Т-клетки не удается идентифицировать у мышей, содержащихся в стерильных условиях

Относительно происхождения этих клеток нет единого мнения. Не вызывает сомнений, что  $\gamma\delta$ Т-клетки не происходят от Т-клеток, мигрировавших из тимуса в эмбриогенезе. Зависимость их развития от тимуса вообще ставят под сомнение. Предположение об их развитии в криптотатках кишечника (см. раздел 3.4) не подтвердилось, как не подтвердилась принадлежность криптотатчей к центральным лимфоидным органам. В то же время допускают возможность развития  $CD8\alpha\alpha^+$  Т-клеток в каких-то других участках лимфоидной ткани кишечника. В настоящее время более склонны считать, что клетки-предшественники  $CD8\alpha\alpha$  Т-клеток на некоторое время все-таки поступают в тимус и покидают его, возможно, на стадии DN3, т.е. после перестройки генов TCR. О зависимости этих клеток от тимуса говорит снижение их числа у тимэктомированных мышей, а также наличие определенных модификаций их генов (например, деметилирования некоторых из них), которые обычно осуществляются в тимусе и поэтому рассматриваются как маркеры клеток, которые определенное время находились в тимусе. Предполагают, что перед эмиграцией из тимуса эти клетки экспрессируют CD122 ( $\beta$ -цепь IL-2/15R) и хемокиновый рецептор CCR9, определяющий их попадание в слизистую оболочку кишечника.

Мембранный фенотип рассматриваемых клеток  $CD3^+CD8\alpha\alpha^+CD2^-CD5^-CD28^-CD4^{+/-}$ . В составе TCR вместо димера  $\zeta_2$  они содержат гомодимер  $Fc\epsilon RI\gamma/Fc\epsilon RI\gamma$  или гетеродимер  $\zeta/Fc\epsilon RI\gamma$ . Ответ клеток на антиген рестриктирован по неклассическим молекулам MHC-I, (возможно, по Qa или TL). Это свидетельствует о том, что гомодимер  $CD8\alpha\alpha$  не функционирует в качестве корецептора (иначе клетки распознавали бы антиген, презентируемый в составе молекулы MHC-I). Его функция до сих пор не установлена. В репертуаре TCR этой субпопуляции сохраняются аутоспецифические клоны (в этом отношении они близки к регуляторным Т-лимфоцитам и НКТ-клеткам).  $CD8\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$ Т-клетки экспрессируют рецепторы, характерные для НК-клеток (см. раздел 2.4.3), и распознают стрессорные молекулы MICA/B. С НК-клетками их сближает и то обстоятельство, что в качестве гомеостатического фактора, определяющего численность этих клеток, выступает IL-15.

Как и клетки других «неклассических» субпопуляций,  $CD8^+$   $\gamma\delta$ Т-клетки, обладают одновременно свойствами эффекторных и регуляторных клеток.  $CD8^+$   $\gamma\delta$ Т-клетки относят к клеткам первой линии защиты. По свойствам этим клеткам близки мукозальные  $CD8^+$   $\alpha\beta$ Т-клетки человека.

Таким образом, популяция Т-лимфоцитов более гетерогенна, чем популяции В- и НК-клеток. Такая гетерогенность проявляется на разных уровнях: структуры антигенраспознающего рецептора; корецепторов, участвующих в распознавании антигена; направленности функционирования — эффекторной или регуляторной; совмещении функций Т- и НК-клеток

и т.д. Гетерогенность Т-лимфоцитов не ограничивается разнообразием естественных субпопуляций. Ниже (см. раздел 3.5.3) будет показано, что в процессе иммунного ответа гетерогенность Т-клеток дополнительно возрастает за счет формирования эффекторных субпопуляций, главным образом, в пределах CD4<sup>+</sup> фракции.

### 3.4. ОРГАНЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Органы иммунной системы часто называют лимфоидными органами. Это обусловлено тем, что лимфоидные (а не миелоидные) клетки нуждаются при выполнении своих функций в межклеточных контактах и, следовательно, в организованных структурах, локализованных в специализированных органах.

Лимфоидные органы разделяют на первичные (центральные) и вторичные (периферические) (см. рис. 1.3). К первичным относят лимфоидные органы, в которых происходит развитие лимфоцитов, ко вторичным — органы, в которых лимфоциты реализуют свои функции. Это деление условно, так как в ряде случаев в одном и том же органе происходят оба процесса. Тем не менее, всегда удастся выделить доминирующую функцию органа, определяющую принадлежность его к той или иной категории. Общая характеристика лимфоидных органов представлена в табл. 3.16.

Таблица 3.16. Органы иммунной системы

Орган	Клеточный состав	Основные процессы
<b>Центральные (первичные) лимфоидные органы</b>		
Тимус	Соединительнотканная строма. Эпителиальный ретикулум. Клетки костномозгового происхождения — мигрирующие в процессе созревания лимфоциты (подавляющее большинство — Т-клетки)	Созревание и селекция Т-лимфоцитов. Перестройка V-генов Т-клеточного рецептора и формирование антигенраспознающего репертуара. Секретция гуморальных факторов (пептиды, цитокины)
Сумка Фабриция (у птиц; аналог — у жвачных)	Лимфоэпителиальная структура. Лимфоидные клетки — в основном В-лимфоциты; присутствуют и Т-клетки	Созревание В-лимфоцитов. Перестройка V-генов иммуноглобулинов и формирование антигенраспознающего репертуара
Костный мозг	Соединительнотканная строма. Развивающиеся клетки крови. Зрелые лимфоциты и плазматические клетки	Развитие клеток крови. В органе представлены эффекторные лимфоциты, плазматические клетки
<b>Вторичные лимфоидные органы (инкапсулированные)</b>		
Лимфатические узлы	Соединительнотканная строма, содержащая дендритные клетки (интердигитальные в Т- и фолликулярные в В-зонах). Т-клетки в паракортесе, В-клетки в фолликулах, их смесь в остальных участках органа	Презентация антигена, доставляемого по лимфогенным путям дендритными клетками. Осуществление всех форм первичного иммунного ответа. Формирование эффекторных клеток и клеток памяти

Продолжение табл. 3.16

Орган	Клеточный состав	Основные процессы
Селезенка	Белая пульпа по строению аналогична лимфоузлам. Содержит Т-, В- и НК-клетки. В красной пульпе преобладают миелоидные и эритроидные клетки; из иммуноцитов — плазматические клетки и бласты. В маргинальной зоне, разделяющей белую и красную пульпу, локализуется субпопуляция MZB-клеток.	Функция белой пульпы аналогична таковой лимфатических узлов с той разницей, что антиген доставляется в селезенку гематогенным путем. Более важную роль играют НК- и НКТ-клетки. Красная пульпа участвует в гомеостазе клеток крови, создает микроокружение для клеток памяти и антителообразующих клеток
<b>Лимфоидные скопления (неинкапсулированные)</b>		
Пейеровы бляшки	По структуре аналогичны лимфоузлам. Отделены от просвета фолликулярным эпителием, содержащим М-клетки, через которые поступает антиген. В находящемся под ними куполе присутствуют дендритные клетки, макрофаги, Т- и В-клетки памяти.	Проходят начальные события первичного иммунного ответа на антигены, поступающие через М-клетки (ответ завершается в региональных лимфоузлах), вторичный иммунный ответ
Миндалины	Группа лимфоидных фолликулов, содержащих В-лимфоциты (преобладают $IgA^+$ клетки); в окружении — Т-лимфоциты, миелоидные клетки и т.д.	Скопление лимфоидных структур в верхних дыхательных и пищеварительных путях обусловлено высокой микробной нагрузкой. Здесь происходят начальные события первичного иммунного ответа, осуществляется вторичный иммунный ответ
Единичные фолликулы	Структуры, аналогичные первичным фолликулам лимфоидных органов. Преобладают $IgA^+$ В-клетки	Инициация иммунного ответа
Криптопатчи	Преобладают $CD3^+CD4^+CD8^-$ Т-клетки (клетки-индукторы лимфоидных тканей — LTIC).	Источник клеток-индукторов лимфоидных тканей. Формирование новых лимфоидных зон в слизистых оболочках в постнатальном периоде
Аппендикс	Содержит конгломераты лимфоидных фолликулов	Часть единой функциональной системы мукозального иммунитета; особое предназначение аппендикса неизвестно
<b>Диффузная лимфоидная ткань</b>		
Слизистые оболочки	Преобладают $CD8^+ \alpha\beta$ Т-клетки памяти и $CD8\alpha\alpha^+ \gamma\delta$ Т-клетки, диффузно распределенные между эпителиальными клетками	Формирование первой линии иммунной защиты и инициация вторичного иммунного ответа

Окончание табл. 3.16

Орган	Клеточный состав	Основные процессы
Кожа	$\gamma\delta$ T-, $CD4^+$ и $CD8^+$ $\alpha\beta$ T-клетки памяти, расположенные между эпителиальными клетками	Первая линия защиты, инициация вторичного иммунного ответа
Нелимфоидные органы (печень, легкие и др.)	Разнообразные лимфоциты, в том числе с необычным фенотипом (например, $CD3^+CD4^+CD8^-$ ); в печени преобладают NK- и NKT-клетки. Т- и В-лимфоциты — в основном клетки памяти	Инициация вторичного иммунного ответа. Неизвестные функции

### 3.4.1. Первичные лимфоидные органы

К первичным лимфоидным органам относят костный мозг и тимус. Костный мозг выполняет более широкие функции — он служит органом гемопоэза и в нем выявляют зрелые лимфоциты (особенно В-клетки памяти). Костный мозг вовлекается в иммунные процессы, особенно при вторичном иммунном ответе он выступает как орган иммуногенеза, в нем реализуются важные события гуморального иммунного ответа.

#### 3.4.1.1. Костный мозг

У взрослых млекопитающих в костном мозгу сосредоточены кроветворные стволовые клетки. Ранее существовало представление о локализации стволовых клеток и ранних предшественников преимущественно в периферической части просвета костного канала, но недавние исследования показали, что стволовые клетки и клетки-предшественники равномерно распределены по всему костному мозгу. Клетки различных типов распределяются в виде островков. Размножающиеся и созревающие клетки располагаются в петлях, образуемых ретикулярными клетками. По мере созревания клетки продвигаются к центру, где проникают в синусоиды и поступают в кровоток.

Рассмотрим костный мозг в качестве органа лимфопоэза. На долю лимфоидных клеток в нем приходится 10–15% ядросодержащих клеток. Среди них 60% — созревающие клетки, а остальные — зрелые клетки, готовые к эмиграции или поступившие из кровотока. У мышей ежедневно костный мозг покидает около 50% общего числа лимфоидных клеток. Обратный приток лимфоцитов из крови в 10 раз меньше. Содержание в костном мозгу В-лимфоцитов выше, чем Т-лимфоцитов (65–70 и 20–30% соответственно).

Среди клеток В-ряда преобладают пре-В-клетки, содержащие  $\mu$ -цепь иммуноглобулина в цитоплазме (у человека — 5,8%), тогда как В-клетки, несущие IgM на поверхности, составляют 2,5% кариоцитов костного мозга. В костном мозгу присутствуют В-клетки памяти, содержащие мембранный IgG или (значительно реже) IgA (всего 1,3%), а также плазматические клетки-антителопродуценты (1–2%). В-клеточная ветвь кроветворения отличается высокой производительностью: за сутки в костном мозгу образуется

значительно больше В-клеток, чем необходимо для обновления популяции В-лимфоцитов (у мышей — 20–50 млн). Очень много клеток гибнет в процессе перестройки генов иммуноглобулинов, а также на стадии незрелых В-клеток в процессе отрицательной селекции вследствие выбраковки аутоспецифических клонов.

Клетки Т-ряда представляют исключительно зрелые лимфоциты, поступающие из кровотока. Преобладают (60% от числа  $CD3^+$  клеток) Т-клетки необычного фенотипа  $CD3^+CD4^+CD8^-$ , сходные с Т-клетками печени, но не идентичные им. Допускается, что эти клетки развиваются вне тимуса. Среди обычных Т-клеток  $CD8^+$  клеток больше, чем  $CD4^+$  клеток: соотношение  $CD4^+/CD8^+$  в костном мозгу составляет 0,5–1,0 (в крови — 1,5–2,0). Оба типа монопопуляционных клеток происходят из крови. Их необычное соотношение объясняют различиями в способности клеток этих субпопуляций мигрировать в костный мозг. Поступление Т-клеток (в том числе незрелых тимоцитов) в костный мозг значительно усиливается при стрессе, что объясняют влиянием глюкокортикоидов.

Существование в костном мозгу развивающихся и приходящих из крови зрелых форм лимфоцитов свидетельствует о том, что костный мозг совмещает признаки центрального и периферического лимфоидного органов.

#### 3.4.1.2. Тимус

Тимус, или вилочковая железа, расположен за рукояткой грудины. У человека и большинства млекопитающих он состоит из двух долей, у птиц и некоторых млекопитающих число долей значительно больше и варьирует.

Долгое время функция тимуса была неизвестна, поскольку его удаление у взрослых животных не приводило к серьезным последствиям. Только в 1961 г. австралийский иммунолог Дж. Миллер (*J.F.A.P. Miller*) установил, что удаление тимуса у новорожденных мышей приводит к нарушению развития лимфоцитов — не всех, но большинства. Так был установлен факт гетерогенности лимфоцитов и была обнаружена популяция тимусзависимых или Т-лимфоцитов, т.е. лимфоцитов, развитие которых происходит в тимусе.

##### *Структура тимуса*

Тимус состоит из двух основных частей — коры и мозгового вещества. В коре выделяют наружный, субкапсулярный слой, глубокую кору и кортикомедуллярную зону (или кортикомедуллярное сочленение). Тимус покрыт соединительнотканной капсулой, от которой внутрь коры отходят междольковые перегородки, разделяющие кору на дольки. Мозговая часть тимуса не разделена на дольки. Кортикомедуллярное сочленение служит воротами тимуса, в которые входят и выходят кровеносные сосуды и нервы. Сосудистая сеть тимуса бедна («бледный орган»). Наиболее важны в функциональном отношении посткапиллярные венулы, через стенку которых в тимус проникают клетки-предшественники и выходят зрелые Т-лимфоциты. Схематически строение тимуса отражено на рис. 3.57.

Гистологически тимус представляет лимфоэпителиальный орган. Он имеет трехслойную структуру, включающую обычную соединительнотканную строму, эпителиальный ретикулум и лимфоидную составляющую (табл. 3.17). Эпителиальные и большая часть соединительнотканых элементов тимуса имеют местное происхождение. Лимфоциты тимуса,

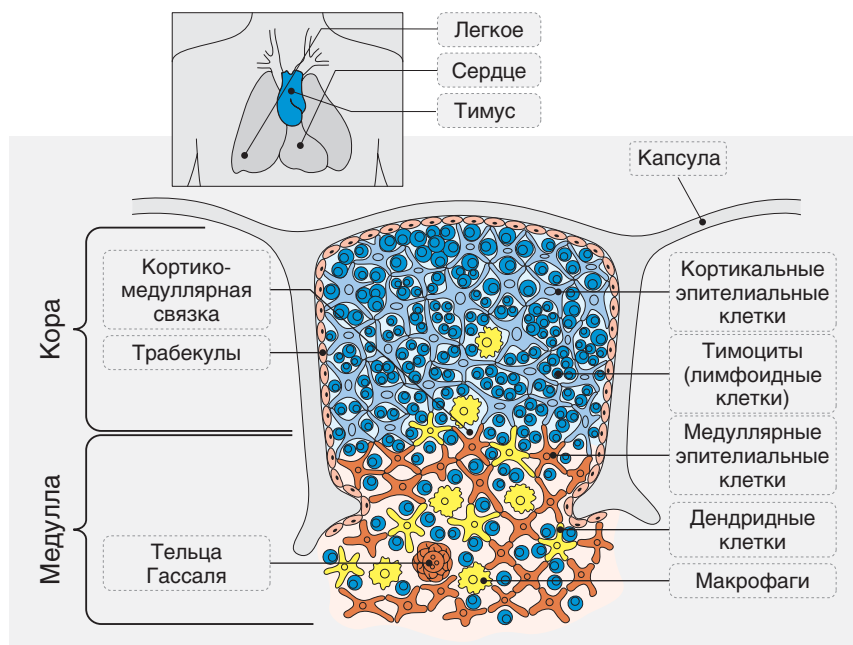


Рис. 3.57. Схема строения тимуса (по Janeway C.A., 2005)

называемые тимocyтами, а также макрофаги, дендритные и тучные клетки происходят из клеток-предшественников, мигрирующих в этот орган из костного мозга. Тимocyты численно преобладают и являются транзиторными элементами, поскольку подавляющее большинство их покидает тимус по мере созревания.

Соединительнотканная строма формирует капсулу, междольковые перегородки и периваскулярное пространство. В последнем содержатся фибробласты, соединительнотканные волокна, макрофаги, тучные клетки, В-лимфоциты, нейтрофилы. Доля соединительнотканного пространства в тимусе очень невелика. Основной объем органа занимает эпителиальное (внутреннее) пространство — участки тимуса, ограниченные эпителиальными клетками и базальной мембраной. Эпителиальные клетки образуют трехмерный каркас — эпителиальный ретикулум, внутри которого происходят основные события, связанные с развитием Т-лимфоцитов. Таким образом эпителиальная составляющая тимуса фактически представляет паренхиму органа. В эпителиальном каркасе кортикомедуллярной зоны содержатся макрофаги, а в мозговом веществе — еще и дендритные клетки.

Специфическая функция тимуса состоит в обеспечении развития (созревания, селекции, дифференцировки) Т-лимфоцитов. В этом задействованы преимущественно эпителиальные клетки. Определенный вклад в этот процесс вносят соединительнотканные элементы и дендритные клетки тимуса. Доказательства различного происхождения лимфоидных и эпителиальных клеток тимуса, а также данные о гистогенезе тимусного эпителия были получены в опытах с межвидовой трансплантацией клеток эмбрионов кур

и перепелов, а также с культивированием и пересадкой меченых клеток «закладки» тимуса.

#### *Гистогенез тимусного эпителия*

Эпителиальные клетки тимуса происходят из энтодермы 3–4-го глоточного кармана (существовавшее до недавнего времени представление о смешанном, энтодермально-эктодермальном происхождении тимусного эпителия отвергнуто). В их развитии участвует нервный гребень, служащий источником индукторов дифференцировки эпителия. Кроме того, клетки, происходящие из мезенхимы нервного гребня, мигрируют в зачаток тимуса (некоторые считают, что из них развиваются клетки, продуцирующие нейrogормоны). Важным достижением было обнаружение общих клеток-предшественников кортикального и медуллярного эпителия. Подсадка этих клеток под почечную капсулу приводит к развитию эктопического тимусного эпителия.

**Таблица 3.17.** Нелимфоидные клетки тимуса

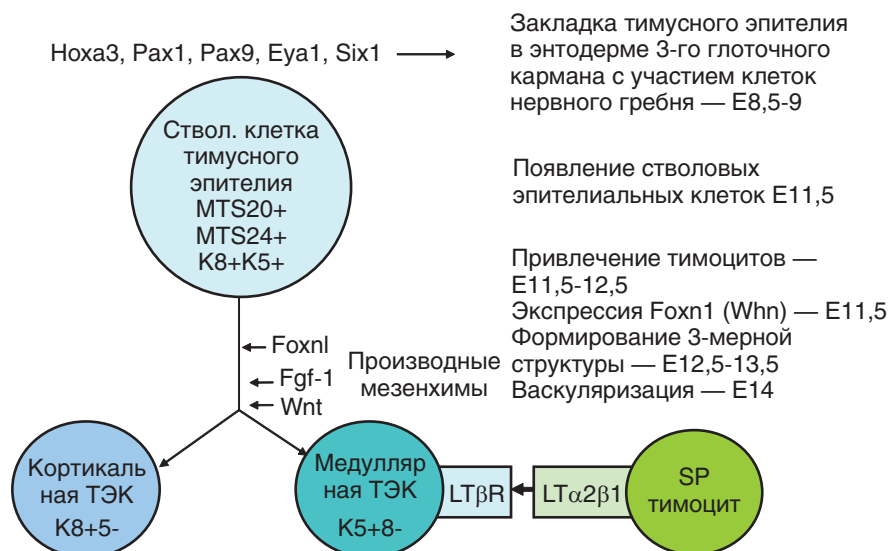
Тип клеток	Разновидности	Локализация	Маркеры	Продукты	Функции
Эпителиальные клетки	Субкапсулярные	Субкапсулярная зона коры	CK5 <sup>+</sup> , CK8 <sup>+</sup> , MHC-II, LFA-3, ICAM-1, VCAM-1	Гормоны тимуса: тимулин, $\alpha$ 1-тимозин, тимопоэтин. Цитокины: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-7, LIF, IL-8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CCL1, CCL2, CCL5, CCL11, CCL17, CCL19, CCL21, CCL22, CCL25	Дифференцировка тимоцитов
	Кортикальные, в том числе клетчатка	Кора тимуса	CK5 <sup>+</sup> , CK8 <sup>+</sup> , MHC-II, LFA-3, ICAM-1, VCAM-1	Цитокины: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, GM-CSF, SCF, CXCL12, CCL25	Дифференцировка тимоцитов, положительная селекция
	Медуллярные	Мозговой слой	CK5 <sup>+</sup> CK8 <sup>+</sup> ; MHC-II, CD80, CD86, ICAM-1, VCAM-1, LFA-3, CD40	Гормоны тимуса: тимулин, $\alpha$ 1-тимозин, тимопоэтин. Цитокины: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-7, LIF, IL-8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CCL1, CCL2, CCL5, CCL11, CCL17, CCL19, CCL21, CCL22, CCL25	Дифференцировка тимоцитов, отрицательная селекция
	Клетки телец Гассала	Мозговой слой	CK5 <sup>+</sup> CK8 <sup>+</sup> ; MHC-II	TSLA	Дифференцировка регуляторных Т-клеток

Окончание табл. 3.17

Тип клеток	Разновидности	Локализация	Маркеры	Продукты	Функции
Миелоидные клетки	Дендритные клетки (лимфоидные и миелоидные)	Мозговой слой	MHC-II, CD80, CD86, CD40, TLR, CD11c	Миелоидные — $IFN\alpha$ , IL-12, CCL10, CCL17, CCL 25, лимфоидные — CCL4, CCL10, M-CSF	Отрицательная селекция тимоцитов, дифференцировка
	Макрофаги	Кортико-медуллярный и мозговой слои	CD14, $IFN\gamma$ R, VLA-4, CD40, TLR	IL-1, TNF, IL-6, простагландин E2	Дифференцировка тимоцитов, источник цитокинов
Миоидные клетки		Мозговой слой	AcChR	TNF $\alpha$ , IL-8, IL-6	Пролиферация, дифференцировка тимоцитов
Фибробласты		Внеэпителиальный компартмент	ICAM-1	SCF, IL-7, GM-CSF, Flt-3-L, LIF, IL-6, IL-1, FGF, простагландин G, простагландин F, TFG $\beta$ , CXCL12	Механическая функция, источник цитокинов

Формирование и развитие закладок тимуса и локализуемой рядом закладки паращитовидных желез контролируется каскадом дифференцировочных факторов (Noxa3, Pax1, Pax9, Eya1 и Six1), экспрессируемых в глоточной энтодерме (рис. 3.58). Наиболее важную роль играют факторы Noxa3 и Pax9, отсутствие которых приводит к атимии. Фактору Noxa3 приписывается роль позиционирующего агента, который определяет связь закладки рудиментов тимуса и паращитовидных желез с 3-м глоточным карманом, а фактор Pax9 отвечает за обособление закладки тимуса от глотки. Разделение закладок тимуса и паращитовидных желез и начало дифференцировки эпителиальных клеток тимуса связывают с другими транскрипционными факторами — Foxn1 и Gcm2. Наконец, очередной этап развития эпителиальной закладки тимуса и ее функциональная полноценность контролируются фактором Foxn1 (Foxhead box N1); мутации кодирующего его гена служат основой патологии тимуса у мышей nude («голые» мыши), у которых эпителиальная строма тимуса формируется, но не функционирует, поскольку не заселяется лимфоидными предшественниками. Экспрессию гена Foxn1 регистрируют в клетках глоточной энтодермы в срок E.10,5 (буква E означает эмбриональное развитие, цифра — сутки).

Родоначальные клетки тимусного эпителия впервые выявляются на сроке E.11,5. Они одновременно экспрессируют цитокератины (СК) 5 и 8. Через сутки (E.12,5) происходит миграция первых лимфоидных клеток-предшественников в закладку тимуса. Осуществляется она не через сосуды, которые пока отсутствуют, а путем прямого перемещения в тканях. На протяжении трех следующих суток (до E.15,5) происходит формирование функциональ-



**Рис. 3.58.** Формирование и развитие эпителия тимуса. Отражена дифференцировка эпителиальных клеток тимуса с указанием экспрессируемых ими цитокератинов и дифференцировочных факторов. Указаны основные события раннего развития закладки тимуса

но полноценного эпителиального ретикулума — создается его трехмерная структура, происходит васкуляризация и дифференцировка родоначальных эпителиальных клеток тимуса в кортикальные (СК8<sup>+</sup>) и медуллярные (СК5<sup>+</sup>) эпителиальные клетки. В этот период на развитие тимусного эпителия влияют мезенхимальные производные нервного гребня через продукты генов *Fgf* (*Fibroblast growth factors*), *Wnt* (*Wingless*), *Bmp* (*Bone morphogenetic proteins*) и *Shh* (*Sonic-hedgehog homologue*). Наиболее полно изучена роль ростового фактора FGF (продуктов генов *Fgf*), секретируемого клетками экто/мезодермы. На ранних этапах развития тимуса функционируют факторы FGF-7 и FGF-10. На эпителиальных клетках тимуса экспрессирован рецептор для этих факторов — FgfR-IIIb. Продукт гена *Shh* регулирует экспрессию фактора Tbx1 в эпителиальных клетках тимуса; дефект этого фактора у человека проявляется как синдром Ди Джоджи (дисгенезия тимуса).

В более поздний период очень важную роль приобретает взаимодействие между эпителиальными и лимфоидными клетками, в реализации которого основную роль играют продукты гена *Wnt*. Важнейшие события последующего развития эпителиальной стромы:

- разделение на кору и мозговую слой с формированием кортико-медуллярной структуры органа (между 13–14-ми сутками);
- экспрессия на эпителиальных клетках функционально важных молекул.

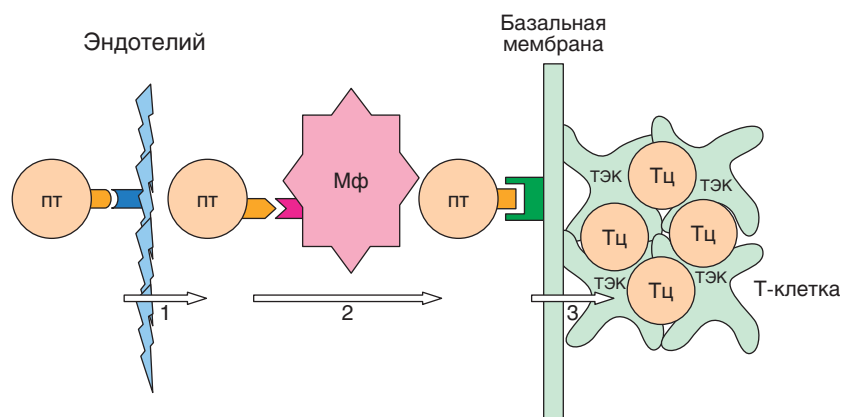
В первую очередь следует отметить экспрессию молекул Jagged и Delta — лигандов основных дифференцировочных факторов Т-клеток — Notch-1 и Notch-3. Не менее важное свойство эпителиальных клеток тимуса —

секреция IL-7 как основного лимфопоэтического цитокина, служащего фактором выживаемости и роста развивающихся тимоцитов. Несколько позже эпителиальные клетки тимуса начинают экспрессировать молекулы МНС-II, необходимые для осуществления дифференцировки и селекции клонов Т-клеток. Эти маркеры сначала экспрессируются на эпителиальных клетках мозгового слоя (Е.14), а затем коркового (Е.16). Формирование структуры мозгового слоя происходит при активном участии медуллярных тимоцитов и специализированных клеток, участвующих в гистогенезе вторичных лимфоидных органов (см. далее) — LTIC (*Lymphoid tissue inducer cells*). Экспрессируемые ими мембранные рецепторы семейства TNF — гетеродимер лимфотоксина  $LT\alpha\beta_2$  и RANKL (*Receptor activator of nuclear factor NF- $\kappa$ B ligand*) — взаимодействуют с соответствующими рецепторами семейства TNFR на поверхности эпителиальной клетки. В результате клетки эпителия начинают вырабатывать комплекс хемокинов и цитокинов, обеспечивающих развитие и структурную организацию мозгового слоя и поздние этапы дифференцировки тимоцитов.

#### **Заселение тимуса лимфоидными клетками и гематотимический барьер**

Заселение тимуса кроветворными клетками-предшественниками происходит импульсно. Так, у птиц четко выявляют 3 периода заселения, между которыми происходит развитие тимоцитов и их эмиграция на периферию. У мышей выявлено 2 периода заселения — 11–13-е и 17–19-е сутки эмбрионального развития. Клетки-предшественники, мигрирующие из фетальной печени, созревают в  $\gamma\delta$ Т-клетки с ограниченной вариабельностью TCR, покидающие тимус еще в эмбриональном периоде. Первая волна эмиграции происходит на 15–16-е сутки внутриутробного развития; сначала эмигрирующие  $\gamma\delta$ Т-клетки поступают в кожу, затем в слизистые оболочки языка и репродуктивной системы самок. В последующем эти клетки самоподдерживаются местно. Позже в тимусе начинают формироваться  $\gamma\delta$ Т-клетки с более широким спектром специфичностей TCR, покидающие тимус вскоре после рождения (до 13 сут) и заселяющие различные слизистые оболочки. С 16-х суток эмбриогенеза в тимусе начинают развиваться  $\alpha\beta$ Т-клетки. На 17–19-е сутки внутриутробного развития происходит вторая волна заселения тимуса клетками-предшественниками. Считают, что потомки клеток-предшественников, поступивших в тимус во время этой волны, не покидают его, образуя резерв для срочной регенерации органа после стресса и воздействия разнообразных повреждающих факторов. У человека ранние этапы функционирования тимуса происходят принципиально так же, как у мышей. Закладка эпителия тимуса происходит на 6-й неделе развития плода, первая волна заселения осуществляется на 8-й неделе эмбрионального развития.

После рождения устанавливается режим миграции клеток через тимус, характерный для взрослых животных. Клетки-предшественники из костного мозга поступают в тимус постоянно в очень небольшом количестве (в тимусе мыши есть всего около 200 «ниш», способных принять мигрирующие клетки), а зрелые клетки из тимуса эмигрируют постоянно. Миграция клеток-предшественников в тимус представляет довольно сложный процесс. Прежде всего тимус должен поставлять хемотаксические сигналы.



**Рис. 3.59.** Гематотимический барьер и его преодоление предшественниками тимоцитов: 1 — сосудистой стенки; 2 — внеэпителиального пространства; 3 — базальной мембраны тимусного эпителия

Передача таких сигналов происходит при помощи CXCL12 (SDF-1), CCL25 (TECK) и некоторых других хемокинов, продуцируемых эпителиальными клетками тимуса. Для восприятия таких сигналов на поверхности клеток-предшественников имеются рецепторы — CXCR4, CCR9 и CCR5. Блокада этих рецепторов антителами затрудняет заселение тимуса.

Тимус изолирован от проникновения в него клеток извне с помощью гематотимического барьера (рис. 3.59). Этот барьер состоит из трех компонентов: первый — эндотелий посткапиллярных венул. Мигрирующие клетки преодолевают его благодаря взаимному с клетками эндотелия сосудов распознаванию молекул адгезии. Установлена роль в иммиграции клеток-предшественников в тимус селектинов L и P,  $\alpha_4$ -интегринов (VLA-4 или  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_7$ ). Рецепторы названных интегринов — фибронектин, VCAM-1 и MadCAM экспрессируются в зонах проникновения клеток-предшественников в тимус. В этом процессе задействованы также  $\beta_2$ -интегрин LFA-1,  $\beta_1$ -интегрин VLA-6 и их рецепторы ICAM-1 и ламинин соответственно. Судя по блокирующему эффекту антител, важную роль при миграции клеток в тимус играют молекулы CD44 (экспрессируемые на поверхности мигрирующих клеток и исчезающие вскоре после поступления в тимус), а также молекула VAP-1 (*Vascular adhesion protein 1*), экспрессируемая только в венах тимуса. Второй компонент барьера образован макрофагами и другими клетками периваскулярного пространства. Избежать поглощения макрофагами клеткам помогает блокада сиаловой кислотой свободных углеводных остатков их поверхностных гликопротеинов. Для перемещения в межклеточном пространстве важна экспрессия на поверхности клеток-предшественников  $\beta_1$ -интегринов, в частности VLA-4 и VLA-6, взаимодействующих с белками межклеточного матрикса, — соответственно фибронектином и ламинином. Продвижению клеток-предшественников способствует их инвазивность, обусловленная выделением ферментов гиалуронидазы и коллагеназы, расплавляющих межклеточный матрикс. Третий и наименее

проницаемый компонент барьера — эпителиальные клетки, ограничивающие эпителиальное пространство тимуса, а также их базальная мембрана. Этот барьер преодолевается благодаря экспрессии на клетках-предшественниках Р-селектинов, взаимодействующих с молекулами GlyCAM, MadCAM, и молекулы CD44, реагирующей с гиалуронатом межклеточного матрикса. Гематотимический барьер распространяется на кору, но не на мозговое вещество тимуса, в которое могут мигрировать циркулирующие клетки крови. Полагают, что в преодолении барьера, образованного базальной мембраной, важная роль принадлежит металлопротеиназам.

***Разнообразие эпителиальных клеток тимуса и их функции*** (см. табл. 3.17)

Эпителиальные клетки субкапсулярного, глубокого коркового и мозгового слоев тимуса отличаются рядом свойств. Все эти клетки имеют звездчатую форму. В тимусе молодых животных содержится много тимоцитов, поэтому эпителиальные клетки трудно выявить, поскольку они сдавлены тимоцитами. Изучение этих клеток проводят *in vitro* в культурах клеток. Функции эпителиальных клеток проявляются в полной мере только в трехмерной культуре — при выращивании клеток на губчатых каркасах. Выделяют секреторные и ретикулярные (поддерживающие) эпителиальные клетки тимуса, однако это деление условно, поскольку практически все клетки тимусного эпителия способны выполнять обе функции и преобладание той или другой из них зависит от локализации и функционального состояния клетки.

По-видимому, основные функции эпителиальных клеток тимуса реализуются в форме контактных взаимодействий. Выше было сказано о ключевой роли межклеточных взаимодействий, в основе которых лежит взаимное распознавание лигандов и рецепторов дифференцировочных факторов семейства Notch. Аналогично проявляют свое действие некоторые другие дифференцировочные факторы. Помимо этого большая группа мембранных молекул обеспечивает межклеточную адгезию, в частности, контакты эпителиальных и лимфоидных клеток тимуса. В формировании этих контактов основную роль играют молекулы адгезии — CD2 тимоцитов и LFA-3 (CD58) эпителиальных клеток. Важную дополнительную роль играют интегрины и их рецепторы. На поверхности эпителиальных клеток есть рецепторы  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -интегринов — соответственно, молекулы ICAM-1 и VCAM-1, взаимодействующие с интегринами LFA-1 ( $\beta_1$ -интегрин), VLA-4 и VLA-6 ( $\beta_2$ -интегрины) на поверхности тимоцитов. Достаточно прочные контакты между эпителиальными и лимфоидными клетками важны как для передачи ростовых и дифференцировочных сигналов, так и для осуществления селекции. Как уже отмечалось выше, кортикальные эпителиальные клетки отвечают за положительную, а медуллярные — за отрицательную селекцию. И в том, и в другом случае необходима экспрессия на эпителиальных клетках молекул МНС-I и МНС-II. В тимусе многие эпителиальные клетки, особенно кортикальные, экспрессируют на поверхности эти молекулы. МНС-II в трехмерной культуре эпителиальных клеток тимуса экспрессируются сильнее, чем в обычной двумерной культуре, что, как полагают, и определяет разную степень функциональной активности эпителиальных клеток в указанных типах культур. Эпителиальные клетки тимуса несут на своей поверхности

молекулы, необходимые для осуществления эффективной передачи сигнала в процессе селекции. Экспрессия костимулирующих молекул CD80, CD86 и CD40 закономерно проявляется только на эпителиальных клетках медуллярной зоны тимуса.

Среди эпителиальных клеток тимуса выделяют особую их разновидность — клетки-няньки. Они расположены в слоях коры, промежуточных между поверхностными и глубокими. Эти клетки образуют агрегаты путем обволакивания тимоцитов (сначала полагали, что клетки-няньки поглощают тимоциты). Одна клетка-нянька может окружать несколько сотен тимоцитов. Через 10–12 сут после выделения и культивирования таких агломератов *in vitro* происходит выход из них тимоцитов. Считалось, что таким образом формируется микроокружение, оптимальное для дифференцировки Т-клеток. Однако после обнаружения апоптоза тимоцитов внутри клеток-нянек возникло предположение об участии этой формы эпителиальных клеток в элиминации тимоцитов, не поддержанных селекцией.

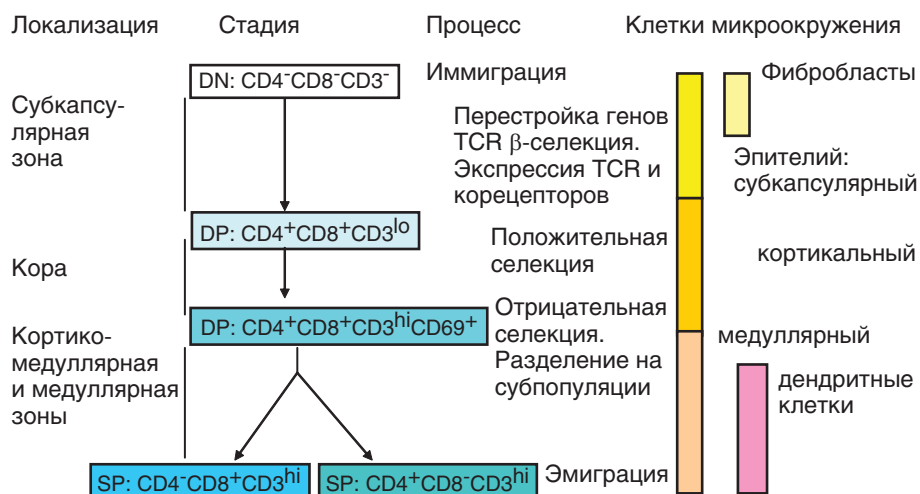
Своеобразную морфологическую структуру, образованную эпителиальными клетками, представляют тельца Гассалья. Они расположены в медуллярной части тимуса человека и некоторых животных (их нет в тимусе мыши) и выглядят как многослойное чешуйчатое образование, напоминающее срез луковицы. Эпителиальные клетки телец Гассалья несколько отличаются по мембранным маркерам и гуморальным продуктам от других медуллярных клеток. В центре телец Гассалья расположены нежизнеспособные ороговевшие клетки, что послужило основанием считать тельца Гассалья участками ороговения эпителиальных клеток. Однако недавно установлено, что клетки телец Гассалья секретируют цитокин TSLP, влияющий на дендритные клетки. Дендритные клетки, активированные TSLP, играют важную роль при дифференцировке регуляторных Т-клеток; кроме того, они индуцируют дифференцировку аллергического варианта Th2-клеток (см. раздел 4.5.1.3).

Функция эпителиальных клеток тимуса реализуется также через выделяемые ими гуморальные факторы — прежде всего цитокины. Важнейший продукт эпителиальных клеток тимуса — IL-7. Образующий в тимусе IL-7, пополняет (наряду с IL-7, секретируемым стромальными клетками периферических лимфоидных органов) пул фактора в периферической части иммунной системы, необходимый для поддержания гомеостаза популяции Т-лимфоцитов (см. раздел 3.4.3). Эпителиальные клетки тимуса секретируют цитокины, обычно выступающие в качестве провоспалительных факторов — IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ . Однако в тимусе они выполняют функцию дифференцировочных факторов, нередко оказывая действие в комбинации друг с другом. По-видимому, цитокины тимуса формируют «малую цитокиновую сеть», обладающую автономией по отношению к общей цитокиновой сети организма. В этой малой сети некоторые цитокины (например, воспалительные) могут выполнять функции, вне тимуса не являющиеся для них основными. Особую роль в тимусе играют хемокины, определяющие направление миграции тимоцитов внутри органа, о чем будет упомянуто ниже. Наконец, клетки тимуса (преимущественно эпителиальные) секретируют многочисленные нейропептиды и пептидные гормоны, которые будут рассмотрены далее (см. раздел 3.4.1.4).

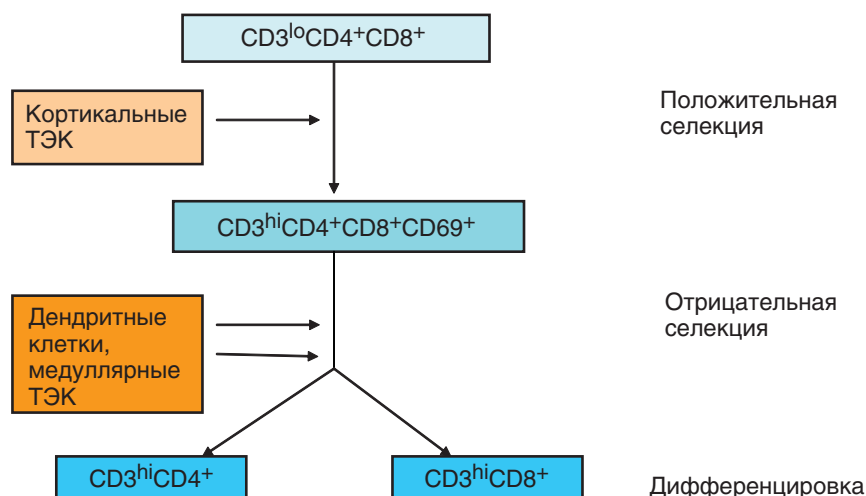
**Лимфоидные клетки тимуса** (см. табл. 3.13)

Тимоциты образуют наиболее многочисленную популяцию клеток тимуса. Здесь представлены все стадии развития тимоцитов, о которых говорилось выше (см. раздел 3.3.2.3 и рис. 3.45, 3.46). Наименее зрелые  $CD^+CD8^+CD3^-$  тимоциты расположены в субкапсулярной зоне тимуса. На их долю приходится 3–5% от общего числа тимоцитов. На первой стадии (DN1) происходит чрезвычайно интенсивная пролиферация клеток. На следующих стадиях развития дваждыотрицательных клеток осуществляется перестройка V-генов TCR, экспрессия мембранных рецепторов и формирование определяемого ими первичного (т.е. не прошедшего селекции) антигенраспознающего репертуара. Все этапы развития тимоцитов проходят в определенных зонах тимуса с характерным микроокружением, формируемым в наибольшей степени эпителиальными клетками и их продуктами (рис. 3.60).

Клетки с мембранным фенотипом  $CD4^+CD8^+$  составляют наиболее многочисленную фракцию тимоцитов. На их долю приходится 70–75% общего числа лимфоидных клеток тимуса. Они локализуются в коре (преимущественно в ее глубоких слоях). На этой стадии происходят оба этапа селекции — положительная и отрицательная, формируется вторичный (селекционированный) антигенраспознающий репертуар, обеспечивающий распознавание пептидов в составе молекул MHC (рис. 3.61). Кортикальные тимоциты особенно чувствительны к индукции апоптоза в связи со слабой экспрессией антиапоптотических факторов. В частности, они погибают при действии глюкокортикоидов (кортизончувствительные тимоциты). В «отобранных» тимоцитах, получивших сигналы к дальнейшему развитию от эпителиальных клеток, усиливается экспрессия антиапоптотических



**Рис. 3.60.** Стадии развития тимоцитов и контролирующие их типы эпителия. Отражена связь основных этапов развития тимоцитов с различными клетками стромы и эпителиального ретикулума тимуса. Указаны зоны тимуса, в которых локализуются клетки (слева) и основные процессы развития тимоцитов (справа)

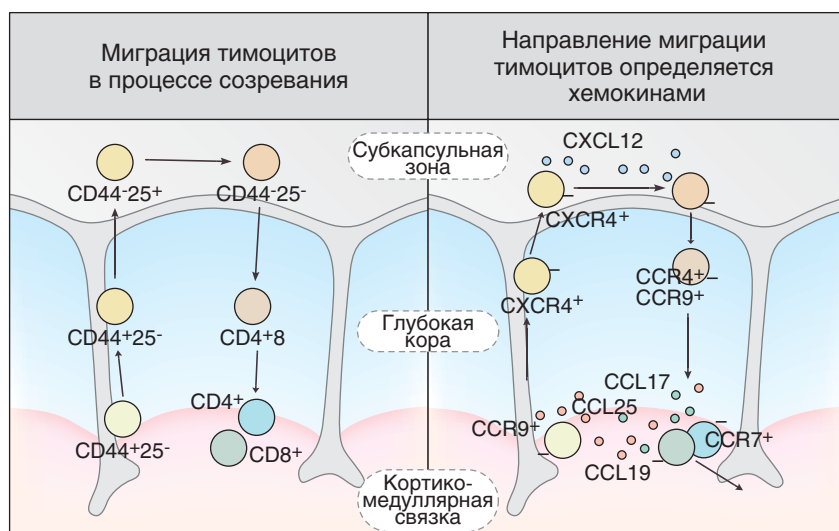


**Рис. 3.61.** Связь селекции и дифференцировки при развитии тимоцитов. ТЭК — тимусные эпителиальные клетки

факторов. Одновременно возрастает экспрессия рецепторного комплекса TCR-CD3 и появляется маркер активации CD69.

В мозговом слое тимуса сосредоточены зрелые моноположительные тимоциты. На долю  $CD4^+CD8^-$  клеток приходится около 10% (из них 2–3% — регуляторные  $CD4^+CD25^+$  клетки), на долю  $CD4^-CD8^+$  клеток — около 5% лимфоидных клеток тимуса. Все эти клетки экспрессируют комплекс TCR-CD3 с высокой плотностью. Медуллярные тимоциты содержат так называемые Т-рецепторные эксцизионные кольца (TREC) — кольцевые молекулярные структуры, образующиеся в процессе реаранжировки V-генов в результате замыкания в кольцо участков ДНК, вырезаемых из зародышевых V-генов (см. раздел 3.1.4.1). Эти структуры выявляют с помощью полимеразной цепной реакции. Различают сигнальные и кодирующие эксцизионные кольца, образующиеся соответственно при реаранжировке генов  $\delta$ - и  $\alpha$ -цепей (ген *TRDV* локализован внутри кластера *TRAV* и может подвергаться перестройке дважды — при построении зрелых генов *TRDV* и *TRAV*). Они персистируют в Т-клетках некоторое время после их выхода из тимуса и служат маркером «недавних мигрантов из тимуса». Моноположительные тимоциты обладают функцией соответственно Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов. Однако их функциональная активность выражена слабее, чем у аналогичных клеток периферического отдела иммунной системы (например, при активации они слабее секретируют IL-2 и IFN $\gamma$ ). Некоторые медуллярные тимоциты, по-видимому, остаются в тимусе и служат источником цитокинов, необходимых для формирования полноценного микроокружения этого органа. Остальные тимоциты покидают тимус через посткапиллярные вены.

Перемещение созревающих тимоцитов внутри тимуса определяется градиентом хемокинов, секретируемых стромальными (преимущественно эпителиальными) клетками, а также наличием на поверхности тимоцитов соответствующих рецепторов (рис. 3.62). Хотя не все детали этого процесса



**Рис. 3.62.** Миграция развивающихся Т-клеток внутри тимуса и зависимость ее направленности от хемокинов. Слева отмечен путь миграции тимоцитов в процессе созревания, справа — хемокины и хемокиновые рецепторы тимоцитов, ответственные за направленный характер перемещений

изучены досконально, известно, что перемещение тимоцитов из кортикомедуллярной в субкапсулярную зоны осуществляется по градиенту SDF-1 (CXCL12), чему способствует возрастающая на этом этапе развития клеток экспрессия соответствующего хемокинового рецептора — CXCR4. На следующем этапе развития тимоциты перемещаются с поверхности коры в глубь ее. Клетки движутся в направлении мест выработки хемокина TECK (CCL17), к которому они экспрессируют рецептор CCR9. Экспрессия рецептора CCR7 на заключительном этапе внутритимусного развития Т-клеток обеспечивает их перемещение к кортикомедуллярной зоне. Эндотелиальные клетки венул, через которые осуществляется эмиграция, секретируют хемокин ELC (CCL19), распознаваемый названным CCR7. Рецептор для сфингозина необходим для обеспечения эмиграции тимоцитов в ответ на сигнал от сфингозин-1-фосфата.

#### *Другие клеточные популяции тимуса* (см. табл. 3.17)

Помимо тимоцитов в тимусе содержатся другие клетки гематогенного происхождения — макрофаги, В-лимфоциты, дендритные, тучные и миоидные клетки. За исключением дендритных и миоидных, упомянутые клетки не отличаются по свойствам и функции от аналогичных клеток вне тимуса.

Дендритные клетки составляют один из наиболее важных в функциональном отношении типов клеток вилочковой железы. Популяция дендритных клеток тимуса содержит примерно равные количества миелоидных и лимфоидных (плазматоидных) вариантов. Большинство из них дифференцируется в тимусе из предшественников, общих для них и тимоцитов,

однако некоторые дендритные клетки тимуса, как полагают, имеют внетимусное происхождение. Основная функция миелоидных дендритных клеток тимуса состоит в осуществлении отрицательной селекции и формировании центральной аутоотолерантности. Считают, что плазмацитоидные дендритные клетки в тимусе, как и вне его, секретируют IFN $\alpha$ , однако роль этого цитокина в тимусе точно не установлена.

Миоидные клетки обладают свойствами, характерными для мышечных и, в меньшей степени, эпителиальных клеток. Они содержат десминовые филаменты, экспрессируют мышечные белки миоглобин, тропонин, распин, синаптофизин. На их поверхности присутствуют рецепторы для ацетилхолина. Миоциты локализуются, главным образом в окружении телец Гассалья и внутри них. Интерес к этой немногочисленной клеточной популяции связан с тем, что они вовлекаются в патологию при тяжелой миастении (миастении гравис), часто сопровождающейся развитием тимом — опухолей, растущих из эпителиальных клеток тимуса.

#### ***Автономия тимуса. Возрастная инволюция***

Тимус — в значительной степени автономный орган. Он слабо реагирует на потребности периферического отдела иммунной системы (например, на разрушение периферических Т-клеток) и всегда работает с постоянной интенсивностью. При пересадке в один организм нескольких тимусов каждый из них после временной утраты тимоцитов регенерирует до размера, свойственного тимусу соответствующего возраста. Тимус очень чувствителен к действию различных факторов, вызывающих апоптоз клеток. Лимфоидные клетки тимуса погибают под влиянием ионизирующей радиации, введения стероидных гормонов и других повреждающих воздействий. Его инволюция происходит при стрессе и различных заболеваниях (например, при хронических инфекционных заболеваниях и развитии опухолей). Последствия этой, так называемой акцидентальной (т.е. случайной) инволюции тимуса полностью устраняются регенерацией за счет размножения внутритимусных резервных клеток-предшественников (при этом образуются в основном  $\gamma\delta$ Т-клетки), а затем — за счет размножения и развития клеток-предшественников, мигрирующих из костного мозга.

Важная особенность тимуса — его возрастная инволюция (рис. 3.63). Максимальный относительный вес тимуса выявляют в возрасте 1 года, а максимальный абсолютный вес — в возрасте, предшествующем и сопутствующем половому созреванию (12–14 лет). Затем происходит неуклонное снижение веса тимуса. Ежегодно в молодости теряется около 3%, в более пожилом возрасте — 1% активной ткани тимуса. Инволюция затрагивает в первую очередь корковый слой (с 13–15 лет).

Значительно уменьшается численность тимоцитов и секреторная активность эпителиальных клеток тимуса. Их способность размножаться в клеточной культуре утрачивается еще раньше — вскоре после рождения. В возрасте 23–25 лет инволюция затрагивает мозговой слой тимуса. При этом уменьшается число тимоцитов, эмигрирующих из тимуса в течение суток, и снижается концентрация гормонов тимуса. При сниженной функциональной активности эпителиальных клеток тимуса их жизнеспособность сохраняется долго, но затем происходит постепенная потеря эпителиаль-

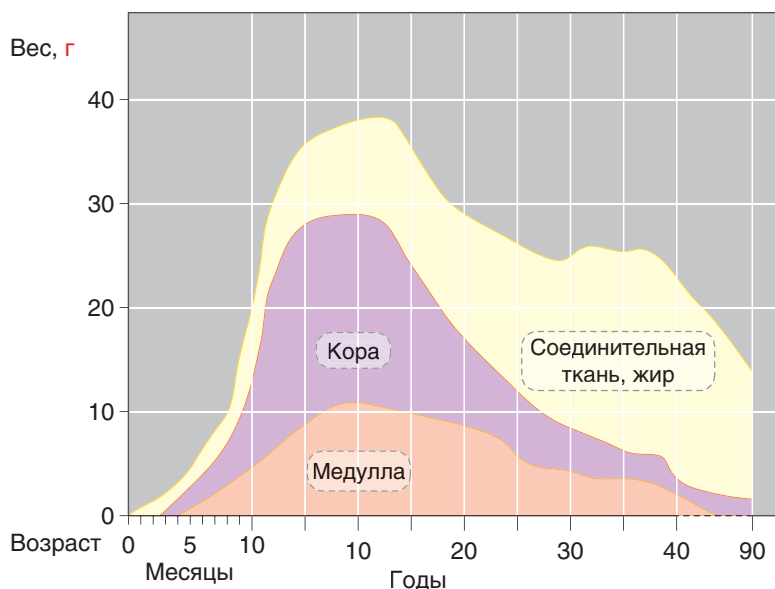


Рис. 3.63. Возрастная инволюция тимуса

ных клеток. Утрата лимфоидных и эпителиальных клеток восполняется развитием жировой ткани. У пожилых людей (в возрасте 70 лет и более) тимус заполнен жировой тканью с вкраплением островков со свойственной для нормального тимуса морфологией. Нарушается кортикомедуллярная структура органа, ослабляется функция кортикомедуллярного барьера, что приводит к миграции в кору тимуса нехарактерных для нее клеток, прежде всего В-лимфоцитов, образующих фолликулы. В местах массовой гибели клеток стромы тимуса формируются кисты.

Несмотря на выраженную атрофию, тимус полностью не утрачивает своих функций, что выражается в продолжающейся на очень низком уровне эмиграции клеток, содержащих эксцизионные кольца, и секреции гормонов тимуса. Расчеты, основанные на экстраполяции темпов инволюции, показывают, что полная утрата структур и функций тимуса теоретически должна произойти к возрасту 120 лет. Считают, что возрастная инволюция тимуса служит основой старения иммунной системы в целом.

#### 3.4.1.3. Бурса Фабриция. Аналоги бursы и тимуса

Вскоре после открытия роли тимуса в развитии Т-лимфоцитов у птиц был обнаружен орган, удаление которого приводило к нарушению развития тимуснезависимой части популяции лимфоцитов. Этот орган называли сумкой (бурсой) Фабриция, в связи с чем зависящие от нее лимфоциты были обозначены как бурсазависимые, или В-лимфоциты. Бурса расположена в области клоаки. Как и тимус, она представляет лимфоэпителиальный орган, содержит кору и мозговой слой. Бурса закладывается на 8-е сутки эмбрионального развития и затем в течение 6 сут заселяется клетками-предшественниками. Через 4 мес после рождения происходит атрофия бursы. Инволюция этого органа происходит также при введении тестостерона,

при этом полученные результаты аналогичны эффектам бурсэктомии. Есть данные, что В-клетки мигрируют из бursы в тимус (вероятно, для завершения развития). Таким образом, бурсу нельзя считать органом, аналогичным тимусу. По-видимому, bursa имеет определенные черты вторичного лимфоидного органа (так, в ней имеются лимфоидные фолликулы — морфологические структуры, характерные для периферической лимфоидной ткани).

Сразу после открытия роли бursы Фабриция в развитии В-клеток у птиц начали поиски аналогичного органа у млекопитающих. Ни у человека, ни у грызунов (объекты, наиболее изученные с иммунологической точки зрения) аналогов бursы обнаружено не было. В то же время доказано, что развитие В-клеток у них осуществляется в костном мозгу, а его завершающие этапы — во вторичных лимфоидных органах. В связи с этим необходимости в существовании особого органа для развития В-клеток у млекопитающих нет. В то же время у жвачных развитие В-лимфоцитов происходит в пейеровых бляшках (у овец и коров есть два типа пейеровых бляшек: одни являются первичными, а другие — вторичными лимфоидными органами). Оказалось, что зависимость развития В-клеток от лимфоэпителиальных органов (у птиц и жвачных млекопитающих) коррелирует с особенностями механизма реаранжировки V-генов иммуноглобулинов. Если перестройка происходит путем разрыва и воссоединения нитей ДНК и комбинирования V- и D/J-сегментов, этот процесс полностью осуществляется в костном мозгу. У птиц и жвачных основой перестройки V-генов является так называемая генная конверсия, суть которой состоит в обмене фрагментами ДНК между функциональными V-генами и псевдогенами. Вероятно, для запуска этого процесса требуются сигналы, генерируемые эпителиальными клетками кишечника (бursы, пейеровых бляшек) или их продуктами.

В сальнике млекопитающих обнаружены мелкие лимфоэпителиальные структуры, **криптопатчи** (т.е. скрытые пятнышки — бляшки), в которых, как полагали вначале, может осуществляться дифференцировка Т-клеток. Однако отсутствие сколько-нибудь значительной экспрессии генов *RAG* в клетках этих образований поставили под сомнение эту возможность. Тем не менее, с криптопатчами связывают некоторые этапы развития  $CD8\alpha\alpha^+ \gamma\delta$ Т-лимфоцитов, пополняющих популяцию Т-лимфоцитов тонкого кишечника. В криптопатчах обнаружены клетки фенотипа  $CD3^+CD4^+$ , экспрессирующие транскрипционный фактор *ROR\gamma*t и фенотипически идентичные LTIC — индукторным лимфоидным клеткам, ответственным за формирование микроокружения лимфоидных органов. Эти клетки экспрессируют *CCR6*. Их удаление приводит к нарушению развития лимфоидных фолликулов в пищеварительном тракте. На этом основании было сделано предположение, что данные клетки криптопатчей служат эквивалентом эмбриональных LTIC у взрослых и что они ответственны за формирование в мукозальной лимфоидной ткани фолликулов в условиях воспаления.

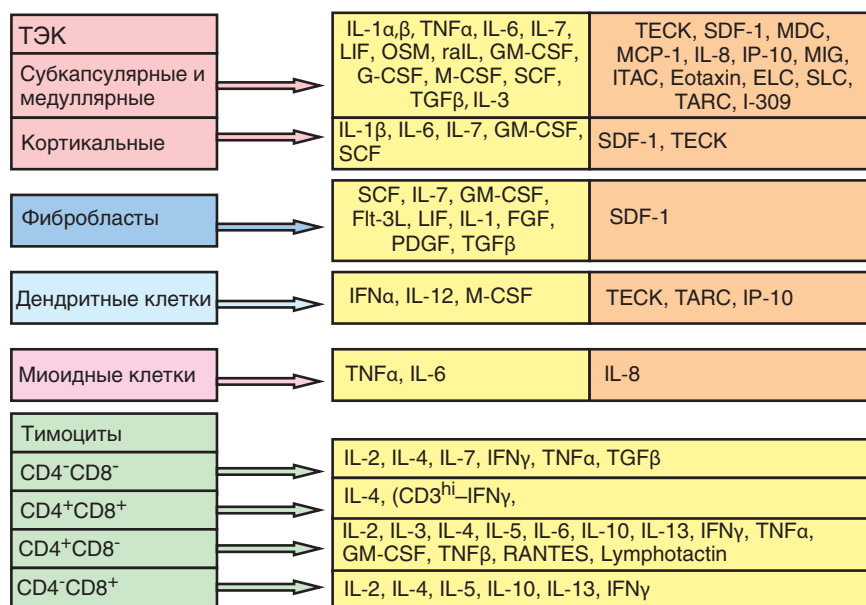
#### 3.4.1.4. Гуморальные факторы, контролирующие развитие лимфоцитов

Развитие лимфоцитов контролируют стромальные клетки первичных лимфоидных органов, посредством как прямых контактных взаимодействий, так и гуморально опосредованных влияний цитокинов и пептидных факторов, вырабатываемых этими клетками.

### Лимфопоэтические цитокины

Основные лимфопоэтины и их мишени в процессе развития лимфоцитов представлены на рис. 3.64.

**IL-7.** Главный лимфопоэтический фактор, а также гомеостатический фактор Т-клеток. Молекулярная масса — 17 кДа, гликозилированной формы — 25 кДа. Спонтанно IL-7 секретируют в малых количествах стромальные клетки костного мозга, эпителиальные клетки тимуса, кератиноциты. Его синтез слабо реагирует на факторы, стимулирующие выработку цитокинов; только  $IFN\gamma$  существенно усиливает его секрецию. Рецептор IL-7 содержит 2 субъединицы —  $\alpha$  и  $\gamma(c)$ , с которыми связаны тирозинкиназы Jak1 и Jak3, соответственно. В передаче сигнала участвуют факторы STAT5 и STAT1. Один из основных биологических эффектов IL-7 состоит в индукции антиапоптотического фактора Bcl-2, что обуславливает роль этого цитокина в качестве фактора выживаемости развивающихся и зрелых Т-лимфоцитов. IL-7 — незаменимый фактор выживаемости и роста незрелых Т- и В-лимфоцитов (редкое явление в системе цитокинов) — у человека при Т-лимфопозе, у мышей — как при Т-, так и при В-лимфопозе. При мутациях генов IL-7 и его рецептора развитие Т-лимфоцитов блокируется на стадии DN2. IL-7 участвует в запуске перестройки гена  $\gamma$ -цепи TCR. В качестве кофактора IL-7 может усиливать пролиферацию зрелых Т-клеток. IL-7 усиливает секрецию цитокинов Т-лимфоцитами (в наибольшей степени  $IFN\gamma$ ). IL-7 — основной гомеостатический фактор



**Рис. 3.64.** Цитокины тимуса и продуцирующие их клетки. Желтым цветом обозначены цитокины, светло-коричневым — хемокины. ТЭК — тимусные эпителиальные клетки

для наивных Т-лимфоцитов и вспомогательный для Т-клеток памяти и NK-клеток.

**IL-15.** Белок массой 14 кДа с двумя дисульфидными связями, близкий по структуре к IL-12. IL-15 секретируют эпителиальные клетки, моноциты/макрофаги, клетки стромы костного мозга и лимфоидных органов. Может существовать в мембранной форме. Из трех полипептидных цепей рецептора IL-15 две —  $\beta$  и  $\gamma(c)$  — общие с рецептором IL-2 и только третья —  $\alpha$ -цепь — индивидуальная. Рецептор IL-15 экспрессируют активированные Т-, NK-лимфоциты, моноциты, эндотелиальные клетки. По биологическим свойствам IL-15 сходен с IL-2: индуцирует пролиферацию активированных Т- и В-лимфоцитов, NK-клеток, развитие цитотоксических Т-лимфоцитов. Служит гомеостатическим фактором для NK-клеток и  $CD8^+$  Т-клеток памяти. Эти клетки распознают IL-15 в комплексе с его рецептором на стромальных клетках в лимфоидных органах. В отсутствие IL-15 снижается содержание NKT-клеток, внутриэпителиальных Т-лимфоцитов,  $\gamma\delta$ Т-клеток и особенно их  $CD8\alpha\alpha^+$  формы. Показана также роль IL-15 в развитии дендритных клеток и поддержании жизнеспособности эпителиальных клеток.

**BAFF и APRIL.** Представители семейства фактора некроза опухоли. Существуют в мембраносвязанной и растворимой формах. Известно несколько их изоформ, формирующихся в результате альтернативного сплайсинга. Эти факторы отвечают за развитие и поддержание жизнеспособности В-лимфоцитов, а также за активацию В- и Т-клеток. Антиапоптотическое действие BAFF и APRIL реализуется через индукцию фактора Bcl-2. Известно 3 рецептора этих факторов: BAFF-R (связывает в большей степени BAFF, обеспечивает созревание и поддерживает жизнеспособность В-клеток), BCMA (связывает преимущественно APRIL, нужен для выживания плазматических клеток в костном мозге) и TACI (связывает в равной степени оба фактора, сигналы, поступающие через этот рецептор, обеспечивают развитие Т-независимого ответа В-клеток, подавляют активацию В-клеток). Усиленная выработка факторов BAFF и APRIL благоприятствует развитию системных аутоиммунных заболеваний и В-клеточных лимфо-пролиферативных процессов. Дефицит BAFF и APRIL и дефекты экспрессии их рецепторов служат основой переменного иммунодефицита.

#### *Пептидные факторы тимуса*

Большую группу гуморальных продуктов тимусного эпителия образуют пептиды из группы нейромедиаторов. Эпителиальные клетки, происходящие из нервного гребня (их маркером служит ганглиозид GQ), секретируют соматостатин, окситоцин, вазопрессин,  $\beta$ -эндорфин, метэнкефалин и другие пептидные факторы (основное место синтеза большинства из них — гипоталамус и гипофиз). Некоторые из этих факторов секретируются также макрофагами и тимоцитами.

Особую группу пептидов тимуса формируют так называемые гормоны тимуса (табл. 3.18). В эту группу входят пептиды и белки, продуцируемые исключительно или преимущественно в тимусе. К ним относят тимозины, тимулин, тимопоэтины и тимусный гуморальный фактор.

Таблица 3.18. Характеристика гормонов тимуса

Пептид	Аминокислотная последовательность	Число остатков	Молекулярная масса, Да	pI	Содержание в сыворотке крови	Эффект тимэктомии
Тимулин (Zn <sup>2+</sup> — FTS)	AcEAKSQGGSD	9	847	7,5	0,5–4,0 пг/мл	Исчезновение фактора
$\alpha_1$ -Тимозин	AcSDAAVDTSSSEITTKDLKEKKEVVEEAEN	28	3108	4,2	0,5–2,5 нг/мл	Отсутствие эффекта или снижение содержания
Тимопоэтин II	AcSEFLEDPSLVTKEKLKSELVANVTLPAGEGRKD VYVELYLQHLLTAVKR	49	5562	5,5	Нет данных	То же

Тимулин — нонапептид, для которого не установлена молекула-предшественник и, соответственно, структурный ген. Тимулин проявляет активность только при образовании комплекса с ионами Zn<sup>2+</sup>. Структура тимулина консервативна — последовательность аминокислотных остатков в его молекуле идентична у разных млекопитающих. Тимулин выявили в сыворотке раньше других тимусных гормонов. Его первое название — тимусный гуморальный фактор. В циркуляции тимулин связан с белком-носителем массой 40–50 кДа. В сыворотке может присутствовать также белок-ингибитор тимулина. До сих пор не обнаружено иных источников тимулина, кроме тимуса. При тимэктомии он исчезает из циркуляции.

Тимозины — группа полипептидных факторов, обнаруженная в 1967 г. А. Голдштейном (*A. Goldstein*) в экстрактах тимуса.  $\alpha_1$ -Тимозин — N-концевой фрагмент внутриклеточного белка протимозина  $\alpha$ . Молекула протимозина  $\alpha$  содержит 113 остатков. Его N-концевая половина более консервативна, чем C-концевая. Именно из N-конца с участием протеаз выщепляются молекулы  $\alpha_1$ -тимозина (28 остатков). Протимозин  $\alpha$  широко распространен и участвует в ремоделировании хроматина и регуляции митоза. Процессинг этой молекулы, обусловленный активностью лизосомальной аспарагинил-эндонуклеазы и приводящий к образованию  $\alpha_1$ -тимозина, по-видимому, в большей степени реализуется в тимусе, чем вне его. Образование  $\alpha_1$ -тимозина выявлено также в нервной системе. Сам протимозин  $\alpha$  индуцирует образование  $\alpha_1$ -тимозина моноцитами.

Тимопоэтины выделены из экстракта тимуса и первоначально были охарактеризованы по влиянию на нервно-мышечную проводимость (свойственна в большей степени тимопоэтину I) и дифференцировку Т-клеток (сильнее проявляется у тимопоэтина II). Эти молекулы отличаются тремя остатками (1, 2, 43). Еще в 70-е годы была установлена структура активного пентапептида 32–36, воспроизводящего влияние целых молекул на Т-лимфоциты). Этот пептид был назван тимопентином. Вскоре его обнаружили в экстрактах тимуса. В настоящее время с исследовательской и лечебной целями используют исключительно синтетический тимопентин, а не целые молекулы тимопоэтинов.

К активным пептидам тимуса можно отнести также тимусный гуморальный фактор, представляющий собой комплекс пептидов тимуса. Этот фактор широко известен, в основном, как препарат, используемый при лечении опухолей и гепатита В. Сведения о его наличии в циркуляции отсутствуют. Активная фракция этого препарата — тимусный гуморальный фактор  $\gamma 2$  — выделен, охарактеризован и синтезирован. Его состав — Ac-Leu-Glu-Asp-Gly-Pro-Lys-Phe-Leu- $C_{12}Cl$ .

Гормоны тимуса вырабатываются и секретируются субкапсулярными и медуллярными эпителиальными клетками тимуса, причем тимулин,  $\alpha_1$ -тимозин и тимопоэтин вырабатываются одними и теми же клетками — секреторными клетками тимусного эпителия, экспрессирующими ганглиозид GQ и вырабатывающими нейропептиды и некоторые цитокины. В длительных клеточных культурах эпителиальных клеток тимуса к 12 сут доля клеток, содержащих гормоны, достигает 70–80%. Синтезируемые гормоны секретируются и их выявляют в культуральной жидкости. Основной путь секреции тимулина —  $Ca^{2+}$ -зависимый экзоцитоз, стимулируемый  $Zn^{2+}$ . Синтезированные в тимусе пептидные гормоны поступают в кровоток и содержатся в сыворотке крови в нанограммовых концентрациях, сопоставимых с концентрацией других гормонов.

Тимулин, тимопоэтин и  $\alpha_1$ -тимозин *in vitro* проявляют сходную и достаточно разнообразную активность. Наиболее широко известна их способность индуцировать экспрессию маркеров зрелых Т-лимфоцитов на поверхности предшественников Т-клеток. Однако эти факторы не способны индуцировать дифференцировку Т-лимфоцитов. Основные клетки-мишени перечисленных факторов расположены вне тимуса — это Т-лимфоциты, недавно мигрировавшие из тимуса и не приобретшие полностью свойства периферических наивных Т-клеток (в частности, способность интенсивно продуцировать IL-2 при активации). Действительно, тимулин и другие гормоны тимуса усиливают выработку IL-2 активированными Т-клетками, особенно при ее исходном понижении. Они усиливают также экспрессию рецепторов для IL-2. Спектр эффектов этих гормонов достаточно широк, но не четок. Он не ограничивается действием на Т-лимфоциты и опосредуемые ими процессы. Тимулин, тимопоэтин и  $\alpha_1$ -тимозин усиливают активность естественных киллеров, стимулируют эффекты, опосредуемые макрофагами и В-клетками (как правило, при участии Т-лимфоцитов). В последнее время все большее внимание привлекает способность  $\alpha_1$ -тимозина влиять на дендритные клетки. В общем виде действие гормонов тимуса можно охарактеризовать как способность корректировать индуцированные иммунодефицитные состояния (в частности, возрастные иммунодефициты) и регулировать иммунные процессы, особенно при иммунопатологии.

Уровень тимулина в крови человека достигает максимума к 5–10 годам, затем до 36 лет снижается, после чего стабилизируется на очень низком уровне до 80 лет. Снижение концентрации гормонов тимуса (в частности, при старении) обуславливает ослабление активности Т-клеток, в частности способности секретировать IL-2 при стимуляции. Введение синтетических гормонов тимуса или их аналогов устраняет названные дефекты. Гормоны тимуса влияют на выработку других гормонов и, в свою очередь, испытывают влияние с их стороны. Через гормоны тимуса осуществляется связь

этого органа и гипоталамо—гипофизарно—гонадной системы. Тем не менее конкретные функции и молекулы-мишени гормонов тимуса в организме выяснены не до конца. Вероятно, они реализуются преимущественно в периферическом отделе иммунной системы. Некоторые пептидные факторы тимуса (TGf $\gamma$ 2, дипептид тимоген и др.) используются в лечении иммунодефицитных состояний. Ценность этих факторов в качестве лекарственных препаратов, возможно, возрастет после установления молекулярных основ их действия.

#### 3.4.1.5. Апоптоз, его роль в развитии и функционировании клеток иммунной системы

Апоптоз играет важную роль при становлении и функционировании иммунной системы. Эта форма гибели клеток сопровождает развитие клеток иммунной системы, особенно лимфоцитов, на этапе их селекции. С помощью механизма апоптоза происходит гибель клеток-мишеней киллерных лимфоцитов. При дальнейшем изложении материала апоптоз будет неоднократно упоминаться в связи с самыми разнообразными иммунологическими процессами. Именно потому, что апоптоз широко распространен при развитии лимфоцитов в центральных лимфоидных органах, этот процесс рассматривается в настоящем разделе.

Выделяют 2 основных варианта гибели клеток — некроз и апоптоз (табл. 3.19). Гибель, вызванная прямым повреждением или разрушением клеточной мембраны, называют некрозом. Другой вариант гибели клеток — апоптоз (от греч. *αποπτωσις* — опадание листьев) или запрограммированная гибель — реализуется в ответ на действие физиологических сигналов или в процессе срабатывания генетической программы клетки и служит необходимым условием существования многоклеточных организмов. Понятие «апоптоз» ввели в 1972 г. Дж. Керр (*J.F. Kerr*) и соавт. в связи с описанием формы гибели лимфоцитов при действии глюкокортикоидов.

**Таблица 3.19.** Сравнительная характеристика апоптоза и некроза клеток

Показатель	Апоптоз	Некроз
Пусковой фактор	Повышение проницаемости мембран митохондрий или сигнал, воспринимаемый мембранными рецепторами	Неадекватные условия среды, токсические агенты
Скорость развития	1–4 ч	< 1 ч
Причины гибели клетки	Нарушение функционирования энергетической системы клетки, деградация ДНК	Нарушение целостности мембраны, осмотические процессы
Изменение размера клетки	Уменьшение (сморщивание)	Увеличение (набухание)
Изменения ядра	Конденсация хроматина, пикноз, фрагментация	Набухание

Окончание табл. 3.19

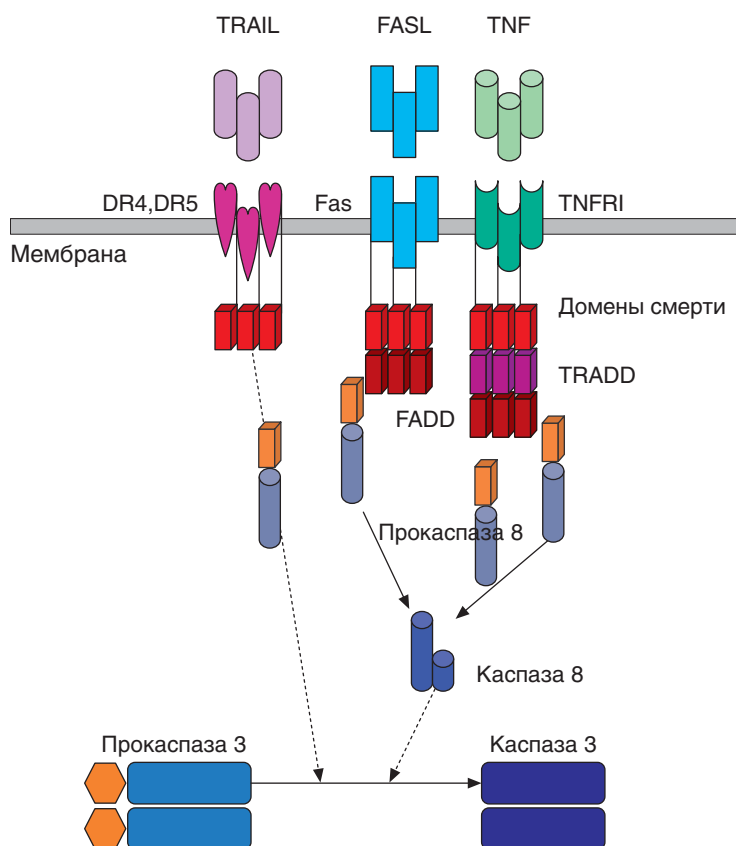
Показатель	Апоптоз	Некроз
Изменения в цитоплазме	Конденсация цитоплазмы, уплотнение гранул	Лизис гранул
Изменения клеточной мембраны	Потеря микроворсинок, образование вздутий, уплотнение	Нарушение целостности
Состояние ДНК	Упорядоченная (межнуклеосомная) деградация	Неупорядоченная деградация
Энергозависимость	Зависит	Не зависит
Зависимость от синтеза макромолекул	Часто зависит	Не зависит
Примеры проявления	Гибель клеток при метаморфозе, отрицательной селекции лимфоцитов, гормонозависимой атрофии, интерфазной радиационной гибели лимфоцитов, гибели клеток-мишеней киллерных клеток	Гибель клеток от гипоксии, действия токсинов, вирусном цитолизе, комплементзависимом цитолизе

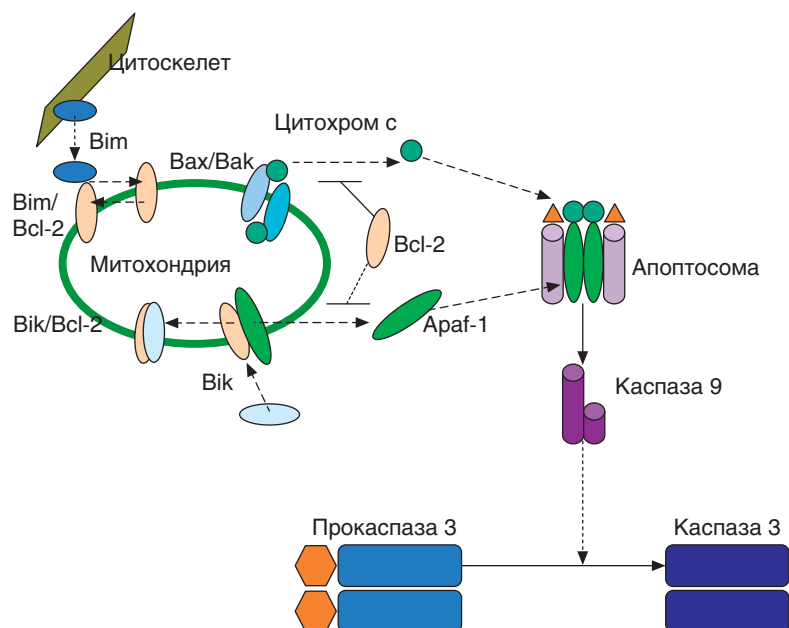
Некроз происходит при нарушении целостности клеточной мембраны и проявляется набуханием клетки, лизисом гранул и ядра, неупорядоченной деградацией ДНК. Проявлениями апоптоза служат, наоборот, сморщивание клетки, уменьшение ее размеров, уплотнение наружной и внутриклеточных мембран (при сохранении их целостности) с деполяризацией, утратой микроворсинок и формированием вздутий, а также уменьшение размеров, уплотнение и фрагментация ядра. При этом происходят разрывы ДНК между нуклеосомами, в результате чего образуются фрагменты протяженностью, кратной 180–190 пар оснований (размер нуклеосомы). От клетки, подвергшейся апоптозу, отшнуровываются «апоптотические тельца» — фрагменты ядра, окруженные мембраной. Уже в процессе апоптоза гибнущие клетки подвергаются фагоцитозу. В результате продукты распада клеток не поступают в межклеточное пространство и не вызывают воспалительной реакции, которая обычно сопутствует некрозу клеток. Апоптоз развивается более медленно (1 ч и более), чем некроз (практически сразу после действия повреждающих факторов).

Механизмы апоптоза детально изучены на клетках нематоды *Caenorhabditis elegans*, у которой было идентифицировано 14 генов, контролирующих 4 фазы развития апоптоза. Обнаруженные у млекопитающих гомологи некоторых из этих генов также участвуют в развитии апоптоза. Выделяют 3 фазы развития апоптоза — включение пусковых механизмов, активацию каспаз и реализацию гибели. Апоптоз может быть запущен по двум механизмам — рецепторному и митохондриальному (табл. 3.20; рис. 3.65, 3.66).

**Таблица 3.20.** Факторы митохондриального и рецепторного путей развития апоптоза

Показатели	Митохондриальный апоптоз	Рецепторный апоптоз
Условия развития	Повышение проницаемости мембран митохондрий	Внешние сигналы
Пусковые факторы	BH3 (Bad, Bid, Bik, Bim, Noxa, Puma, Bbc3), Bax, Bak, Bcl-X <sub>s</sub>	Взаимодействие: FasL–Fas, TNF–TNFRI, DR3–TL1A, DR4–TRAIL, DR5–TRAIL, DR6–TL1A
Факторы передачи сигнала	Апоптосома: цитохром c, Apaf-1, pCas9	DISC: FADD, TRADD, pCas8
Инициаторные каспазы	Каспаза 9	Каспаза 8

**Рис. 3.65.** Рецепторный механизм запуска апоптоза



**Рис. 3.66.** Митохондриальный механизм запуска апоптоза

Рецепторный механизм запуска апоптоза реализуется с участием мембранных рецепторных молекул, цитоплазматическая часть которых представлена доменом смерти (*death domain*), содержащим около 80 остатков. Эти молекулы относят к семейству рецепторов  $\text{TNF}\alpha$ . Известно 6 таких рецепторов: Fas-рецептор (APO-1, CD95, DR2),  $\text{TNF-R1}$  (p55, CD120a, DR1), DR3, DR4, DR5, DR6. Их лиганды — Fas-лиганд (FasL, CD178 — для Fas-рецептора), цитокин  $\text{TNF}\alpha$  (для  $\text{TNFR1}$ ), TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand* — для DR4 и DR5), TL1A (для DR3 и DR6) (табл. 3.20). Все лиганды организованы в виде тримеров. Их взаимодействие с рецепторами приводит к тримеризации последних, что запускает сигнальный каскад. При этом домены смерти приобретают способность взаимодействовать с аналогичными доменами адапторных белков FADD (*Fas-associated death domain*) и TRADD (*TNF-receptor death domain*). FADD распознает домены смерти в составе прокаспазы 8 и, взаимодействуя с ними, вызывает активацию каспазы 8 (см. далее). Результат действия TRADD аналогичен, но он реализуется посредством FADD. Формирующиеся в результате указанных взаимодействий молекулярные комплексы называют DISC (*Death-inducing signaling complex*).

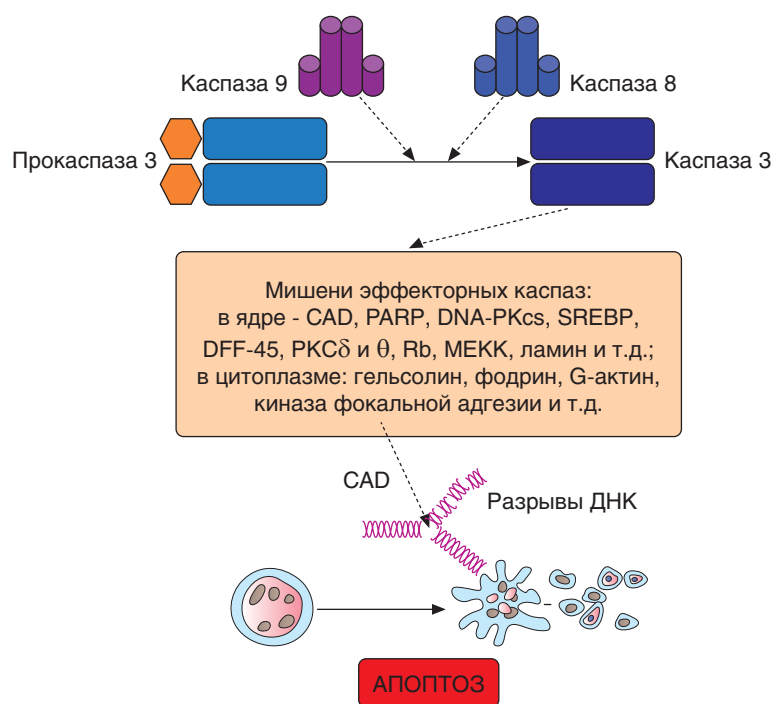
Митохондриальный механизм запуска апоптоза реализуется при повреждении функций митохондрий, приводящем к нарушению проницаемости их мембраны. Решающую роль в этом пути запуска апоптоза играют белки семейства Bcl-2. Их разделяют на проапоптотические (Bid, Bax, Bak, Bcl- $X_s$  и др.) и антиапоптотические (Bcl-2, Bcl- $X_L$ , Mcl-1 и др.). Запуск сигналов к апоптозу связан с проапоптотическими белками, содержащими 1 домен BH (*Bcl-2 homology*) — BH3. Белки этой группы блокируют анти-

апоптотические факторы типа Bcl-2, образуя с ними димеры. Кроме того, в результате олигомеризации Bax и Bak они формируют трансмембранные поры. В норме олигомеризация этих факторов подавляется антиапоптотическими факторами. Через поры в мембране митохондрий в цитозоль выходят цитохром *c* и фактор Araf-1 (*Apoptose protease activation factor 1*). Araf-1 и цитохром *c* в присутствии АТФ образуют комплекс с неактивной каспазой — прокаспазой 9. Этот комплекс называют апоптосомой. В ней происходит активация каспазы 9.

Рецепторный механизм апоптоза может быть прерван активацией ингибиторов каспазы 8. Митохондриальный механизм блокируется антиапоптотическими факторами Bcl-2 и Bcl-X<sub>L</sub>, связывающими проапоптотические факторы. Пути запуска апоптоза не являются изолированными. Так, рецепторный механизм приводит к активации митохондриального фактора Bid, что обуславливает подключение митохондриального механизма апоптоза.

Необходимо упомянуть также о механизме контроля за балансом пролиферации и апоптоза, осуществляемого метаболитами сфингомиелина. Из них роль проапоптотического фактора играет церамид, действующий через механизмы митохондриального (через фактор Bax) и рецепторного (через Fas-рецептор) путей.

Оба пути запуска апоптоза приводят к активации каспаз (рис. 3.67). Каспазы — группа цистеиновых протеаз, расщепляющих полипептидную



**Рис. 3.67.** Эффекторная фаза апоптоза. Среди мишеней эффекторных каспаз особо выделяют каспазозависимую ДНКазу (CAD), ответственную за межнуклеосомную деградацию ДНК (проиллюстрирована в нижней части рисунка)

связь после остатков аспарагиновой кислоты. Как уже отмечалось, рецепторный путь приводит к активации каспазы 8, митохондриальный — к активации каспазы 9. Эти ферменты относят к группе инициаторных каспаз. Их активация — результат агрегации вследствие взаимодействия с адапторными белками (FADD, Apaf-1). При агрегации происходит аутокаталитическое отщепление длинного N-концевого участка каспазы с последующим формированием активного гетеродимера. После активации инициаторных каспаз процесс апоптоза становится необратимым.

Инициаторные каспазы вызывают частичный протеолиз (отщепление короткого продомена) и вследствие этого активацию исполнительных, или эффекторных каспаз — каспазы 3, реже — каспазы 6 и каспазы 7. Известно до 280 молекул-мишеней исполнительных каспаз, локализованных преимущественно в ядре. Расщепление молекул-мишеней определяет все проявления апоптоза. Действие каспаз на фактор ретинобластомы (Rb) и  $\delta$ -изоформу протеинкиназы C обуславливает нарушение контроля клеточного цикла. Расщепление киназ MEKK-1 и FAK приводит к изменениям, вызывающим ослабление адгезионной способности клетки, а расщепление гельсолина и киназы PAK определяет характерные изменения клеточной морфологии. Расщепление той же каспазой ядерных ферментов PARP (*Poly-ADP-ribose polymerase* — поли-АДФ-рибоза полимеразы), а также ДНК-зависимой протеинкиназы нарушает процесс репарации ДНК. Одна из главных мишеней каспазы 3 — нейтральная эндонуклеаза CAD (*Caspase-activated DNase*), ответственная за межнуклеосомную фрагментацию ДНК в апоптотических клетках. Показана причинная связь гибели клетки с фрагментацией ДНК: введение в клетку гена, кодирующего активную форму CAD, вызывают ее гибель. Среди других причин апоптотической гибели клетки называют истощение ее энергетических ресурсов вследствие нарушения функций митохондрий и неконтролируемых расходов энергии на репарацию ДНК.

Фагоцитозу апоптотических клеток способствует экспрессия на их поверхности молекул, служащих для фагоцитов источником сигналов типа «съешь меня». Так, при апоптозе нарушается асимметрия мембраны, и фосфатидилсерин, в норме локализующийся на внутренней поверхности мембраны, оказывается экспонированным снаружи (выявление его экспрессии по связыванию с меченным аннексином V используют для идентификации апоптотических клеток). Появляющиеся на поверхности фосфатидилсерин, а также тромбоспондин и десиалированные остатки мембранных гликоконъюгатов распознаются рецепторами фагоцитов (как профессиональных, так и факультативных), что обеспечивает быстрый фагоцитоз апоптотических клеток. Такое завершение апоптоза чрезвычайно важно для организма, поскольку предотвращает поступление внутриклеточных компонентов, включая ДНК, в межклеточное пространство и последующее развитие воспаления и аутоиммунных процессов. В то же время чрезмерно интенсивное поглощение фрагментов ДНК может активировать (через внутриклеточные TLR) патологические процессы, ведущие к развитию системной аутоиммунной патологии, например, системной красной волчанки (СКВ).

Апоптозу принадлежит важная роль не только в селекции лимфоцитов, но и в других процессах, связанных с развитием лимфоцитов, морфогенезом лимфоидных органов, а также проявлением активности клеток иммунной системы, прежде всего в контактном цитолизе (табл. 3.21).

**Таблица 3.21.** Участие апоптоза в формировании иммунной системы и реализации иммунологических процессов

Этапы развития и функционирования клеток иммунной системы	События	Проявления апоптоза (в скобках — механизмы)
Формирование популяций лимфоцитов	Ранние этапы формирования популяций	Гибель избыточных клеток (вследствие дефицита факторов выживания)
	Формирование антигенраспознающих рецепторов	Выборка клеток с дефектами реаранжировки рецепторных генов (отсутствие сигналов от стромальных клеток)
	Селекция клонов	Гибель клеток, не распознающих аутологичные комплексы МНС—пептид (апоптоз «по умолчанию»), при положительной селекции и гибель аутоспецифических клеток (активационный апоптоз) при отрицательной селекции
	Дифференцировка субпопуляций	Апоптоз Т-клеток при несоответствии специфичности рецептора и корецептора
Зрелые покоящиеся клетки	Гомеостатический контроль численности зрелых клеток	Гибель избыточных клеток (дефицит гомеостатических факторов выживания)
	Элиминация старых клеток	Апоптоз старых клеток (вероятно включение эндогенной программы апоптоза)
Иммунный ответ	Активация и пролиферация лимфоцитов	Активационный апоптоз (передача сигнала через мембранные рецепторы)
	Созревание аффинности антител	Гибель низкоаффинных клонов В-клеток (конкуренция за антиген и помощь Т-хелперов)
	Элиминация эффекторных клеток	Апоптоз отработавших клеток (вероятно включение эндогенной программы апоптоза)
	Реализация цитотоксического эффекта лимфоцитов	Гибель клеток-мишеней цитотоксических лимфоцитов (передача апоптотического сигнала по перфорин/гранзимному и рецепторному механизмам)

### 3.4.2. Вторичные (периферические) лимфоидные органы

Зрелые лимфоциты поступают в периферический отдел иммунной системы, где они выполняют свои функции, участвуя в развитии иммунного ответа. Однако в иммунный ответ вовлекаются только клоны лимфоцитов, распознавшие специфический антиген. Подавляющее большинство клонов непосредственно не участвует в иммунном ответе на конкретный антиген. Они находятся как бы в резерве на случай поступления соответствующего антигена. В норме большинство лимфоцитов находится в покое состоянии. Среди этих клеток преобладают наивные, т.е. ранее не контактировавшие с антигеном, но содержатся также клетки памяти, сформировавшиеся в ходе предшествующих иммунных ответов (см. раздел 3.5.3). Все эти клетки находятся в непрерывном движении, благодаря чему вторичные лимфоидные органы, лимфоидные ткани, пути миграции зрелых лимфоцитов образуют единую систему, контролируемую общими механизмами. Лимфоциты имеют ограниченный срок жизни и поддержание постоянной численности популяции лимфоцитов строго регулируется (гомеостатическая регуляция).

Периферический отдел иммунной системы включает специализированные лимфоидные органы (см. табл. 3.11 и рис. 1.3). К ним относят лимфатические узлы, контролирующие определенные области организма, от которых к ним поступает лимфа; селезенку, под контролем которой находятся гематогенные пути распределения чужеродных агентов; лимфоидные структуры барьерных тканей — слизистых оболочек и кожи, через которые в организм проникает основная масса патогенов. Распределение основных разновидностей лимфоцитов в этих органах отражено в табл. 3.22. Пути коммуникации в периферическом отделе иммунной системы служат кровь и лимфа.

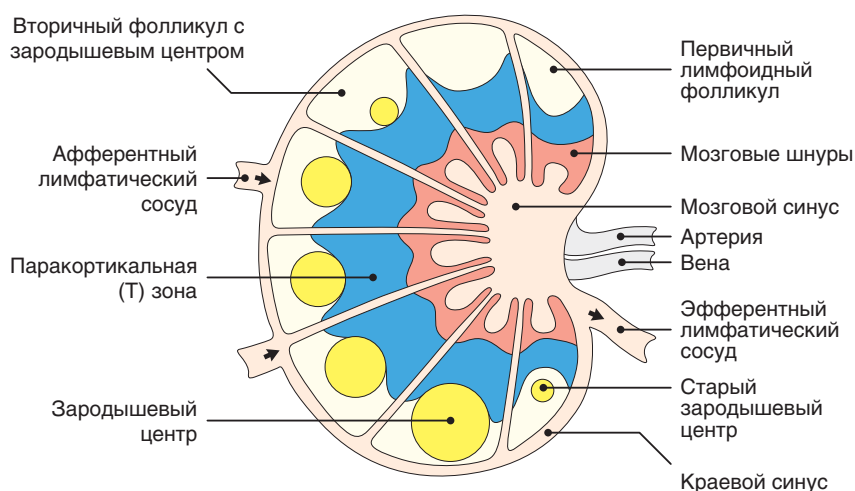
**Таблица 3.22.** Содержание лимфоцитов в органах иммунной системы

Орган, ткань	Содержание лимфоцитов в органе, %	Процент от общего числа лимфоцитов организма	Содержание В-клеток, %	Содержание Т-клеток, %	Содержание CD4 <sup>+</sup> Т-клеток, %	Содержание CD8 <sup>+</sup> Т-клеток, %	Содержание делящихся лимфоцитов, %
Костный мозг	10–15	8–10	10–12	2–5	2–3	2–3	25–30
Тимус	95–98	10–20	1–3	90–95	8–10	4–5	20–25
Селезенка	80–85	20–25	40–50	25–35	20–25	10–12	5–7
Лимфатические узлы	90–95	15–20	35–40	55–65	30–40	15–20	2–4
Миндалины	85–90	20–25	40–55	25–35	Нет данных	Нет данных	5–10
Пейеровы бляшки	90–95	15–20	30–40	25–30	Нет данных	Нет данных	5–8
Кровь	20–35	0,5	12–18	60–70	35–50	20–25	<5

### 3.4.2.1. Лимфатические узлы

Лимфатические узлы — бобовидные образования величиной 0,2–1,0 см, образующие группы или цепочки. Они дренируют лимфу от различных регионов тела. У мышей выделяют следующие лимфатические узлы: нижнечелюстные, шейные, подмышечные, брыжеечные, поясничные, крестцовые, подвздошные, паховые, подколенные. В эмбриогенезе они формируются не одновременно. У мышей ранее других (на 9–10-е сутки эмбрионального развития) закладываются брыжеечные, крестцовые и шейные лимфатические узлы, а позже всех (на 15–17-е сутки) — подвздошные и подколенные узлы. Остальные лимфатические узлы формируются между 10 и 15-ми сутками.

Структура лимфатических узлов схематически изображена на рис. 3.68. Со стороны выпуклой части лимфоузла через трабекулы в орган входят лимфатические сосуды, приносящие лимфу из дренируемых участков тела. В своей вогнутой части узел имеет ворота, через которые входят афферентные артерии и выходят эфферентные лимфатические сосуды и вены. Лимфатический узел окружен соединительнотканной капсулой, от которой внутрь отходят тонкие перегородки — трабекулы. Ткань лимфатического узла состоит из коры и мозгового вещества. В наружной части коры есть округлые образования — лимфоидные фолликулы, служащие местом сосредоточения В-лимфоцитов. В покое лимфоузлах они имеют равномерную структуру, и их обозначают как первичные фолликулы. При иммунном ответе в фолликул, помимо В-лимфоцитов, мигрируют Т-клетки, в нем формируются центры размножения — зародышевые центры. Такой фолликул называют вторичным. Ключевую роль в формировании и функционировании фолликулов и развивающихся в них зародышевых центров играют фолликулярные дендритные клетки, по происхождению не имеющие отношения к обычным дендритным клеткам и сходные



**Рис. 3.68.** Строение лимфатического узла и локализация в нем Т- и В-лимфоцитов (по Janeway C.A. et al., 2005)

с ними только по морфологии. Эти клетки имеют местное мезенхимальное происхождение.

Формирование Т- и В-зон лимфатических узлов, как и других вторичных лимфоидных органов, а также мозгового слоя тимуса определяется взаимодействием лимфоидных клеток и предшественников стромальных клеток, осуществляемое в эмбриогенезе. Ключевая роль в нем принадлежит мембранным лимфотоксинам (LT) — цитокинам семейства TNF — и их рецепторам. Из костного мозга в зачаток лимфатических узлов и других лимфоидных органов мигрируют специальные лимфоидные клетки, обозначаемые как клетки-индукторы лимфоидной ткани — LTIC (*Lymphoid tissue inducing cells*). Их мембранный фенотип —  $CD4^+CD3^-CD45^+\alpha_4\beta_7^+IL-7R\alpha^+LT\alpha\beta^+CXCR5^+$ . LTIC экспрессируют дифференцировочный фактор ROR $\gamma$ t (*Retinoid-acid-receptor-related orphan receptor* — орфановый рецептор, родственник рецептору ретинойдной кислоты) и транскрипционный фактор Id2. Судя по мембранным молекулам, эти клетки имеют костномозговое лимфоидное происхождение, но не относятся к зрелым субпопуляциям лимфоцитов. LTIC содержат на своей поверхности мембранную форму LT $\alpha\beta$  — тример, включающий 2 трансмембранные молекулы LT $\beta$  и 1 молекулу LT $\alpha$ , расположенную внеклеточно. Другая сигнальная молекула LTIC, также относящаяся к семейству TNF, — RANKL (*Receptor activator of NF $\kappa$ B-ligand*). В образовании лимфоидных органов участвуют также клетки-инициаторы лимфоидной ткани — LTIN, которые имеют фенотип  $CD4^-CD3^-IL-7R\alpha^-CD11b^+CD11c^+$ , свидетельствующий об их родстве с дендритными клетками. С этими двумя типами клеток взаимодействуют предшественники стромальных клеток — клетки-организаторы лимфоидной ткани — Lto.

LT $\beta$  и RANKL распознаются рецепторами семейства TNFR на стромальных клетках, в результате чего в них генерируется сигнал, вызывающий экспрессию генов IL-7, хемокинов (CXCL13, CCL19, CCL21) и фактора TRANCE (*TNF-related activation-induced cytokine*). Все эти факторы действуют на лимфоидные клетки; кроме того, они привлекают зрелые лимфоциты, обеспечивают их жизнеспособность и способствуют их кластеризации с образованием зачатка фолликула. Затем мигрирующие в зачаток В-, Т- и NK-лимфоциты разделяются пространственно. К этому моменту в формирующемся органе появляются дендритные клетки, играющие роль организующего начала при формировании первичных лимфоидных фолликулов.

Реализация этих процессов в лимфатических узлах и пейеровых бляшках отличается деталями, тогда как формирование единичных фолликулов и фолликулярных структур слизистой оболочки носоглотки происходит по иным, в недостаточной степени изученным законам. Принципиальное различие между этими группами лимфоидных структур состоит в том, что вторичные лимфоидные органы в основном формируются в эмбриогенезе, тогда как лимфоидные образования слизистых оболочек могут появляться в постнатальном периоде, в частности, под влиянием микрофлоры.

У взрослых организмов способность фолликулярных дендритных клеток к выработке хемокинов и факторов выживания поддерживается благодаря контактам с В-лимфоцитами, стимулирующими эту способность у дендритных клеток. Таким образом, В-лимфоциты в определенной степени сами

формируют свое микроокружение. У мышей, дефектных по генам лимфотоксинов или их рецепторов, не развиваются фолликулярные дендритные клетки и не формируются лимфоидные фолликулы, а при определенной комбинации дефектов не образуются лимфатические узлы.

Т-клетки в лимфатических узлах располагаются в паракортикальных зонах, находящихся в глубоких слоях коры. Они окружают посткапиллярные вены, через которые в ткань лимфатического узла из кровотока мигрируют лимфоциты. В отсутствие тимуса (при генетических дефектах или после тимэктомии сразу после рождения) эти зоны не формируются. Паракортикальные зоны служат нишами для наивных Т-лимфоцитов: стромальные клетки обладают способностью привлекать их, секретируя хемокины CCL19 (ELC) и CCL21 (SLC), к которым Т-клетки имеют рецептор (CCR7). Жизнеспособность мигрировавших Т-лимфоцитов поддерживается IL-7 — одним из главных факторов выживаемости наивных Т-клеток. Помимо соединительнотканых клеток, в формировании ниши для Т-лимфоцитов участвуют дендритные клетки (истинные, происходящие из костного мозга). Поскольку эти дендритные клетки обычно охватывают своими отростками Т-лимфоциты, их называют интердигитальными (межпальцевыми) клетками. Интердигитальные клетки также продуцируют CCL19 и CCL21. TCR распознают на поверхности интердигитальных дендритных клеток молекулы МНС, несущие аутологичные пептиды. Это также повышает выживаемость наивных Т-лимфоцитов (см. ниже). При распознавании в составе этих молекулярных комплексов чужеродных пептидов, Т-клетки активируются.

Пространство между фолликулами и вне паракортикальных зон занято смешанной популяцией лимфоцитов, включающей как Т-, так и В-лимфоциты. Здесь эти клетки контактируют между собой, что важно для развития иммунного ответа. Лимфоциты пребывают в лимфатических узлах временно. Они постоянно рециркулируют. Соотношение CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, а также других субпопуляций Т-лимфоцитов в лимфатических узлах примерно соответствует таковому в крови (см. табл. 3.8).

Мозговая зона лимфатических узлов содержит мозговые шнуры, между которыми расположены медуллярные синусы. В шнурах содержатся лимфоциты обоих классов. В ходе иммунного ответа здесь сосредоточивается значительная часть плазматических клеток. В синусах расположена лимфа, содержащая лимфоциты. Эта лимфа оттекает по эфферентным сосудам и впадает в кровеносную систему.

#### 3.4.2.2. Селезенка

Селезенка служит иммунным барьером на путях гематогенного распространения патогенов и других чужеродных агентов. Ее функции более разнообразны, чем функции лимфатических узлов. Помимо функций органа иммунной системы она участвует в удалении старых лимфоцитов, регулирует объем циркулирующей крови, а у ряда животных служит органом гемопоэза. Селезенка окружена капсулой, от которой отходят трабекулы, несущие артерии. Приток лимфы через афферентные сосуды отсутствует. Через ворота из органа выходят вены. Основу селезенки составляет красная пульпа, обеспечивающая гомеостаз эритроцитов. Красную пульпу делят на

синусоиды (включают все элементы крови) и губчатые образования (богаты макрофагами, лимфоцитами и плазматическими клетками). В красную пульпу мигрируют NK-клетки, практически отсутствующие в белой пульпе (как и в лимфатических узлах). Из Т- и В-лимфоцитов в красной пульпе преобладают эффекторные клетки и клетки памяти. Поскольку в красную пульпу мигрируют некоторые плазматические клетки, она принимает участие в эффекторной фазе гуморального иммунного ответа.

Красная пульпа содержит вкрапления — зерновидные тельца, представляющие собой белую пульпу, окруженную краевым (маргинальным) синусом. Именно белая пульпа выполняет функции вторичного лимфоидного органа. Строение белой пульпы во многом сходно со строением лимфатического узла (рис. 3.69). Ткань белой пульпы формируется вокруг артериолы. К ней непосредственно примыкает параартериальная муфта, в которой локализуются Т-клетки (т.е. муфта служит тимусзависимой зоной, аналогом паракортикальных зон лимфатических узлов). Муфту окружает пространство, занятое лимфоцитами обоих классов. В этом пространстве ближе к периферии белой пульпы расположены лимфоидные фолликулы, по своей структуре и функциям идентичные фолликулам лимфатических узлов и

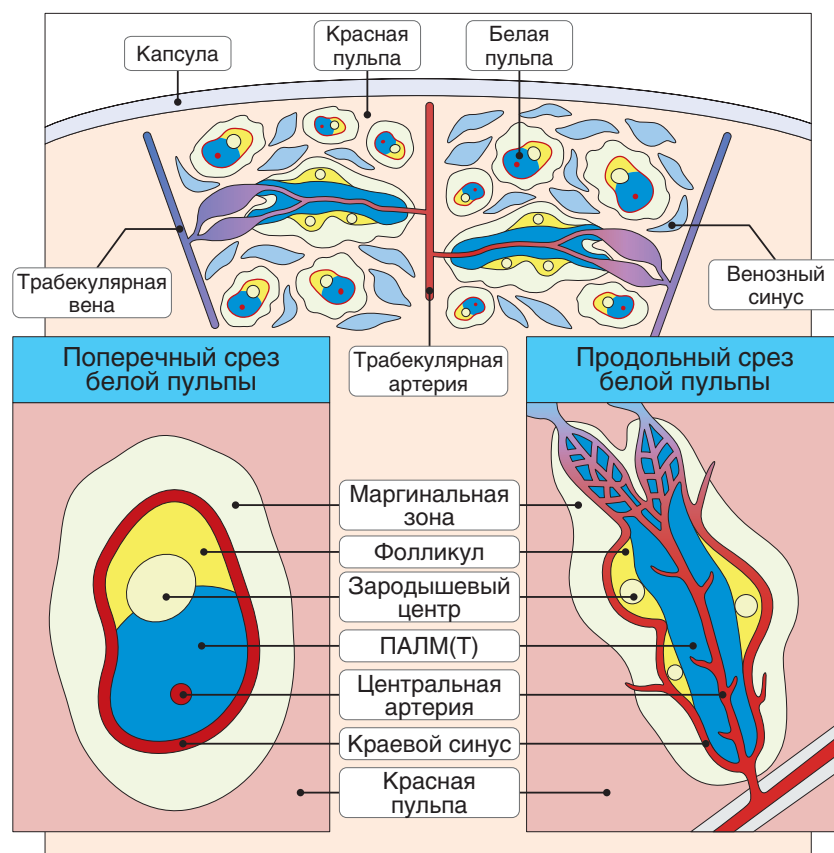


Рис. 3.69. Строение белой пульпы селезенки (по Janeway C.A. et al., 2005)

других образований периферической лимфоидной ткани. Закономерности формирования и функционирования фолликулов в качестве ниш для Т- и В-лимфоцитов в селезенке сходны с таковыми в лимфатических узлах (различия — в деталях). Периферический отдел белой пульпы, граничащий с красной пульпой, занят краевой (маргинальной) зоной, в которой преобладают В-лимфоциты (в основном МЗВ-клетки — см. выше). В маргинальную зону открываются капилляры, отходящие от центральной артериолы, причем кровь изливается непосредственно в этот участок селезеночной ткани. В маргинальной зоне происходит обмен клетками между белой и красной пульпой.

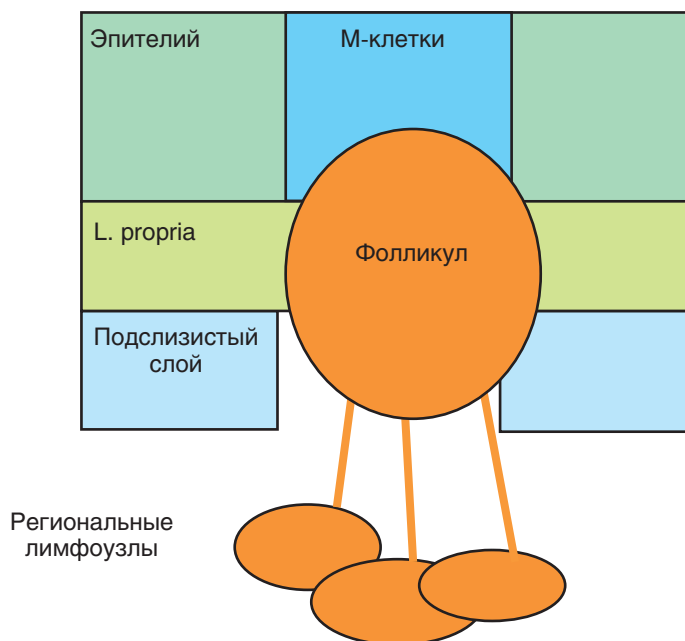
Содержание в селезенке различных лимфоидных клеток представлено в табл. 3.22. Обращает на себя внимание преобладание в этом органе В-лимфоцитов над Т-клетками.

### 3.4.2.3. Лимфоидная ткань слизистых оболочек

Через слизистые оболочки в организм с наибольшей вероятностью поступают экзогенные потенциально агрессивные субстанции. Выделяют 3 основные системы органов, контактирующих с внешней средой — пищеварительный, дыхательный и урогенитальный тракты, а также малые протоки экзокринных желез — слюнных, слезных, сальных, потовых. Наибольшая нагрузка при этом ложится на пищеварительный тракт. Все эти наиболее уязвимые для биологической агрессии поверхности организма имеют хорошо развитое «иммунологическое оснащение». Иммунологический аппарат слизистых оболочек представлен как организованными тканевыми структурами, так и диффузной лимфоидной тканью (рис. 3.70).



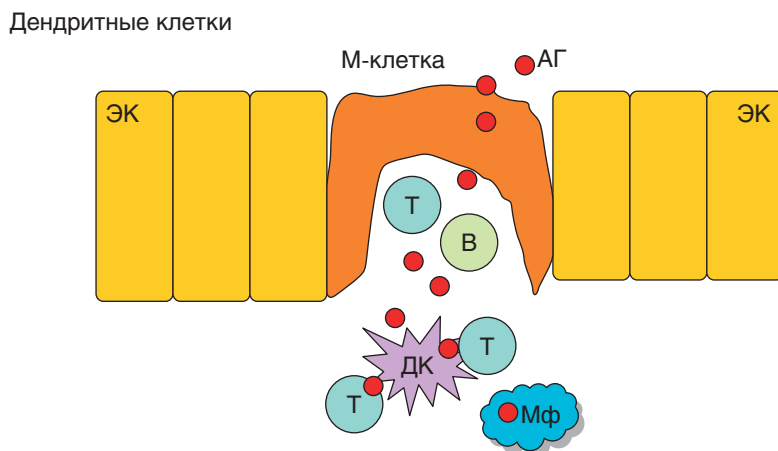
Рис. 3.70. Схема строения кишечной стенки (по Goldsby S. et al., 2005)



**Рис. 3.71.** Структура локального сегмента мукозального отдела иммунной системы

Различают афферентный и эфферентный разделы лимфоидной ткани слизистых оболочек. Первый, ответственный за прием и обработку иммунологической информации, включает преимущественно организованные лимфоидные структуры. Эфферентное звено включает диффузные элементы лимфоидной ткани. Структурированную лимфоидную ткань обозначают как ассоциированную со слизистыми оболочками (MALT — *Mucosa-associated lymphoid tissue*) (рис. 3.71). Лимфоидные структуры всегда присутствуют в пищеварительном тракте и с меньшим постоянством — в других слизистых оболочках.

Ранее полагали, что поступление антигенов во внутреннюю среду организма связано исключительно с нарушением целостности барьеров. Однако недавно было установлено, что чужеродные молекулы и агенты в норме непрерывно поступают в организм через слизистые оболочки. Их транспорт осуществляют специализированные клетки эпителия — М-клетки (от *microfold*). М-клетки присутствуют в составе фолликулярного эпителия, который выстилает внутреннюю поверхность слизистой оболочки над местами расположения лимфоидных фолликулов или пейеровых бляшек (рис. 3.72). Эти клетки покрывают значительную часть поверхности лимфоидных структур слизистых оболочек (около 10% поверхности пейеровых бляшек). Микроскладки, давшие название этим клеткам, увеличивают поглощающую поверхность. М-клетки лишены слоя слизи, покрывающего другие эпителиальные клетки слизистых оболочек. Маркер М-клеток — рецептор лектина улитки европейской I (*Ulex europaeus*) — UEAR1. Основное назначение М-клеток состоит в активном транспорте антигенного матери-



**Рис. 3.72.** М-клетка и связанные с ней клетки иммунной системы. Показано проникновение антигена через М-клетки и его взаимодействие с дендритными клетками, макрофагами, Т- и В-клетками памяти

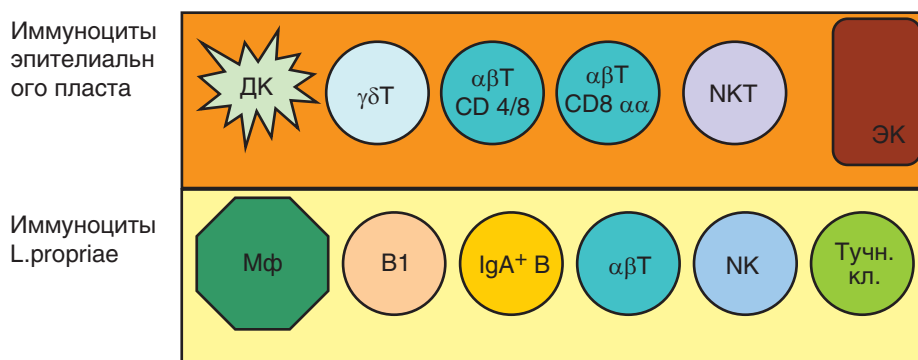
ала (включая микробные тела) из полости органа в лимфоидные структуры. Механизм транспорта пока неясен, но он не имеет отношения к МНС-зависимому процессингу антигенов. М-клетки имеют форму колокола, вогнутая часть которого обращена в сторону лимфоидных фолликулов, причем к М-клеткам непосредственно примыкает купол (*dome*) пейеровых бляшек или единичных фолликулов — пространство, в котором расположены Т- и В-лимфоциты — преимущественно клетки памяти. Несколько глубже в куполе, наряду с этими клетками, присутствуют макрофаги и дендритные клетки.

Выделяют 2 типа организованных лимфоидных структур слизистых оболочек — пейеровы бляшки и одиночные фолликулы. Пейеровы бляшки — настоящие лимфоидные органы, которые можно рассматривать как структурные и функциональные аналоги лимфатических узлов. Они содержатся только в подвергающейся наибольшей антигенной нагрузке слизистой оболочке тонкого кишечника. В состав пейеровых бляшек входят лимфоидные фолликулы, тимусзависимые зоны и участки совместной локализации Т- и В-клеток. Основные отличия их от лимфатических узлов состоят в отсутствии капсулы, а также в наличии особой структуры — купола бляшки, расположенного непосредственно под слоем М-клеток и предназначенного для «первичной обработки» антигенного материала. В куполе сосредоточены дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты. Дендритные клетки поглощают антигенный материал и презентуют его Т-лимфоцитам. В пейеровых бляшках происходят и другие начальные события гуморального и клеточного иммунного ответа. Дендритные клетки локализуются также в эпителиальном слое слизистой оболочки (часть диффузной лимфоидной ткани), где они могут воспринимать антигенный материал (в основном поступающий независимо от М-клеток) и доставлять его в брыжеечные лимфатические узлы для запуска в них иммунного ответа.

Инициация иммунных процессов, завершающаяся в региональных лимфатических узлах, может происходить также в более примитивных структурах — солитарных (единичных) фолликулах. Наиболее развитые структуры этого типа — неинкапсулированные скопления фолликулов, окруженные лимфоидной тканью, — миндалины, расположенные в носоглотке и гортани. Они образуют кольцо Вальдейера, включающее 6 миндалин — язычную, небные, трубные и глоточную (небные и трубные миндалины — парные). Единичные фолликулы содержатся также в слизистой оболочке тонкого и толстого кишечника. Лимфоидная ткань такого типа очень развита в аппендиксе.

В бронхолегочном тракте фолликулы выявляют только у 40–45% людей. Наличие или отсутствие лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками, в респираторном тракте определяется уровнем антигенной нагрузки на этот отдел слизистых оболочек в период их формирования (в ранние сроки после рождения). Описано образование транзиторных фолликулов — при инфицировании респираторного тракта. Присутствие организованной лимфоидной ткани чрезвычайно важно для возможности восприятия антигенного сигнала тем или иным участком барьерных тканей. Отсутствие фолликулов в слизистой оболочке бронхов делает неэффективной вакцинацию через дыхательные пути. Слизистые оболочки урогенитального тракта содержат еще меньше лимфоидных тканей. В слизистых оболочках мужского мочевого тракта фолликулы отсутствуют полностью, а в женском мочеполовом тракте они присутствуют только в фаллопиевых трубах.

Эфферентный (исполнительный) отдел иммунной системы слизистых оболочек представлен исключительно диффузной лимфоидной тканью. Ее состав существенно различается в эпителиальном (собственно слизистом) и в подслизистом слоях (рис. 3.73). В эпителии клетки эфферентного звена мукозальной иммунной системы представлены Т-лимфоцитами (внутриэпителиальные Т-лимфоциты), состоящими практически исключительно из клеток памяти или активированных лимфоцитов. Соотношение суб-



**Рис. 3.73.** Иммуноциты барьерных тканей: ДК — дендритная клетка; Тучн. кл. — тучная клетка; ЭК — эпителиальная клетка; Мф — макрофаг; в остальных случаях к обозначению в кружке следует добавить слово «клетка»

популяций Т-клеток в этом слое различно в слизистых оболочках разных трактов и их отделах. Так, в слизистой оболочке тонкой кишки  $CD8^+$  Т-клетки преобладают над  $CD4^+$  Т-лимфоцитами. Здесь представлена субпопуляция  $CD8\alpha\alpha^+ \gamma\delta$ Т-клеток, практически отсутствующая в других органах и тканях. Во всех отделах слизистых оболочек содержание  $\gamma\delta$ Т-клеток значительно выше, чем в крови и лимфатических узлах. Особенно много этих клеток содержится в слизистой оболочке тонкого кишечника (у человека до 10–15%, у мышей до 60–70%), однако обычно численно не превышает содержание  $\alpha\beta$ Т-клеток. Достаточно много (до 5%) Т-клеток эпителиального слоя слизистых оболочек лишены корцепторов ( $CD4^+CD8^-$ ). Допускается, что определенная часть Т-клеток (особенно  $CD8\alpha\alpha^+ \gamma\delta TCR^+$  и дваждыотрицательные  $\alpha\beta$ Т-лимфоциты) развивается вне тимуса.

Состав популяции клеток иммунной системы в подслизистом слое более разнообразен и близок спектру клеток во вторичных лимфоидных органах и крови. В подслизистом слое присутствуют типичные В- и Т-лимфоциты, NK-клетки, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, эозинофилы и тучные клетки. Особенность популяции эффекторных В-лимфоцитов подслизистого слоя, а также структурированной лимфоидной ткани слизистых оболочек — преобладание  $IgA^+$ -клеток, достаточно редко выявляемых в лимфатических узлах и селезенке. Соотношение субпопуляций Т-клеток в подслизистом слое близко к таковому в крови и лимфатических узлах. Хотя здесь преобладают клетки, ранее контактировавшие с антигеном (в основном клетки памяти), выявляют и наивные лимфоциты, мигрирующие в эти ткани из кровотока.

Лимфоидные ткани в различных слизистых оболочках взаимосвязаны, поскольку лимфоциты рециркулируют между всеми отделами слизистых оболочек (см. раздел 3.4.2.5). В то же время лимфоидная ткань слизистых оболочек в определенной степени изолирована от других (периферических) вторичных лимфоидных органов в связи с автономностью путей рециркуляции. В пределах лимфоидной системы слизистых оболочек некоторые ее отделы в некоторой степени изолированы друг от друга, поэтому проникновение клеток в слизистые оболочки кишечника требует экспрессии дополнительных «молекул хоминга». Так, в «особом положении» находится лимфоидная ткань слизистой оболочки кишечника, поскольку для привлечения в нее клеток, помимо общих для всех слизистых тканей молекул хоминга и хемокиновых рецепторов, необходимы особые молекулы этих групп, избирательно экспрессированные в кишечнике (например, интегрин  $\alpha_4\beta_7$ , распознающий молекулы MadCAM эндотелия сосудов кишечника). В результате все Т-клетки, способные мигрировать в слизистую оболочку кишечника могут мигрировать в любые другие слизистые оболочки, но только часть лимфоцитов из других слизистых оболочек может попасть в слизистую оболочку кишечника. Эти особенности распределения лимфоцитов очень важны и их необходимо учитывать при выборе путей вакцинации для защиты разных участков барьерных тканей.

#### 3.4.2.4. Лимфоидная ткань, связанная с кожей

Кожа представляет собой барьерную ткань. Благодаря наличию многослойного ороговевающего эпителия она обладает большей прочностью по

сравнению со слизистыми оболочками, содержащими однослойный неороговевающий эпителий. Именно поэтому через кожу поступает значительно меньше чужеродного материала, чем через слизистые оболочки. Кроме того, кожа лишена М-клеток, что исключает принудительное поглощение через нее антигенов. Все это обуславливает меньшую степень развития лимфоидной ткани кожи.

В отличие от слизистых оболочек, кожа полностью лишена структурированной лимфоидной ткани. В ней расположены только диффузные лимфоидные элементы. Аfferентное иммунное звено в коже представлено двумя вариантами дендритных клеток — обычными миелоидными дендритными клетками, аналогичными таковым в слизистых оболочках, и клетками Лангерганса. Особенность последних — наличие гранул Бирбека и экспрессия на поверхности клетки лектинового рецептора лангерина (CD208). Оба типа дендритных клеток поглощают чужеродный материал, обрабатывают его и, мигрируя в региональные лимфатические узлы, презентуют Т-лимфоцитам.

Эfferентная составляющая лимфоидной ткани кожи сходна с эfferентным звеном слизистых оболочек. Содержание и популяционный состав лимфоидных клеток в эпителиальном (эпидермис) и субэпителиальном (дерма) слоях кожи, как и в слизистых оболочках, значительно различаются. В эпидермисе преобладают Т-лимфоциты, в подавляющем большинстве контактировавшие ранее с антигеном (клетки памяти и эффекторные Т-лимфоциты). В эпидермисе  $\gamma\delta$ Т-клеток содержится больше, чем в кровотоке, но меньше, чем в слизистых оболочках. Значительная часть этих клеток — потомки Т-лимфоцитов, эмигрировавших из тимуса в эмбриональном периоде. Соотношение  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток в эпидермисе больше соответствует таковому в крови, чем в слизистых оболочках.  $CD4^+$  Т-клетки кожи экспрессируют особый маркер — молекулу CLA — адрессин, представляющий собой фукозилированный рецептор Р-селектина. Присутствие этого адрессина обеспечивает специфический хоминг несущих его Т-клеток памяти в кожу.

В дерме, как и в подслизистом слое, присутствуют практически все варианты клеток иммунной системы, включая В-лимфоциты и NK-клетки, а также клетки врожденного иммунитета. Особого внимания заслуживают эпителиальные клетки, возможно, кератиноциты. При активации бактериальными продуктами и провоспалительными цитокинами кератиноциты приобретают многие свойства макрофагов вплоть до способности к фагоцитозу и, возможно, презентации антигена клеткам памяти.

#### 3.4.2.5. Рециркуляция лимфоцитов

Лимфоидные органы — динамичные образования: лимфоциты непрерывно перемещаются в стромальном каркасе, покидают лимфоидные органы и вновь возвращаются в них. Этот круговорот лимфоцитов обозначают термином «рециркуляция». В процессе рециркуляции лимфоциты покидают лимфоидные органы с эfferентной лимфой (из селезенки они выходят с кровью). Через грудной лимфатический проток лимфоциты проникают в кровяное русло. Затем через посткапиллярные венулы клетки вновь проникают в лимфоидный орган (тот же или другой), внутри которого перемещаются в специфические места их локализации. Затем клетки вновь

покидают орган и выходят в циркуляторное русло и т.д. В нелимфоидных органах лимфоциты практически не циркулируют.

Из сказанного следует, что выявляемые в крови лимфоциты находятся в ней недолго (примерно 30 мин), но в течение суток многократно (4–5 раз) покидают ее и вновь возвращаются. Таким образом, несмотря на то, что в крови лимфоциты составляют всего около 0,5% от общего числа клеток, их состояние достаточно точно отражает состояние популяции лимфоцитов в целом организме. Это очень существенно, поскольку именно лимфоциты крови человека служат наиболее обычным и доступным объектом изучения как в экспериментальных, так и в клинико-иммунологических исследованиях. Субпопуляционный состав лимфоцитов крови человека представлен в табл. 3.23.

**Таблица 3.23.** Нормальные показатели содержания в крови взрослых людей основных популяций и субпопуляций лимфоцитов (по С.В. Хайдукову, 2008)

Клетки	Относительное содержание*, %	Число клеток в 1 л (M+m)
Лимфоциты (CD45 <sup>+</sup> )**	32±4	1,363–2,808×10 <sup>9</sup>
В-клетки (CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> )	12±5	0,111–0,376×10 <sup>9</sup>
Т-клетки (CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> )	73±12	0,946–2,079×10 <sup>9</sup>
αβТ-клетки (CD3 <sup>+</sup> αβTCR <sup>+</sup> )	70,5±9,7	0,022–0,115×10 <sup>9</sup>
γδТ-клетки (CD3 <sup>+</sup> γδTCR <sup>+</sup> )	4,6±2,8	0,924–1,964×10 <sup>9</sup>
Т-хелперы (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> )	45±10	0,576–1,336×10 <sup>9</sup>
Т-киллеры (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> )	27±8	0,372–0,974×10 <sup>9</sup>
Регуляторные Т-клетки (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> )	3,7±2,05	0,009–0,078×10 <sup>9</sup>
NKT-клетки (CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> )	3±3	0,007–0,165×10 <sup>9</sup>
Т-хелперы наивные (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> )	30±10	0,272–1,123×10 <sup>9</sup>
Т-хелперы активированные/памяти (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD29 <sup>+</sup> )	15±10	0,068–0,702×10 <sup>9</sup>
NK-клетки (CD45 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> )	13±5	0,123–0,369×10 <sup>9</sup>

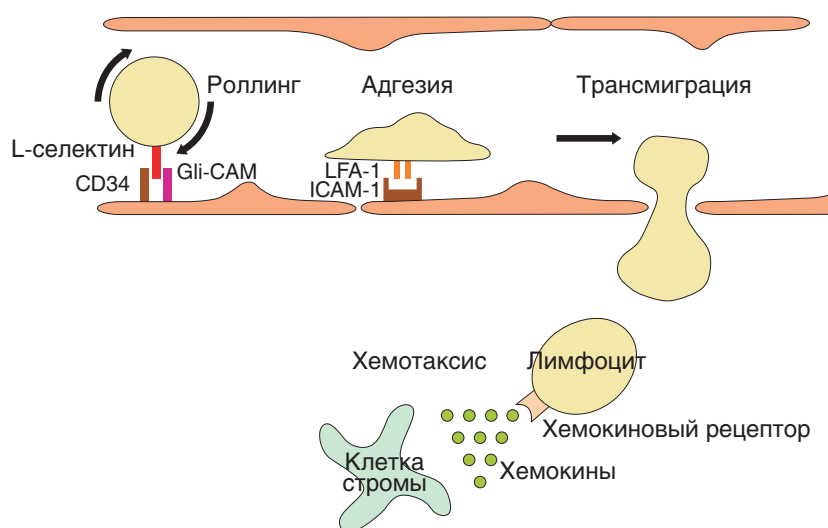
\* Указано среднее арифметическое со стандартной ошибкой.

\*\* Относительные и абсолютные количества лимфоцитов определяли от общего количества лейкоцитов.

Относительные и абсолютные количества субпопуляций Т-, В- и NK-клеток определяли от общего количества лимфоцитов.

Способность клеток находить «свое место» в организме называют **хомингом**. Существует две группы механизмов, задействованных в данном процессе, — контактные механизмы, обеспечиваемые молекулами адгезии, находящимися на поверхности лимфоцитов, и хемотаксис, определяющий направленность движения клеток, зависящую от наличия на их поверхности хемокиновых рецепторов.

Попав в сосудистую сеть лимфоидного органа, лимфоциты реагируют на хемокины, вырабатываемые клетками эндотелия в специализированном для миграции лимфоцитов отделе сосудов — посткапиллярных венулах.



**Рис. 3.74.** Схема транссусудистой миграции лимфоцитов. Отражены основные стадии эмиграции лимфоцитов через высокий эндотелий посткапиллярных венул лимфоидных органов. Указаны молекулы адгезии, важные для осуществления этого процесса; отражена роль хемокинов в привлечении клеток

Только в посткапиллярных венулах лимфоидных (но не других) органов есть высокий эндотелий, образованный спонтанно активированными клетками (аналогичный высокий эндотелий может быть индуцирован в других органах только под влиянием провоспалительных факторов). Клетки этого эндотелия секретируют  $\beta$ -хемокин CCL19, распознаваемый рецептором CCR7. Этот рецептор экспрессируют на поверхности наивные лимфоциты как Т-, так и В-класса. Таким образом, указанные эндотелиальные клетки способны привлекать как Т-, так и В-лимфоциты.

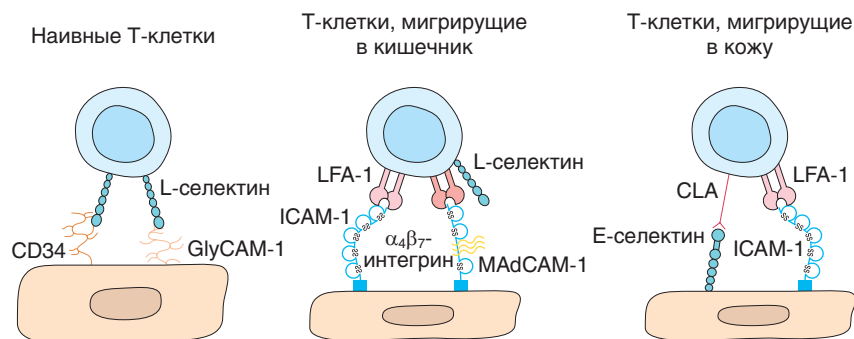
Далее происходит трансмиграция лимфоцитов по механизму, аналогичному миграции лейкоцитов в очаг воспаления (отличия касаются конкретных молекул адгезии, определяющих направление миграции — рис. 3.74). Ключевую роль при этом играет начальный момент миграции, обусловленный взаимодействием мембранного L-селектина (CD62L) лимфоцитов с адресинами (GlyCAM, CD34, PSGL-1) эндотелиальных клеток. Именно наличие CD62L на клеточной мембране определяет способность наивных лимфоцитов мигрировать в лимфатические узлы и пейеровы бляшки, в связи с чем CD62L называют рецептором хоминга. Это слабое взаимодействие обуславливает феномен качения (перекатывания лимфоцита вдоль сосудистой стенки). Вслед за этим устанавливается более прочное взаимодействие между  $\beta_2$ -интегрином лимфоцитов LFA-1 и его рецептором на эндотелиальной клетке — ICAM-1. Взаимодействие усиливается благодаря «активации»  $\beta_2$ -интегрина (т.е. изменения конформации молекулы, в результате которого повышается его сродство к рецептору — см. раздел 2.3.1.2). Это обуславливает прочное прилипание лимфоцита к сосудистой стенке. Затем под влиянием хемотаксических сигналов, поступающих из ткани

лимфоидного органа, лимфоцит начинает мигрировать из сосуда между эндотелиальными клетками.

Вышедшие из сосуда клетки попадают в примыкающие к посткапиллярным венулам тимусзависимые зоны, стромальные и дендритные клетки которых секретируют хемокины CCL19 (ELC) и CCL21 (SLC), распознаваемые рецептором CCR7 на лимфоцитах. До этого момента Т- и В-клетки перемещаются в одном и том же направлении. После того как лимфоцит попадает во внутреннюю среду органа, их пути расходятся. Т-клетки остаются в тимусзависимой зоне (в паракортесе лимфатических узлов, параартериальной муфте белой пульпы селезенки и Т-зонах пейеровых бляшек). В-клетки реагируют на хемокин CXCR13 (BLC), к которому они экспрессируют рецептор CXCR5. Этот хемокин секретируют стромальные клетки фолликулов, что и определяет направление миграции В-лимфоцитов. В-лимфоциты, не несущие CXCR5, не поступают в фолликулы и локализуются в прилегающей к фолликулу зоне. Механизмы, определяющие дальнейшее перемещение лимфоцитов из органа в эфферентную лимфу, пока не установлены.

В процессе рециркуляции отсутствует «привязка» хоминга к конкретному лимфатическому узлу или пейеровой бляшке. Так, лимфоцит, покинувший шейный лимфоузел, может затем проникнуть, например, в паховый лимфатический узел или в пейерову бляшку. Принципиально лишь то, что клетки не выходят из системы вторичных лимфоидных органов. Степень специфичности хоминга минимальна в селезенке, так как лимфоциты проникают в белую пульпу при излиянии крови в краевой зоне. Только последующее перемещение в Т- и В-зоны осуществляется по описанному выше механизму.

Все сказанное выше относится к наивным лимфоцитам. После активации лимфоцитов антигеном экспрессия молекул адгезии и хемокиновых рецепторов на их поверхности существенно изменяется. Это определяет иные пути миграции клеток после контакта с антигеном. Активированные лимфоциты и клетки памяти очень слабо экспрессируют L-селектин, что обуславливает низкую вероятность их попадания в лимфатические узлы. В то же время они приобретают способность мигрировать в очаги воспаления, расположенные в нелимфоидных органах, а также в барьерные ткани (рис. 3.75). Пути миграции активированных лимфоцитов и клеток



**Рис. 3.75.** Мембранный фенотип Т-клеток определяет пути их миграции. Указаны молекулы адгезии, определяющие различные направления миграции Т-клеток

памяти будут специально рассмотрены далее (см. раздел 3.6.5.4). Благодаря различной экспрессии рецепторов хоминга в разных тканях формируется несколько относительно автономных путей рециркуляции. Пути рециркуляции наивных лимфоцитов и клеток памяти могут пересекаться. Так, и наивные клетки, и клетки памяти, активированные в кишечнике, попадают в брыжеечные лимфатические узлы.

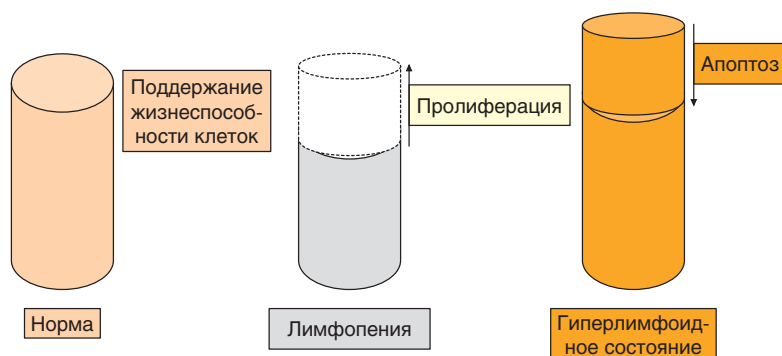
Интенсивность рециркуляции Т-лимфоцитов существенно выше, чем В-лимфоцитов. У человека через каждый лимфатический узел за сутки проходит  $0,3 \times 10^{11}$ , через селезенку —  $2,5 \times 10^{11}$ , а через кровь —  $5 \times 10^{11}$  лимфоцитов. Длительность пребывания Т-клеток в кровотоке за 1 цикл рециркуляции — около 30 мин. Благодаря рециркуляции происходит постоянное «перемешивание» лимфоидных клеток с сохранением описанного выше порядка: наивные клетки, как правило, не покидают лимфоидной ткани, тогда как клетки памяти, наоборот, часто выходят за ее пределы, мигрируя, например, в эпителиальные органы и ткани, а также в очаги воспаления. Внутри лимфоидных органов клетки также занимают соответствующие места. Упорядоченность локализации лимфоцитов различных типов очень важна для развития иммунного ответа.

#### 3.4.2.6. Обновление и гомеостаз лимфоидной популяции

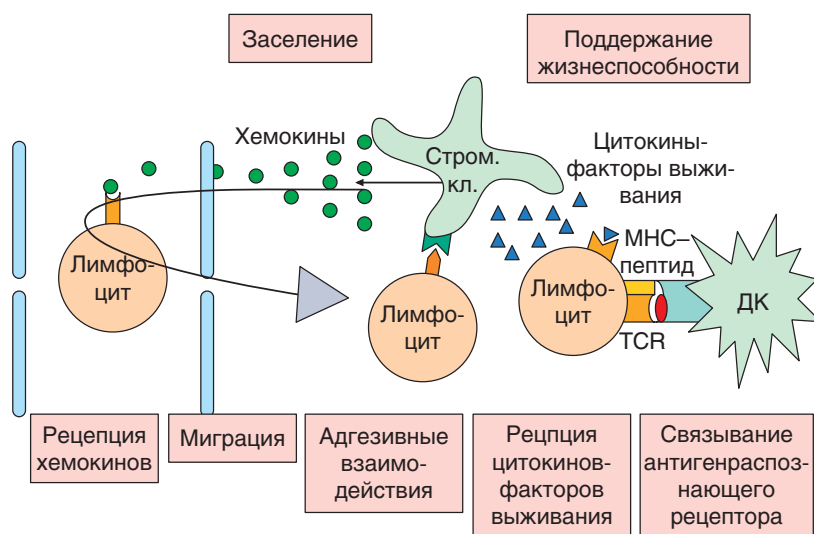
Динамичность популяций лимфоцитов проявляется не только в непрерывном перемещении клеток, но и в постоянном их обновлении. Срок жизни лимфоцитов разных субпопуляций существенно варьирует. Самый короткий срок жизни — у естественных киллеров, он составляет 7–10 сут. Продолжительность жизни В-клеток — несколько недель. Срок жизни различных субпопуляций наивных Т-лимфоцитов очень сильно варьирует и составляет 1000–10 000 сут (т.е. примерно 2,5–30 лет). Срок жизни клеток памяти составляет десятки лет и сопоставим с длительностью жизни человека и животных. Замещение отмирающих клеток происходит в основном за счет их образования *de novo* в процессе лимфопоэза. Однако интенсивность лимфопоэза несколько ниже интенсивности отмирания лимфоцитов. Разница компенсируется за счет спонтанной (фоновой) пролиферации клеток, происходящей очень медленно (доля лимфоцитов, пребывающих в фазе фоновой пролиферации, в каждый конкретный момент не превышает 1%).

Этот баланс уравновешен на уровне **лимфоцитарных ниш**: численность клеток определенного типа соответствует объему ниш, которые могут быть заселены этими клетками (рис. 3.76). Выше упоминалось о нишах как участках в лимфоидных органах, в которые могут мигрировать В- и Т-лимфоциты, и в которых эти клетки находят необходимые для выживания факторы. Лимфоцитарные ниши можно определить как микроанатомические структуры периферического отдела иммунной системы, способные привлекать мигрирующие лимфоциты и обеспечивающие их факторами выживания, а также необходимыми питательными и энергетическими ресурсами. Внутри популяции происходит конкуренция за места расселения и ресурсы (рис. 3.77).

Если клетки занимают разные ниши, конкуренция отсутствует. В связи с этим важно знать, какие субпопуляции клеток занимают общие и какие —



**Рис. 3.76.** Принцип функционирования гомеостатических лимфоцитарных ниш. Окрашенные цилиндры обозначают ниши, которые могут быть заполнены, недозаполнены и переполнены. Реакция гомеостатических систем направлена на восстановление соответствия числа клеток размеру ниши

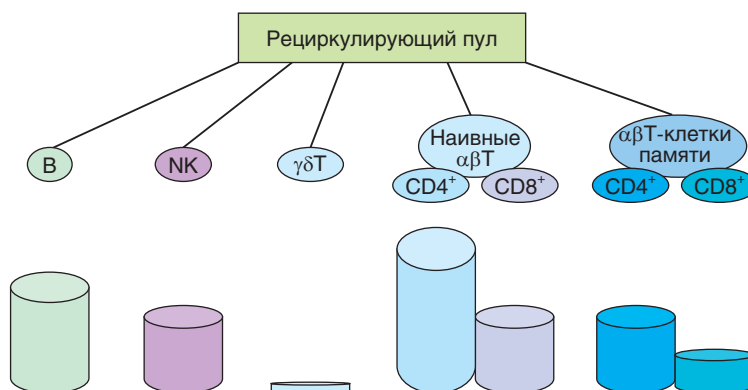


**Рис. 3.77.** Устройство и принцип функционирования лимфоцитарной ниши. Благодаря наличию хемотаксического сигнала и экспрессии циркулирующими лимфоцитами необходимых молекул адгезии и хемокиновых рецепторов клетки проникают из циркуляции в участок ниши, где они получают необходимые для выживания факторы. Стром. кл. — стромальные клетки

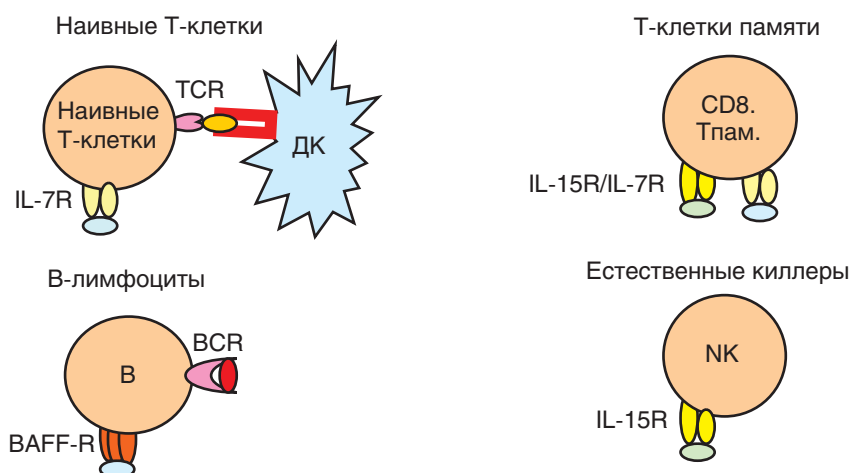
различные ниши. Это устанавливают в опытах с переносом клеток соответствующих субпопуляций в организм, в котором искусственно создается дефицит клеток того или иного типа. Клетки, занимающие общую нишу с находящимися в дефиците клетками, будут в таком случае пролиферировать, чтобы заполнить пустующую нишу. Этот тип пролиферации называют гомеостатической. Ее следует отличать как от фоновой, так и от индуцируемой пролиферации. Так, было установлено, что Т-, В- и NK-клетки зани-

мают разные ниши. Разные ниши занимают  $\gamma\delta$ T- и  $\alpha\beta$ T-клетки, наивные T-клетки и T-клетки памяти (рис. 3.78). Что касается субпопуляций  $CD4^+$  и  $CD8^+$  T-лимфоцитов, то они занимают одну нишу, но каждая субпопуляция располагает внутри нее определенной автономией.

Как правило, факторы, обеспечивающие выживаемость той или иной субпопуляции, одновременно служат индукторами гомеостатической пролиферации, причем неизвестно, почему при нормальном содержании клеток факторы выживания не индуцируют их деления, а при их дефиците активируют пролиферацию клеток недостающего типа, которая прекращается по достижении нормальной их численности. Для всех клеток, кроме наивных T-лимфоцитов, факторами, контролирующими гомеостаз, служат цитокины (рис. 3.79). Для B-лимфоцитов — это уже упоминавшийся выше



**Рис. 3.78.** Лимфоидные компартменты — объекты независимой регуляции и гомеостатического контроля. Указаны популяции и субпопуляции лимфоцитов, размеры которых контролируются автономно



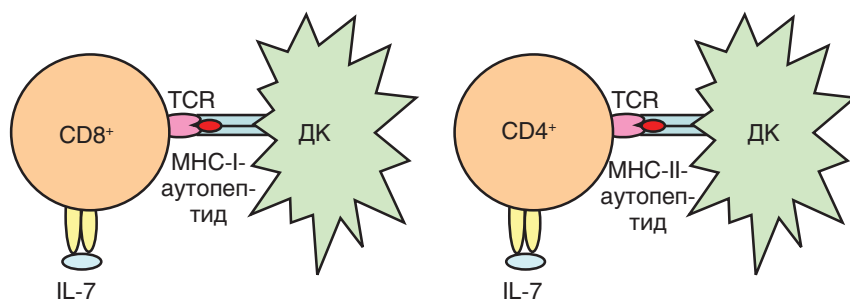
**Рис. 3.79.** Факторы, обуславливающие выживаемость и гомеостаз популяций T-, B- и NK-клеток

BAFF (цитокин семейства  $\text{TNF}\alpha$ ), для естественных киллеров — IL-15 (вспомогательную роль играет IL-7). Гомеостатический эффект IL-15 реализуется через действие не прямо на НК-клетки, а опосредованно через стромальные клетки, связывающие IL-15 своими рецепторами и презентрующие его НК-клетке. В поддержании гомеостаза НКТ-клеток и Т-клеток памяти также участвуют IL-15 и IL-7.

Гомеостатический контроль наивных Т-клеток реализуется с помощью как гуморальных, так и контактных механизмов. Основную роль в гомеостазе наивных Т-клеток играет IL-7. Варьируя его содержание в организме, можно повышать или понижать численность наивных Т-лимфоцитов. IL-7 вырабатывают стромальные клетки вторичных лимфоидных органов, а также эпителиальные клетки тимуса. При подсадке дополнительных тимусов происходит увеличение численности Т-клеток в результате увеличения содержания IL-7, синтезированного эпителиальными клетками трансплантационного тимуса. При полном отсутствии IL-7 Т-клетки погибают в течение 2–4 нед.

Второй механизм гомеостатического контроля Т-клеток реализуется при помощи того же процесса, что и положительная селекция тимоцитов, только происходит этот процесс не в тимусе, а в периферических лимфоидных органах, прежде всего в паракортикальных зонах лимфатических узлов. Суть его состоит в распознавании TCR  $\alpha\beta$  Т-клеток молекул МНС и презентруемого ими эндогенного пептида (аналогичного пептидам, распознаваемым при положительной селекции). Для поддержания жизнеспособности и включения гомеостатической пролиферации  $\text{CD8}^+$  Т-клеток требуется распознавание молекул МНС-I, для гомеостаза  $\text{CD4}^+$  Т-клеток — молекул МНС-II (рис. 3.80). В последнем случае распознавание может осуществляться только в тимусзависимых зонах лимфоидных органов и только с участием дендритных (интердигитальных) клеток. Для  $\text{CD8}^+$  Т-клеток условия распознавания МНС-I менее жесткие: считают, что оно может происходить и вне лимфоидных органов, но обязательно с участием дендритных клеток.

Таким образом, зрелые наивные Т-клетки должны постоянно «подтверждать» свою способность «правильно» распознавать антиген. Определенную



**Рис. 3.80.** Условия выживания  $\text{CD8}^+$  и  $\text{CD4}^+$  Т-клеток. Особое положение наивных Т-лимфоцитов обусловлено зависимостью их выживаемости не только от цитокина (IL-7), но и от прямого распознавания комплексов «молекула МНС—эндогенный пептид» на дендритных клетках

степень автономности гомеостатического контроля этих клеток обеспечивает наличие пределов Т-клеточной ниши гомеостатических факторов для  $CD4^+$  и  $CD8^+$  лимфоцитов в виде разных молекул МНС. При переносе зрелых  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток в организм, лишенный молекул МНС одного из классов (например, вследствие генетического дефекта), клетки соответствующей субпопуляции постепенно погибают ( $CD8^+$  клетки — через 1–4 нед,  $CD4^+$  Т-клетки могут прожить до 100 сут). Пока не вполне понятно, как Т-клетки «накапливают» стимул к выживаемости, обусловлено ли это «подсчетом» числа контактов с молекулами МНС и как подобный подсчет осуществляется.

После контакта с антигеном Т-клеткам больше не требуется распознавание молекул МНС для выживания. Жизнеспособность этих клеток, а также контроль их численности осуществляется с участием цитокинов — IL-15, IL-7 и др. Важный аспект гомеостаза лимфоидных популяций — установление равновесия между численностью наивных лимфоцитов и клеток памяти, а также изменение этого баланса с возрастом. Данный вопрос будет рассмотрен далее (см. раздел 3.6.3.2) при описании клеток памяти. Механизмы гомеостатического контроля субпопуляции  $\gamma\delta$ Т-клеток, не способных распознавать молекулы МНС, не установлены. Вероятно, их численность поддерживается только IL-7.

Понимание природы и механизмов гомеостатического контроля численности лимфоцитов в популяциях и субпопуляциях очень важно для правильного истолкования ее изменений при патологиях и разработке путей ее коррекции.

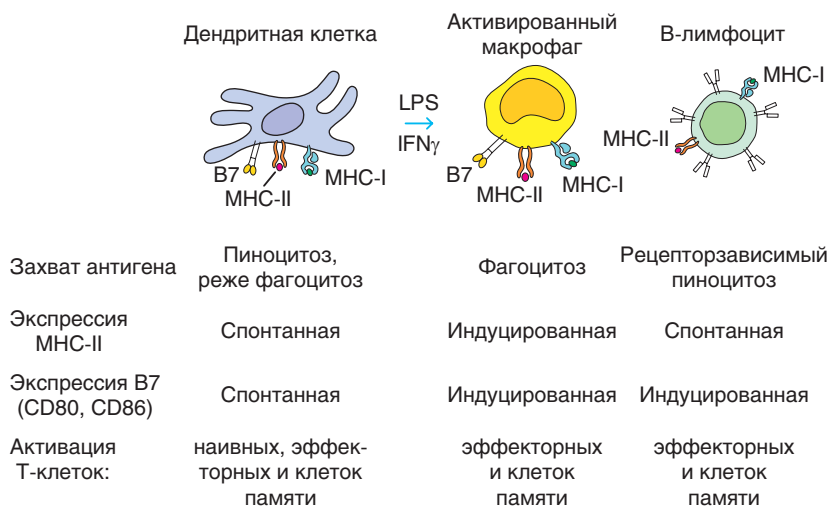
### 3.5. АКТИВАЦИЯ ЛИМФОЦИТОВ И ЗАПУСК ИММУННОГО ОТВЕТА

Лимфоциты являются единственными клетками в организме, чье развитие не завершается без вмешательства внешних факторов. Для лимфоцитов в роли таких факторов выступают антигены. Реакция лимфоцитов на антигенные стимулы составляет основу адаптивного иммунного ответа. Его суть состоит в размножении клонов лимфоцитов, экспрессирующих антигенные рецепторы, распознающие антигены-индукторы ответа, и дифференцировке этих лимфоцитов в эффекторные клетки, которые обеспечивают удаление антигенов из организма.

#### 3.5.1. Презентация антигена

Исходное событие в развитии иммунного ответа — активация антигеном специфических клонов лимфоцитов. Клетки вовлекаются в иммунный ответ не одновременно. Первыми активируются Т-хелперы —  $CD4^+$  Т-лимфоциты, выступающие в качестве инициаторов антигенспецифической фазы иммунного процесса. Обычно это происходит на фоне уже развившейся неспецифической (т.е. не предполагающей распознавания индивидуальных антигенов) фазы ответа, осуществляемой клетками врожденного иммунитета, как правило, в рамках воспалительной реакции.

Выше неоднократно подчеркивалось, что Т-клетки распознают не свободный антиген, а антигенные эпитопы, встроенные в молекулы МНС.

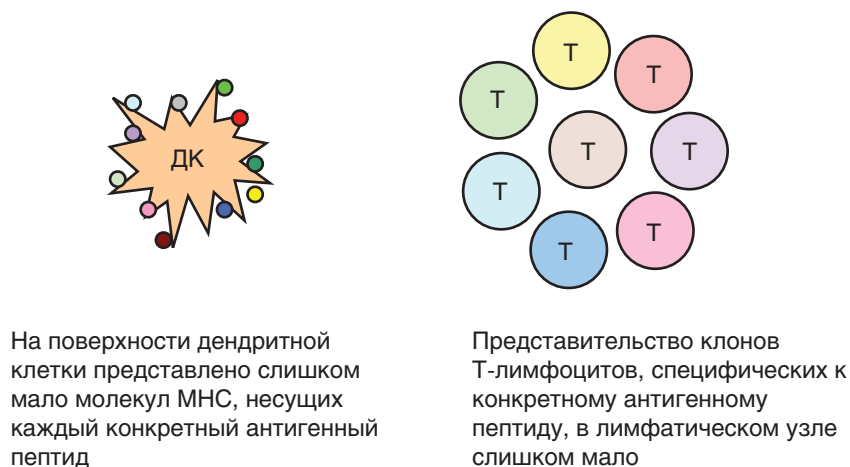


**Рис. 3.81.** Основные разновидности «профессиональных» антигенпрезентирующих клеток

Антиген Т-клеткам представляют специализированные антигенпрезентирующие клетки (АПК) при прямом контактом взаимодействии. Презентация сопровождается передачей дополнительных сигналов (костимуляцией), обеспечивающей активацию клеток, распознавших антиген. В качестве АПК теоретически может выступать любая клетка, экспрессирующая молекулы МНС как I, так и II класса, а также костимулирующие молекулы. Как известно, всеми этими качествами обладают «профессиональные» АПК — дендритные клетки, макрофаги и В-лимфоциты (рис. 3.81); их могут приобретать многие другие клетки (например, эндотелиальные, эпителиальные) при активации, например, в условиях воспаления. Однако реально при первичном иммунном ответе, требующем вовлечения наивных Т-лимфоцитов, роль АПК могут эффективно выполнять только дендритные клетки, презентационный потенциал которых на два порядка превосходит таковой макрофагов.

Таким образом, в запуске иммунного ответа принимают участие 2 типа клеток — дендритные клетки и  $CD4^+$  Т-хелперы (здесь и далее в этой главе речь идет о первичном иммунном ответе, т.е. о реакции на первый контакт с данным антигеном). Таким образом, особое место презентации антигена в иммунных процессах обусловлено двумя обстоятельствами. Во-первых, это событие можно рассматривать как момент запуска иммунного ответа. Во-вторых, оно служит основной точкой взаимодействия подсистем врожденного и адаптивного иммунитета. При этом дендритные клетки представляют врожденный, а Т-хелперы — адаптивный иммунитет.

При презентации антигена могут возникать серьезные трудности. Клетки, участвующие в презентации антигена, а также популяции, которые они образуют, коренным образом отличаются друг от друга своими свойствами. Так, популяция Т-клеток имеет клональную организацию на основе специфичности их TCR и каждая индивидуальная клетка экспрессирует рецепторы, идентичные по специфичности, т.е. распознающие один и тот



**Рис. 3.82.** Проблемы, затрудняющие презентацию антигена: дефицит антигенных пептидов на поверхности антигенпрезентирующей клетки и малочисленность клеток в клонах антигенраспознающих Т-лимфоцитов

же антиген. С другой стороны, на поверхности каждой дендритной клетки присутствуют молекулы МНС-II, несущие самые разнообразные пептиды, распознаваемые различными клонами Т-хелперов (рис. 3.82). Упомянутые выше трудности обусловлены дефицитом в лимфоидных органах клонов Т-клеток нужной специфичности и недостатком на поверхности дендритных клеток молекул МНС, несущих требуемый пептид.

Действительно, прямое выявление показало наличие у мышей  $(5-8) \times 10^5$  вариантов нуклеотидной последовательности V $\beta$ -генов  $\alpha\beta$ TCR-генов. Эта величина соответствует минимальной оценке числа клонов. При наличии в селезенке около  $50 \times 10^6$   $\alpha\beta$ Т-клеток и равномерном распределении клонов в организме число клеток каждого клона должна составлять в селезенке около 100, а в каждом лимфатическом узле — примерно в 10 раз меньше, т.е. в среднем менее 10 клеток каждого клона. Таким образом, при локальной иммунизации антиген, поступивший в составе дендритных клеток в региональный лимфоузел, может «не найти» в нем Т-клетки специфичного к нему клона.

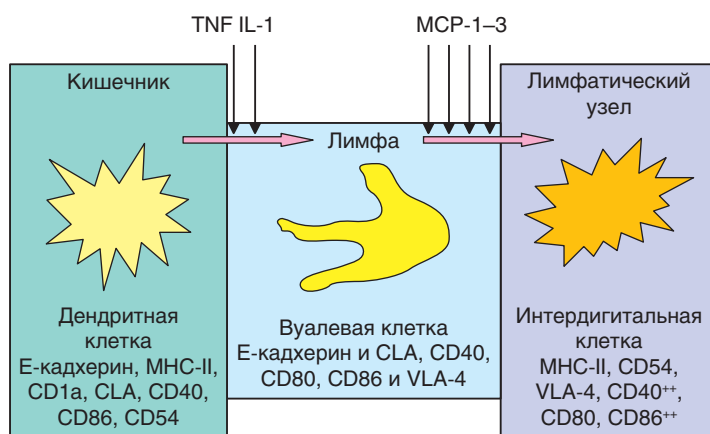
Наконец, возникает сомнение, что на поверхности дендритной клетки представлено достаточное число молекул МНС-II класса, несущих пептид, который может быть распознан Т-клетками конкретного клона, вовлекаемого в иммунный ответ. Установлено, что для активации Т-клетки требуется взаимодействие ее TCR примерно с 200–500 молекулами МНС-II, несущими специфичный пептид. Общее число молекул МНС-II на поверхности дендритной клетки —  $3-10 \times 10^4$ . Молекулы МНС-II, несущие конкретный антиген, составляют не более 0,1%, т.е. 30–100 молекул. Таким образом, число комплексов МНС-II–пептид на поверхности дендритной клетки меньше, чем необходимо для активации Т-хелпера.

Детальное рассмотрение показывает, что обе эти проблемы, кажущиеся непреодолимыми, эффективно решаются в ходе презентации антигена с

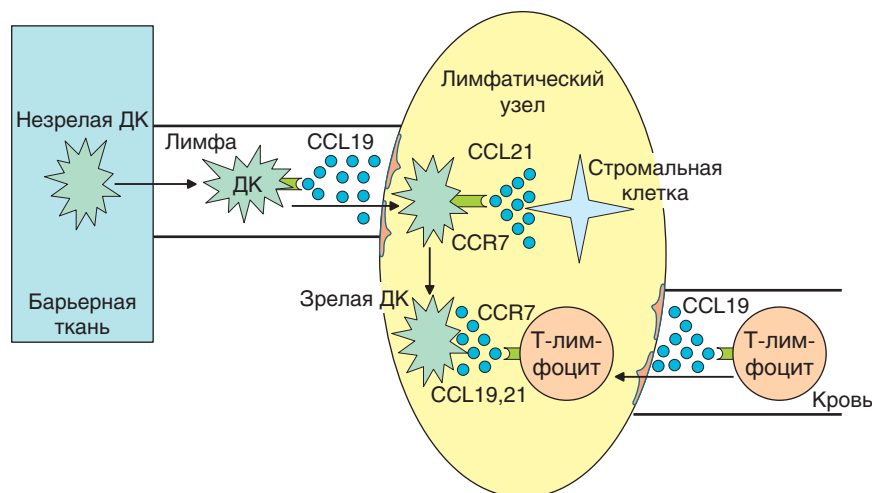
вовлечением ряда процессов на уровне организма, клеточных популяций и индивидуальных клеток.

### 3.5.1.1. Миграция клеток, участвующих в презентации антигена

Взаимодействуя в барьерных тканях с патогенами — носителями антигенов, дендритные клетки поглощают их с помощью различных форм эндоцитоза и под влиянием провоспалительных цитокинов мигрируют в тканевую жидкость, а затем — в лимфу, где они приобретают характерную форму вуалевых клеток (рис. 3.83). Одновременно изменяется мембранный фенотип этих клеток: усиливается экспрессия молекул МНС-II, костимулирующих молекул, появляются  $\beta_1$ -интегрины и хемокиновый рецептор CCR7. В это же время осуществляется процессинг антигена и экспрессия его пептидов на поверхности клетки в составе молекул МНС. Стоком афферентной лимфы дендритные клетки проникают в региональные лимфатические узлы через их выпуклую поверхность, противоположную воротам. Попад в ткань лимфатического узла, дендритные клетки мигрируют в Т-зоны, куда их привлекают хемокины CCL19 (ELC) и CCR21 (SLC), распознаваемые рецептором CCR7 (рис. 3.84). Эти хемокины секретируются стромальными клетками Т-зон лимфатического узла. При вовлечении регионального лимфатического узла в воспалительный процесс (что обычно происходит при локальном инфицировании) проникновению дендритных клеток в лимфатический узел способствуют также вырабатываемые в нем провоспалительные хемокины CCL2, CCL7, CCL8 (MCP1, MCP2 и MCP3). Оказавшись в Т-зоне лимфоидных органов, дендритные клетки созревают (признак созревания — экспрессия молекул CD83) и превращаются в интердигитальные клетки. Эти клетки не экспрессируют рецептор CCR7, но сами вырабатывают хемокины CCL21 и CCL19. Таким образом, они сами начинают привлекать как незрелые дендритные клетки, пополняющие



**Рис. 3.83.** Созревание дендритных клеток и их миграция из барьерных тканей в лимфатические узлы. Показано не только перемещение дендритных клеток, но и их созревание с приобретением способности презентировать антигенный пептид Т-лимфоцитам

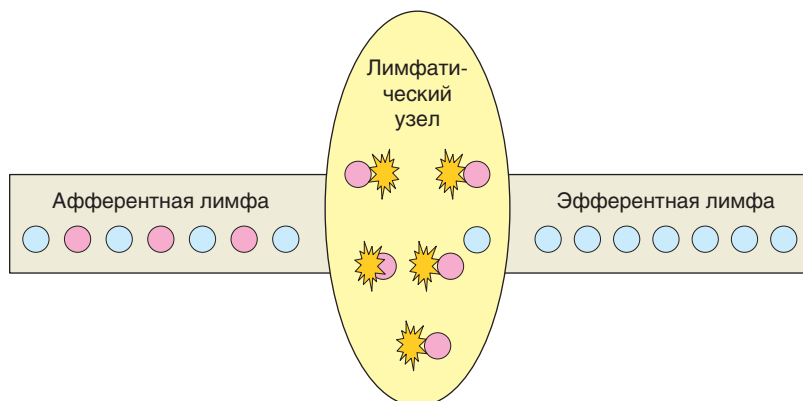


**Рис. 3.84.** Миграция дендритных клеток и Т-лимфоцитов в Т-зоны лимфатического узла определяет возможность контакта этих клеток. Для эффективной презентации антигена дендритные клетки и рециркулирующие Т-лимфоциты, поступающие в региональный лимфоузел разными путями, должны оказаться в одной его морфологической зоне (Т-зоне). Это достигается благодаря экспрессии клетками обоих типов рецептора CCR7, который распознает хемокины CCL19 и CCL21, секретируемые клетками высокого эндотелия, а также стромальными клетками (в том числе дендритными/интердигитальными) Т-зон

популяцию интердигитальных клеток лимфоузлов, так и Т-лимфоциты, поступающие в узел в процессе рециркуляции. Это способствует сближению дендритных клеток с Т-лимфоцитами, необходимому для формирования иммунного синапса.

Накопление Т-клеток необходимой специфичности в региональном лимфатическом узле происходит с участием специального механизма. Как было детально описано выше (см. раздел 3.4.2.5), Т-лимфоциты непрерывно рециркулируют, при этом они периодически поступают в лимфоидные органы, прежде всего в лимфатические узлы. Т-клетки проникают в лимфоузлы с током крови (т.е. через ворота органа — иным путем, чем дендритные клетки) и мигрируют в ткань узла через высокий эндотелий посткапиллярных венул. Экстравазация происходит с участием экспрессированного на Т-лимфоцитах L-селектина CD62L (рецептора хоминга) и хемокинового рецептора лимфоцитов CCR7 (распознает хемокин CCL21, секретируемый эндотелиальными клетками). Затем Т-клетки мигрируют в Т-зоны по градиенту хемокинов CCL19 и CCL21, вырабатываемых, как указано выше, стромальными клетками Т-зон и локализованными здесь интердигитальными клетками. Обычно Т-лимфоциты не задерживаются в лимфатическом узле долго и, покидая его с лимфой, вступают в очередной цикл рециркуляции.

Ситуация складывается по-иному в отношении тех Т-клеток, чьи антигенраспознающие рецепторы специфичны для эпитопов, представлен-



**Рис. 3.85.** Улавливание специфических клонов Т-лимфоцитов в региональном лимфатическом узле. Проблема недостатка Т-клеток любого конкретного клона в лимфатическом узле решается путем улавливания этих клеток в процессе их рециркуляции через лимфоузел

ных на поверхности интердигитальных клеток в комплексе с молекулами МНС. В Т-зонах лимфоидных органов, в частности лимфатических узлов, Т-лимфоциты и интердигитальные клетки находятся в достаточно тесном контакте и непрерывно взаимодействуют друг с другом с помощью молекул адгезии и различных мембранных рецепторов. При наличии сродства между TCR Т-клетки и комплексом МНС–пептид интердигитальной клетки формируется зона устойчивого межклеточного контакта — иммунный синапс. Процесс рециркуляции непрерывен, и через каждый узел может пройти любая Т-клетка, в том числе Т-клетки клона, специфичного к антигену, поступившему в организм. Поэтому практически все Т-лимфоциты, принадлежащие тому клону, который специфичен к комплексам пептид-МНС, присутствующим на поверхности интердигитальных клеток, взаимодействуют с дендритными клетками регионального лимфатического узла и задерживаются в нем. При этом эфферентная лимфа оказывается обедненной Т-клетками клонов, вовлекаемых в иммунный ответ (рис. 3.85). Описанный процесс называется улавливанием (рекрутированием) клонов Т-лимфоцитов. С его помощью решается первая из двух упомянутых выше проблем — проблема дефицита антигенспецифических Т-клеток. Значимость этого процесса можно проиллюстрировать простым опытом: удаление регионального лимфатического узла через несколько часов после иммунизации мышей антигеном с стимулятором-адъювантом приводит к утрате способности животных к иммунному ответу на данный антиген, т.к. вместе с лимфатическим узлом из организма удаляются задержанные в нем Т-клетки специфического клона.

### 3.5.1.2. Иммунный синапс

Второе из сформулированных выше препятствий для осуществления презентации — дефицит молекул МНС, несущих «нужные» пептиды, — решается благодаря формированию особой структуры, необходимой для успешной презентации антигена — иммунного синапса или супрамолеку-

лярного активационного кластера (SMAC — *Supramolecular activation cluster*). Иммунный синапс — структурированная зона контакта между клетками, участвующими в реализации той или иной формы иммунологического распознавания и связанной с ним передаче сигнала. Иммунный синапс формируется с участием зрелой дендритной клетки и  $CD4^+$  Т-лимфоцита для презентации антигена и представляет наиболее многокомпонентную форму этого процесса. С участием иммунного синапса реализуются 3 основных условия эффективной презентации:

- устраняются стерические помехи для взаимодействия клеток;
- обеспечивается мобилизация молекул адгезии, необходимых для формирования контакта между клетками и его стабилизации;
- оптимизируется передача активирующего сигнала.

Выделяют 3 стадии формирования иммунного синапса — поляризацию клеток, установление зоны первичного контакта между клетками и образование зрелого иммунного синапса, способного обеспечить передачу сигнала. Поляризация клеток происходит в процессе их сближения, направляемого хемокинами. Как уже упоминалось, дендритные клетки привлекают Т-хелперы, выделяя СС-хемокины CCL19 и CCL21, распознаваемые Т-хелперами при помощи рецептора CCR7. Это обеспечивает поляризацию клеток, направленное движение Т-хелперов к дендритным клеткам и служит условием установления контакта между ними.

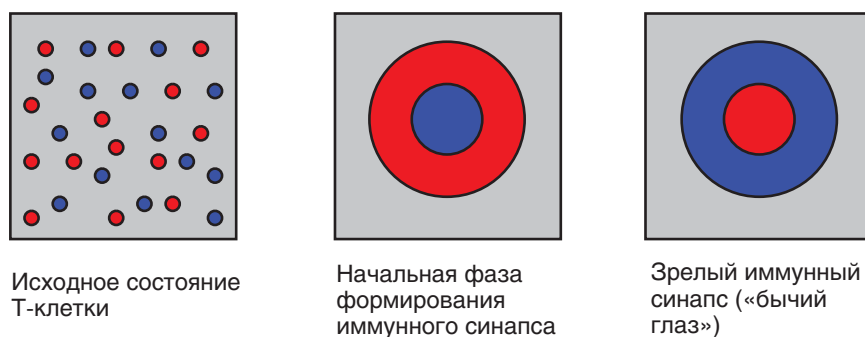
Поляризация клеток заключается в ориентации мембранных и внутриклеточных компонентов таким образом, чтобы облегчить не только установление контакта, но и последующий обмен сигналами, необходимыми для их взаимной активации. Участок клетки, расположенный в направлении ее движения, называют лидирующим, противоположный конец — хвостовым. В поляризации клеток участвуют актинсодержащие компоненты цитоскелета, активируемые сигналами от хемокиновых рецепторов (см. раздел 2.3.2.2). При перестройке цитоскелета происходит переориентация клеточного центра, организующего микротрубочки, локальная полимеризация актина и латеральное перемещение белков, обеспечивающее их накопление в зоне контакта клеток. Полимеризация актина происходит вследствие реализации цепи событий, запускаемых хемокинами и активацией G-белков, связанных с их рецепторами. В этом процессе участвуют фактор Vav и белок WASP, образующий комплекс с белком ARP2/3. В основе поляризации и направленного движения Т-хелперов и дендритных клеток лежат те же механизмы, что и при хемотаксисе фагоцитов.

Для формирования первичного контакта между клетками необходима остановка движения Т-лимфоцитов, зависящая от сигналов, исходящих от TCR и корецептора CD4. Остановка происходит уже через 30 с после начала формирования контакта. Другое условие сближения клеток состоит в особом перераспределении мембранных молекул, которое достигается как в результате поляризации клеток, так и под влиянием событий, связанных с самим контактом. Прежде всего происходит сортировка молекул по размеру. Крупные молекулы, такие как CD43 и CD45, мешают сближению клеток из-за своих размеров: протяженность (длина) этих молекул составляет около 40 нм, тогда как для передачи сигнала клетки должны сблизиться на расстояние 5–15 нм. Кроме того, с этими молекулами связана большая

часть отрицательного заряда клеток, определяющего их взаимное отталкивание. Благодаря перераспределению молекул гликопротеин CD43 сосредотачивается в хвостовом отделе клетки. Молекула CD45 также выводится из лидирующего участка, но лишь временно, поскольку она участвует в передаче сигнала.

В лидирующем участке сосредоточиваются молекулы адгезии: на Т-хелпере —  $\beta_2$ -интегрин LFA-1, на дендритной клетке — его рецептор ICAM-1. Формирование комплексов между этими молекулами составляет основу первичного контакта между клетками. Дополнительный вклад в этот процесс вносит взаимодействие молекул CD2 Т-хелпера и CD58 (LFA-3) дендритной клетки. Зона адгезивного взаимодействия LFA-1–ICAM-1 окружена молекулами, которым предстоит сыграть основную роль в презентации антигена: на дендритной клетке — МНС-II, содержащими распознаваемый пептид, а на Т-хелпере —  $\alpha\beta$ TCR (в начале взаимодействия он находится в хвостовой части клетки, но быстро перемещается в зону контакта).

Цель формирования зрелого синапса состоит в том, что молекулы центрального и периферического участков зоны контакта меняются местами: на Т-хелпере молекулы TCR перемещаются в центр, вытесняя молекулы LFA-1 на периферию синапса, а на дендритной клетке аналогичным образом комплексы МНС-II–пептид меняются местами с молекулами ICAM-1. При моделировании иммунного синапса с использованием вместо АПК искусственных мембран, содержащих молекулы, меченные флуоресцентными красителями, удастся визуализировать структуру иммунного синапса, поскольку его центральная и периферическая зоны окрашиваются разными флуорохромами. Наблюдаемую при этом характерную структуру обозначают как «бычий глаз» (рис. 3.86).



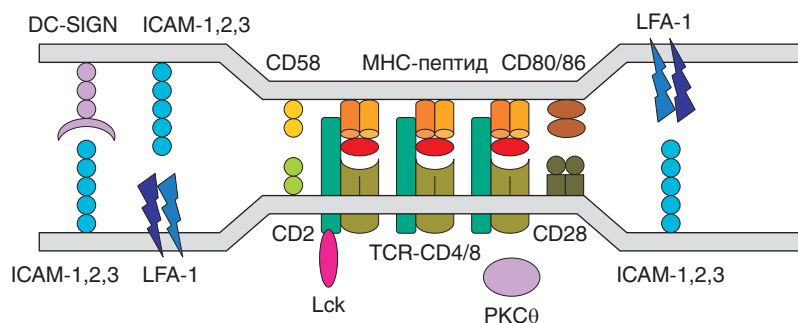
**Рис. 3.86.** Схема формирования иммунологического синапса. При распознавании Т-клеточным рецептором комплекса молекула МНС–пептид происходит перераспределение мембранных молекул: диффузное распределение сменяется иммунным синапсом, центр которого вначале занят молекулами адгезии, а затем — специфическими комплексами TCR–(МНС–пептид). Красным цветом обозначена экспрессия рецепторного комплекса TCR–CD3, синим — интегрин LFA-1

Помимо указанных перемещений созревание синапса подразумевает привлечение в центральную его часть полного набора молекул, участвующих в восприятии и передаче антигенного сигнала — корецепторов, костимулирующих молекул, связанных с мембранами киназ и адапторных белков. Важная роль в перераспределении молекул в зоне формирования иммунного синапса принадлежит рафтам. Рафтами (от англ. *raft* — плот) называют нерастворимые в детергентах субъединицы (микродомены) мембраны, обогащенные холестерином и сфинголипидами. Только некоторые мембранные белки включены в состав рафтов и перемещаются по мембране вместе с ними. К этим белкам на поверхности Т-хелперов принадлежат корецепторы CD4 и CD8, тирозинкиназа Lck (ассоциирована с CD4 и CD8), костимулирующие молекулы (включая CD28), адапторный белок LAT, тирозинкиназа ZAP-70, PLC $\gamma$ , PI $_3$ K, а также тирозинфосфатаза CD45, возвращающаяся в зону контакта после предварительного удаления из нее. В дендритных клетках в состав рафтов входят молекулы MHC-II и костимулирующие молекулы CD80/86.

В то же время молекулярный комплекс, который является ключевым в рассматриваемом процессе — TCR — в покоящихся Т-клетках с рафтами не связан. Его вовлечение в иммунный синапс обусловлено формированием нековалентной связи между TCR и CD4, вследствие чего CD4 как бы втягивает рецептор в рафт и тем самым обеспечивает его включение в состав иммунного синапса. В состав рафтов входят также изоформа  $\theta$  протеинкиназы C, вовлекаемая в рафты благодаря установлению связей с другими звеньями сигнального пути. Накопление этой молекулы в иммунном синапсе рассматривают как проявление его «зрелости».

В конечном счете на малых участках поверхности Т-хелпера и дендритной клетки, обращенных друг к другу, концентрируются практически все комплексы MHC-II–пептид, а также значительная часть молекул TCR, CD4, костимулирующих и сигнальных молекул, необходимых для активации Т-хелпера (рис. 3.87). Признаки зрелости синапса можно зарегистрировать уже через 5 мин, но максимальная плотность молекул, участвующих в презентации антигена, достигается через 10–20 мин.

Сродство TCR к комплексу MHC-II–пептид очень невелико:  $K_d$  взаимодействия этих молекул составляет  $10^{-4}$ – $10^{-6}$  М. Вовлечение в распознавание



**Рис. 3.87.** Структура иммунного синапса: детализированное изображение зрелого иммунного синапса

корцептора CD4 повышает эту величину на 2 порядка (т.е. до  $10^{-6}$ – $10^{-8}$  М), что все равно не делает ее достаточно высокой. Как уже упоминалось, для индукции активации необходимо вовлечение 200–500 пар молекул, в то время как число молекул МНС, несущих «нужный» (т.е. распознаваемый данным TCR) пептид, составляет менее 100. Благодаря концентрации молекул МНС, несущих специфических пептид, в зоне синапса на площади около  $0,45 \text{ мкм}^2$  (при объеме  $10^{-18}$  л), плотность комплексов TCR–(МНС–пептид) составляет 100–350 на  $1 \text{ мкм}^2$ . Аккумуляция комплексов в иммунном синапсе тем больше, чем выше сродство пептида к TCR. Высокая плотность комплексов способствует повышению эффективности распознавания. Другая важная характеристика синапса — время полужизни комплексов TCR–(МНС–пептид), зависящее от сродства пептида к молекуле МНС-II. Если пептид, связанный с МНС, является сильным агонистом, время полужизни комплекса составляет 10 с и больше, тогда как аналогичное время для комплексов, содержащих слабый агонист, составляет меньше 10 с.

Однако наиболее важно для повышения эффективности презентации то, что каждый комплекс МНС-II–пептид (т.е. лимитирующий компонент презентации) может распознаваться молекулами TCR повторно. После довольно продолжительного взаимодействия TCR и комплекса МНС–пептид, необходимого для завершения фосфорилирования  $\zeta$ -цепи рецептора и передачи сигнала в клетку, молекула TCR интернализуется (поглощается клеткой), а на ее место поступает другая молекула TCR, и все события повторяются. Показана возможность взаимодействия одного комплекса МНС-II–пептид с 200 молекулами TCR за 1 ч. Одна из функций иммунного синапса состоит как раз в обеспечении серийного распознавания комплексов МНС–пептид и продолжительной (до 20 ч при активации наивных Т-клеток и только 1 ч — при активации Т-клеток памяти) передачи сигнала, необходимой для активации Т-хелперов.

Так, запуск комплекса механизмов, реализуемых на уровне целого организма (улавливание клонов Т-клеток в региональном лимфоузле) и на уровне клетки (перераспределение мембранных молекул взаимодействующих клеток с формированием иммунного синапса), позволяет преодолеть трудности, возникающие на пути эффективной презентации антигена Т-клеткам.

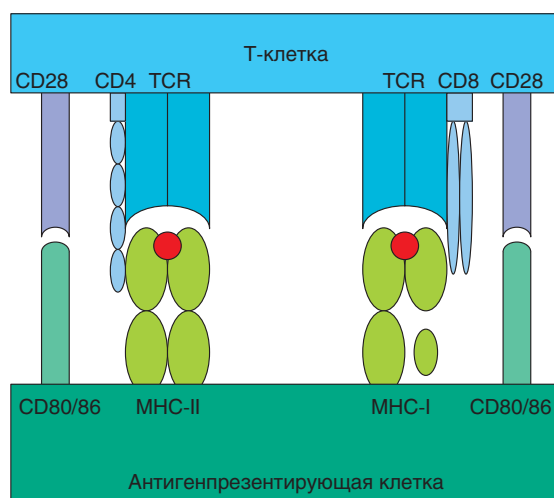
Описанный выше процесс презентации антигена дендритными клетками Т-хелперам можно рассматривать как прототип разнообразных аналогичных процессов, реализуемых на разных этапах иммунного ответа. Те же закономерности лежат в основе презентации антигена дендритными клетками цитотоксическим Т-лимфоцитам с той разницей, что презентируемый антигенный пептид образует комплекс не с МНС-II, а с МНС-I и в качестве корцептора выступает не CD4, а CD8. Аналогичным образом осуществляется презентация антигенных пептидов Т-клеткам макрофагами и В-лимфоцитами в ходе иммунного ответа. Но в этом взаимодействии принимают участие не наивные, а преактивированные Т-клетки, что несколько упрощает процедуру формирования иммунного синапса и генерации активационных сигналов. Наконец, определенные события презентации реализуются при взаимодействии цитотоксических лимфоцитов с клетками-мишенями. Тем не менее, в наиболее полной, классической форме

межклеточное взаимодействие рассматриваемого типа проявляется именно при презентации антигена дендритными клетками наивным  $CD4^+$  Т-лимфоцитам.

### 3.5.1.3. Костимуляция

Помимо антигенраспознающего рецептора и корецепторов на поверхности Т-лимфоцита присутствуют костимулирующие молекулы. Если корецептор служит как бы дополнением рецептора и действует с ним как единой целое, запуская определенные сигнальные пути, то костимулирующие молекулы действуют независимо, хотя их действие в конечном счете направлено на усиление сигнала, поставляемого рецептором/корецептором. На поверхности АПК также представлены костимулирующие молекулы, которые взаимодействуют с костимулирующими молекулами Т-клеток. Костимуляция Т-клеток — обязательный компонент презентации антигена и условие их эффективной активации (рис. 3.88). Презентация антигена без костимуляции приводит к развитию анергии Т-клеток.

Известно несколько пар костимулирующих молекул, участвующих в презентации антигена (табл. 3.24, рис. 3.89). Одна из молекул каждой пары представлена на поверхности Т-лимфоцита, а другая экспрессируется АПК. Взаимное распознавание этих молекул служит источником вспомогательных сигналов, имеющих определенную направленность — чаще от дендритной клетки к Т-хелперу (для усиления сигнала, поступающего от TCR), но иногда — от Т-лимфоцита к АПК. Система костимулирующих молекул строго организована и имеет ряд характерных особенностей. Так, в каждой паре взаимодействующих молекул одна является конститутивной, т.е. спонтанно экспрессируется на покоеющихся клетках, а вторая индуцируется при

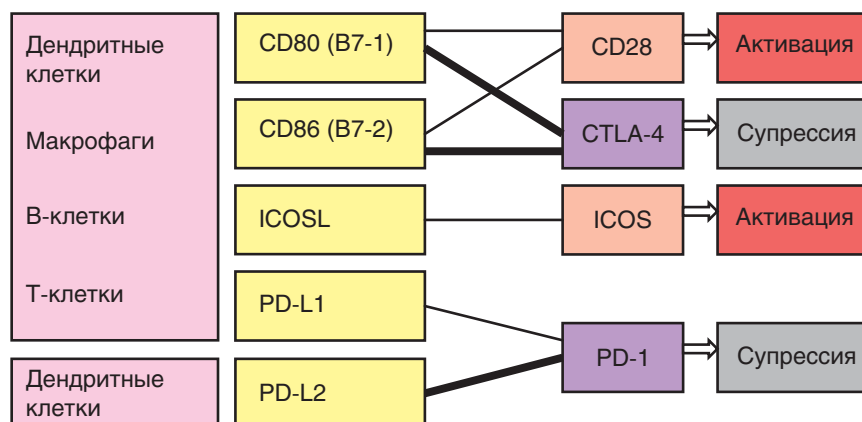


**Рис. 3.88.** Схема презентации антигена. Представлены все основные пары молекул, участвующие в презентации — молекулы МНС, несущие антигенный пептид, и TCR, распознающий их с участием корецепторов (CD4, CD8), а также костимулирующие молекулы В7 (CD80/CD86) и CD28

активации клетки (иногда это экспрессия *de novo*, иногда усиление исходно слабой экспрессии). Сигналом для экспрессии зачастую служит взаимодействие другой пары костимулирующих молекул. Для некоторых пар костимулирующих молекул характерна избыточность: костимулирующую функцию выполняет не одна, а две или более молекул со сходными, хотя и не полностью идентичными функциями. Наконец, на одной клетке могут экспрессироваться лиганды одних и тех же костимулирующих молекул, включающие противоположные по эффекту (усиливающий и супрессорный) сигналы.

**Таблица 3.24.** Костимулирующие молекулы, участвующие в презентации антигена

Название	Семейство, молекулярная масса	Локализация на клетках	Лиганд (на АПК)	Сигнальный мотив / связывающий мотив лиганда	Эффект от передачи сигнала в клетку
CD28	Суперсемейство иммуноглобулинов, 44 кДа	Т-клетки	B7-1 (CD80), B7-2 (CD86)	YXXM/ MYPPPY	Костимуляция, секреция IL-2
CTLA-4	Суперсемейство иммуноглобулинов, 33–37 кДа	Активированные Т-клетки	B7-1 (CD80), B7-2 (CD86)	YXXM/ MYPPPY	Подавление активности Т-клеток
ICOS	Суперсемейство иммуноглобулинов	Активированные Т-клетки (Th2>Th1), NK-клетки	ICOSL	YXXM/ FDPPPF	Костимуляция, секреция цитокинов (Th2>Th1)
PD-1	Суперсемейство иммуноглобулинов	Активированные Т-клетки, активированные В-клетки, макрофаги	PD-L1	ITIM	Подавление развития и активности Т-клеток
BTLA	Суперсемейство иммуноглобулинов	Активированные Т-клетки (Th1>Th2), В-клетки	B7-H4	2 ITIM	Подавление активации Т-клеток (Th1>Th2)
CD154 (CD40L)	TNF, 34–39 кДа	Активированные Т-клетки, NK-клетки, В-клетки, тучные клетки, базофилы и эозинофилы	CD40	Нет данных	Костимуляция



**Рис. 3.89.** Костимулирующие молекулы-лиганды семейства B7, их локализация и рецепторы, с которыми они взаимодействуют. Линии различной толщины символизируют родство костимулирующих молекул. Стрелки справа указывают на развитие конечного эффекта этого взаимодействия

Наиболее известная и важная система костимуляции — передача в Т-хелпер сигнала через молекулу CD28, в результате ее взаимодействия с молекулами CD80 и/или CD86, расположенными на поверхности АПК. CD28 — гомодимерная трансмембранная молекула. Внеклеточная часть каждой цепи содержит домен суперсемейства иммуноглобулинов (V-домен), а также спейсерный (соединительный) участок. В ее внутриклеточной части есть сайт взаимодействия с липидной киназой  $PI_3K$ . CD28 спонтанно экспрессируется на большинстве (около 80%) Т-клеток. Лиганды молекулы CD28 — две сходные по структуре молекулы — CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2). Эти молекулы имеют между собой высокую гомологию и образованы двумя доменами суперсемейства иммуноглобулинов (один — V-, другой — C-типа). Они не экспрессируются (CD80) или слабо экспрессируются (CD86) на поверхности покоящихся дендритных и других АПК. Сигналом к индукции или усилению их экспрессии служит взаимодействие другой пары костимулирующих молекул — CD40—CD154, которая будет описана ниже. Максимальную экспрессию молекулы CD86 наблюдают через 2 сут, а CD80 — через 4–5 сут после иммунизации, из чего следует, что молекула CD86 в большей степени, чем CD80, отвечает за костимуляцию на ранних этапах презентации антигена. Взаимодействие CD28 и CD80/86 происходит за счет взаимного связывания N-концевых частей их V-подобных доменов с участием мотива MYPPPY молекулы CD28. В результате взаимодействия происходит усиление активирующего сигнала, исходящего от рецепторного комплекса TCR—CD3, что и обозначают термином «костимуляция». Через CD28 в Т-клетки поступают сигналы, необходимые для поддержания их жизнеспособности, усиления адгезии и выработки цитокинов, особенно IL-2. Участие молекулы CD28 в презентации антигена сокращает число взаимодействий TCR—(МНС—пептид), необходимых для формирования активационного сигнала. При этом сокращается длительность межклеточного контакта. Как уже упоминалось, в отсутствие костимуляции передача сигнала через рецептор не только не

приводит к активации Т-клеток, но и вызывает противоположный эффект — клеточную анергию, т.е. неспособность Т-клеток и в последующем отвечать на сигналы, поставляемые через TCR. Молекулярные механизмы костимуляции будут рассмотрены ниже (см. раздел 3.4.2.1).

Взаимодействие CD28 с CD80/86 служит сигналом к экспрессии другого лиганда CD80/86 — молекулы CTLA-4 (CD152) (см. рис. 3.89), название который означает: «молекула 1 активации цитотоксических лимфоцитов» (*Cytotoxic T lymphocyte activation molecule 1*), что связано с первоначальным обнаружением ее на активированных цитотоксических Т-клетках. Т-хелперы экспрессируют CTLA-4 вскоре после начала костимуляции, но вначале эта молекула находится внутри клетки и только через 48–72 ч появляется на ее поверхности в зоне иммунного синапса. Молекулы CTLA-4 и CD28 гомологичны (30% гомологии), но CTLA-4 обладает в 1000–2500 раз более высоким сродством к CD80/86, причем его специфичность также обусловлена мотивом MYPPPY. Главная особенность связывания CTLA-4 состоит в том, что он поставляет не костимулирующий, а ингибирующий сигнал. Учитывая более высокое сродство CTLA-4, чем CD28 к CD80/86, становится очевидно, что функция CTLA-4 состоит в завершении цепи активационных событий. Экспрессируемая при активации Т-клетки молекула CTLA-4 вовлекается в иммунный синапс, и осуществляемая через нее передача сигнала служит последним событием, реализуемым в иммунном синапсе, после чего он прекращает свое существование.

Описаны дополнительные пути костимуляции, обусловленные взаимодействием пар молекул ICOS (*Inducible costimulator* — индуцибельный костимулятор) и ICOS-L (L — лиганд), а также OX40 и OX40L. В обоих парах на первом месте указана молекула-рецептор, экспрессируемая Т-хелпером, а на втором — ее лиганд, экспрессируемый на АПК. Молекулы ICOS и OX40 передают в Т-клетку костимулирующие сигналы. Супрессорные аналоги костимулирующих молекул участвуют в регуляции активности Т-клеток и индукции толерантности.

Другую группу костимулирующих молекул образуют мембранные молекулы CD40 и CD40L (CD154). CD40 конститутивно экспрессируется на АПК. Эту молекулу относят к семейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNF) (см. табл. 2.30). Она имеет 4 внеклеточных домена с 6 остатками цистеина, но не содержит домена смерти, характерного для многих представителей этого семейства. CD154 — трансмембранная молекула типа II (ее N-конец направлен внутрь клетки). Внеклеточный домен этой молекулы принадлежит к семейству TNF: он образован 8 антипараллельными  $\beta$ -слоями («гелевый рулет»). CD154 экспрессируют активированные Т-клетки, как правило, на 3–4-е сутки иммунного ответа. При взаимодействии CD40 с CD154 происходит тримеризация CD40, что необходимо для передачи сигнала внутрь клетки. Особенность этой пары костимулирующих молекул состоит в том, что сигнал от их взаимодействия направлен преимущественно или исключительно в сторону АПК, а не Т-лимфоцита.

Через взаимодействие CD40 с CD40L происходит активация дендритных клеток, макрофагов и В-лимфоцитов. Активация через CD40 усиливает экспрессию молекул, участвующих в презентации антигена, и стимулирует выработку цитокинов, необходимых для активации Т-клеток. Собственно хелперная функция Т-клеток в отношении В-лимфоцитов, необходимая для

осуществления гуморального иммунного ответа, реализуется именно через этот путь костимуляции.

Помимо передачи сигналов через антигенраспознающий рецептор, корецепторы и костимулирующие молекулы, для активации Т-клеток важны сигналы, поступающие через молекулы интегринов (LFA-1, VLA-4) и другие молекулы адгезии (например, CD2). Их рецепторы (ICAM-1, VCAM-1, CD58) вносят вклад в стимуляцию АПК. Благодаря избыточности молекул, поставляющих активационные сигналы, выключение каждой из них вследствие мутаций обычно не приводит к видимым последствиям. Тем не менее нокаут гена *CD28* проявляется дефектом Т-хелперов (но не цитотоксических Т-клеток), подавлением образования цитокинов, особенно IL-2 и продуктов Th2-клеток, участвующих в реализации гуморального иммунного ответа. При нокауте гена *CD40* подавлен ответ Т-клеток на белковые антигены, причем в большей степени страдает развитие Th1-клеток, отвечающих за клеточный иммунный ответ, и выработка ими IFN $\gamma$ . Известна мутация гена *CD40L*, локализованного в X-хромосоме, которая в гомозиготном состоянии служит причиной развития первичного иммунодефицитного заболевания — гипер-IgM-синдрома (см. раздел 4.7.1.5).

### 3.5.2. Активация Т-лимфоцитов

Под активацией клеток понимают их переход из состояния покоя в функционально активное состояние — макрофаги продуцируют активные формы кислорода, тучные клетки выбрасывают гранулы, мышечные клетки сокращаются и т.д. В случае лимфоцита активация также означает выход из состояния покоя ( $G_0$ ), но в несколько ином смысле: покоящийся лимфоцит находится вне клеточного цикла, а его активация означает вступление в цикл. Это последствие активации лимфоцитов глубоко функционально, поскольку любому проявлению функции лимфоцитов должно предшествовать их размножение (поскольку исходная численности клеток в каждом клоне мала). Это не относится к естественным киллерам — лимфоцитам, популяция которых не имеет клональной структуры. Активация НК-клеток не связана с пролиферацией и означает переход в состояние готовности выполнять цитотоксическую функцию.

#### 3.5.2.1. Молекулярные основы активации Т-клеток

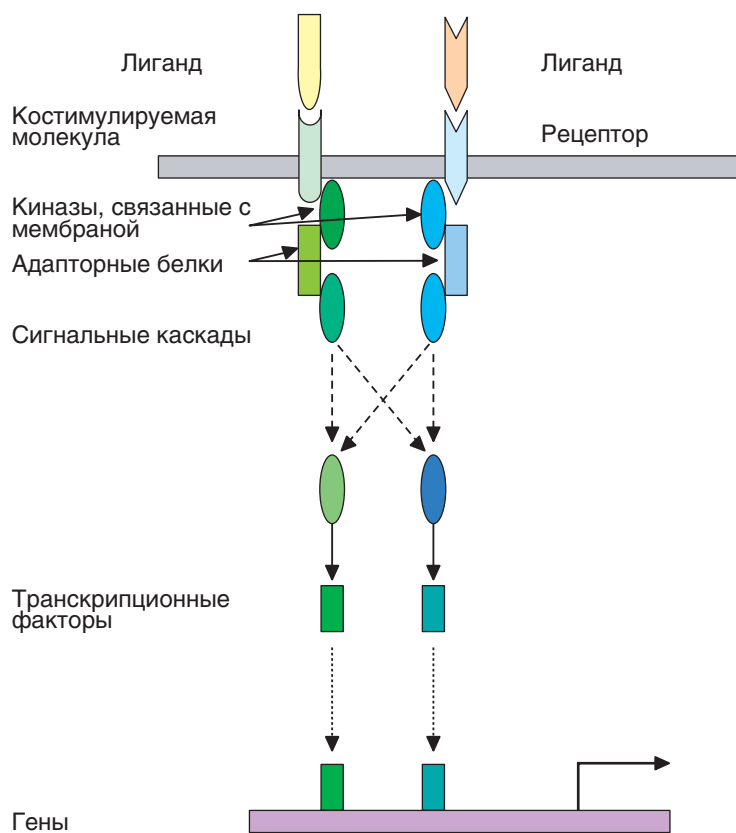
Активация клеток, в том числе лимфоцитов, всегда сопряжена с экспрессией многих генов. В случае лимфоцитов активация должна приводить прежде всего к экспрессии генов, обеспечивающих пролиферативную экспансию клона. Суть подготовки Т-клеток к пролиферации состоит прежде всего в экспрессии генов аутокринного ростового фактора — IL-2 и его рецептора, а точнее  $\alpha$ -цепи этого рецептора, обеспечивающей достижение необходимого уровня сродства к цитокину, что служит условием выполнения рецептором его функций. Оба эти гена являются индуцибельными, т.е. в покоящемся состоянии они выключены, но экспрессируются в ответ на индуцирующее воздействие. Сигнал к включению гена поступает из его регуляторного (промоторного) участка, в котором расположены сайты специфического взаимодействия с определенными белками — транскрипционными факторами. Некоторые из таких белков исходно представлены в клетке в активной форме, но большинство отсутствует и может быть синте-

зировано *de novo* или активировано путем фосфорилирования или удаления ингибирующей субъединицы. Таким образом, молекулярная основа активации — образование необходимых транскрипционных факторов, обеспечивающих включение индуцибельных генов.

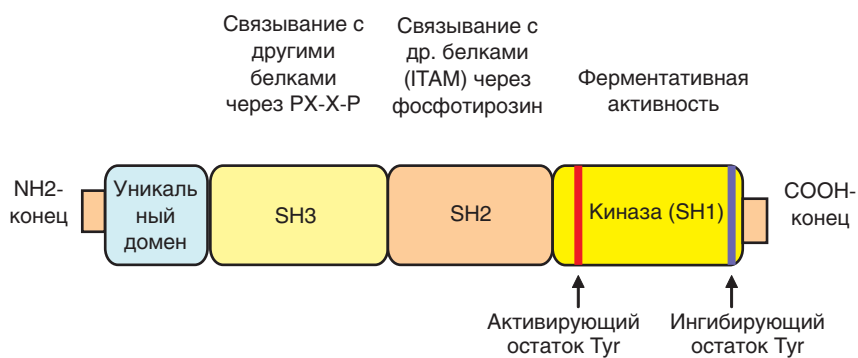
На Т-лимфоциты активирующее воздействие оказывают индукторы активации. В физиологических условиях таким индуктором служит антигенный стимул. Само по себе распознавание антигена при контакте Т-хелпера с АПК не может повлиять на активность гена в силу пространственной разобщенности мембранного рецептора и генов, локализующихся в ядре. TCR проникает внутрь клетки после связывания с антигеном, но не для того, чтобы мигрировать в ядро и повлиять на активность гена, а для того, чтобы быть расщепленным. Однако при связывании антигенного комплекса с TCR в сочетании с костимулирующим воздействием возникает сигнал, достигающий ядра и регулирующий экспрессию генов. Передача сигнала осуществляется по каскадному принципу. На разных этапах передачи сигнала ее осуществляют молекулы ферментов (главным образом, протеинкиназы, активирующие белки на каждой очередной стадии передачи сигнала), а также адапторные и ГТФ-связывающие белки. Сигнал исходно является двойственным, поскольку его передача осуществляется одновременно от TCR и CD28. Затем эти пути пересекаются и вновь разделяются на несколько ветвей. Конечный результат передачи сигнала по каждому сигнальному пути — формирование транскрипционного фактора. На рис. 3.90 представлена типовая схема внутриклеточной передачи сигнала, завершающейся формированием транскрипционных факторов и активацией генов. Для активации Т-клеток требуется формирование трех транскрипционных факторов — NF-AT, NF-κB и AP-1. Далее рассмотрим осуществление внутриклеточной передачи сигнала на примере активации Т-хелперов при распознавании презентируемого дендритными клетками антигена.

Связывание комплекса МНС-II–пептид вызывает конформационные изменения молекулы TCR и связанной с ней молекулы корецептора CD4. Пока окончательно не известно, происходит ли при этом только изменение конформации рецепторов или они олигомеризуются. Такие изменения активируют тирозинкиназы, ассоциированные с рецептором и корецептором — Lck (p56<sup>lck</sup>), связанную с CD4, и Fyn (p59<sup>fyn</sup>), связанную с CD3. Указанные тирозинкиназы называют рецепторными, или проксимальными, в связи с тем, что они непосредственно примыкают к рецептору, входя в рецепторный комплекс. Обе упомянутые киназы относят к семейству Src-киназ. Киназы этого семейства содержат домены SH1, SH2 и SH3 (SH — от *Src-homology*) (рис. 3.91). Первый домен обладает ферментативной активностью, остальные взаимодействуют с другими киназами и адапторными белками. Функция тирозинкиназ состоит в фосфорилировании по остатку тирозина белков-мишеней, что необходимо для их активации и проявления функций, в том числе ферментативных. Мишени рецепторных киназ многочисленны. К ним относят сами молекулы Fyn и Lck (что обуславливает их аутофосфорилирование), а также полипептидные цепи TCR и другие киназы. Особенно многообразны мишени киназы Lck.

Однако первоначальным условием активации рецепторных киназ является, наоборот, их дефосфорилирование, обеспечивающее пере-



**Рис. 3.90.** Принципиальная схема передачи сигналов с поверхности клетки в ядро



**Рис. 3.91.** Тирозинкиназы семейства Src. Строение, связь с антигенраспознающими рецепторами. Представлены типичное строение и доменная структура протеинкиназ

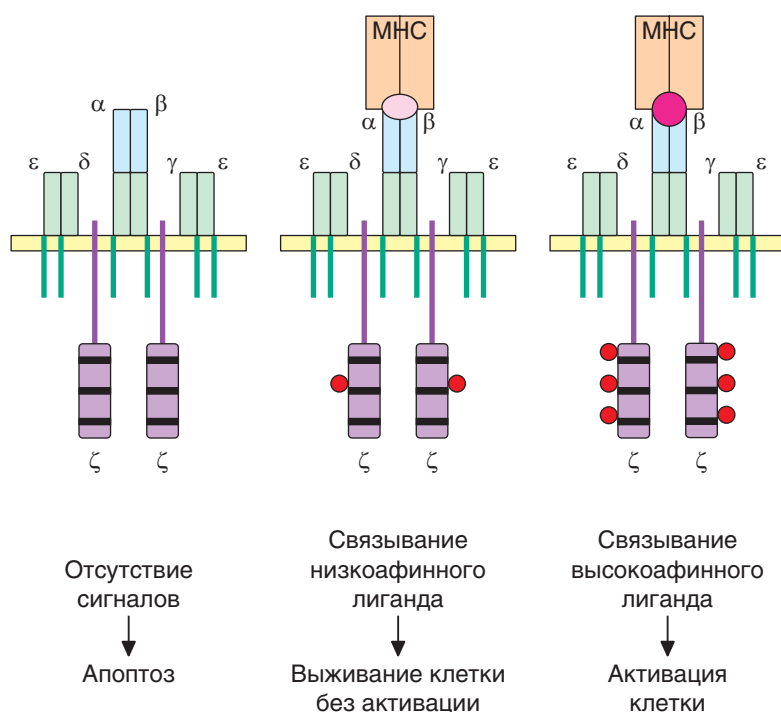
ход из гиперфосфорилированного в нормальное состояние. Дело в том, что в покоящейся клетке SH2-домен киназы Lck находится в свернутой форме вследствие фосфорилирования С-концевого остатка тирозина Y505 конститутивно активированной киназой Csk. Фосфорилированный Y505 взаимодействует с помощью фосфатной группы с остатком тирозина в SH2-домене, к которому и подтягивается С-конец молекулы. В таком виде фермент не активен, поскольку при этом не может быть фосфорилирован функционально важный остаток Y394 в домене SH1. Для снятия такой функциональной блокады необходимо дефосфорилирование с последующим разворачиванием молекулы, что осуществляется с участием тирозинфосфатаз. Основную роль в переводе рецепторных киназ в «рабочее» состояние выполняет молекула CD45, цитоплазматический домен которой обладает активностью тирозинфосфатазы. Ранее уже упоминалось, что эта крупная молекула, препятствующая формированию тесного контакта между дендритной клеткой и Т-хелпером, вначале удаляется из зоны иммунного синапса, а затем часть молекул возвращается в эту зону для выполнения своей функции — дефосфорилирования молекул рецепторных тирозинкиназ. После того как остаток Y394 становится доступным для фосфорилирования, Lck может проявлять активность тирозинкиназы.

В генерации сигналов, передаваемых от полипептидных цепей комплекса TCR–CD3, наиболее важно наличие в цитоплазматическом участке  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\varepsilon$ - и  $\zeta$ -цепей активационной последовательности ITAM, о которой уже неоднократно упоминалось. Структура этого мотива такова: YXXI/L/VX(6–8)YXXI/L/V (где Y — тирозин, X — любой остаток, I/L/V — изолейцин, лейцин или валин) (рис. 3.92). Фосфорилирование остатков тирозина

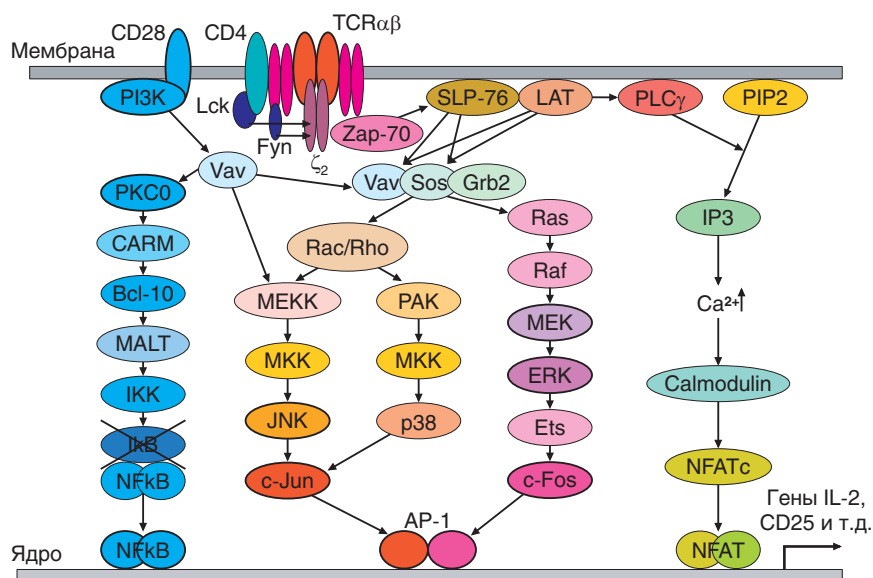
<p>ITAM (<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>) Y-XX-I/L-X(6-12)-Y-XX-I/L</p> <p>Фосфорилируется по тирозину (Y) Src-киназами (Lck, Fyn, Lyn, Blk)</p> <p>Рекрутирует Syk-киназы (ZAP-70, Syk)</p> <p>Локализуются во внутриклеточной части полипептидных цепей TCR (<math>\gamma, \delta, \varepsilon, \zeta</math>), BCR (<math>Ig\alpha, Ig\beta</math>), FcR и т.д.</p> <p>Обуславливает способность иммунорецептора включать активацию клетки</p>	<p>ITIM (<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>) I/V/L/S-X-Y-XX-L</p> <p>Фосфорилируется по тирозину (Y) Src-киназами (Lck, Fyn, Lyn, Blk)</p> <p>Рекрутирует фосфатазы SHP1, SHP2, SHIP</p> <p>Локализуются во внутриклеточной части молекул KIR, CD94/NKG2A, Fc<math>\gamma</math>RIIB, CD22, CD72 и т.д.</p> <p>Обуславливает способность иммунорецептора подавлять активацию клетки</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Рис. 3.92. Сопоставление характеристик активационных и ингибирующих мотивов (ITAM и ITIM)

в ИТАМ делает этот участок доступным для распознавания аналогичными участками сигнальных молекул, расположенных более дистально. Среди полипептидных цепей TCR наиболее важна для передачи сигнала  $\zeta$ -цепь. В отличие от  $\gamma$ -,  $\delta$ - и  $\epsilon$ -цепей TCR, имеющих по одному участку ИТАМ, в цитоплазматической части  $\zeta$ -цепи расположены 3 последовательности ИТАМ, предназначенные для взаимодействия с остатками тирозина тирозинкиназы ZAP-70 (от  *$\zeta$ -associated protein* —  $\zeta$ -ассоциированный белок; масса 70 кДа) — ключевого фактора в передаче сигнала от TCR при его связывании с лигандом. Фосфорилирование  $\zeta$ -цепи является наиболее ответственным и в то же время наиболее уязвимым этапом активации Т-клеток. Полагают, что именно для обеспечения фосфорилирования всех мотивов ИТАМ этой молекулы необходимо длительное поддержание контакта Т-лимфоцитов и дендритных клеток. В  $\zeta$ -цепи покоящейся Т-клетки фосфорилирован 1 остаток тирозина; отсутствие фосфорилирования приводит к развитию апоптоза (рис. 3.93). После взаимодействия  $\zeta$ -цепи и ZAP-киназы запус-



**Рис. 3.93.** Фосфорилирование ИТАМ в  $\zeta$ -цепи Т-клеток при гомеостатических процессах и иммунном ответе. Три участка ИТАМ  $\zeta$ -цепи обязательно должны быть в той или иной степени фосфорилированы, в противном случае клетка подвергается апоптозу. Для поддержания жизнеспособности с участием гомеостатических факторов (см. рис. 3.80) необходимо фосфорилирование одного мотива ИТАМ. Для активации Т-клетки требуется фосфорилирование всех 3 мотивов ИТАМ. Условные обозначения: черные полоски на изображениях цитоплазматической части  $\zeta$ -цепей — ИТАМ, красные кружки около них означают наличие фосфатной группы



**Рис. 3.94.** Схема сигнальных путей при активации Т-клеток. Распознавание комплекса молекулы МНС с антигенным эпитопом в сочетании с коstimуляцией индуцирует запуск сигналов, передаваемых в ядро с помощью 5 каскадов, обеспечивающих формирование 3 транскрипционных факторов, необходимых для активации клетки. Жирным контуром обведены факторы, для которых показана высокая степень зависимости от коstimуляции

кается полномасштабный процесс в виде нескольких параллельных путей передачи активационного сигнала (рис. 3.94).

Молекулу ZAP-70 относят к тирозинкиназам семейства Syk. Она содержит тандем из двух SH2-доменов. Условие ее взаимодействия с  $\zeta$ -цепью — предварительное фосфорилирование остатков тирозина в ITAM  $\zeta$ -цепи. После фосфорилирования 2-й остаток тирозина в мотивах ITAM  $\zeta$ -цепи взаимодействует с тирозином SH2-доменов киназы ZAP-70. В результате фосфатная группа тирозина  $\zeta$ -цепи становится общей с тирозином SH2-домена молекулы ZAP-70. За этим следует фосфорилирование остатков тирозина в ферментативном домене молекулы ZAP-70, осуществляемое тирозинкиназами Lck и, возможно, Fyn, что приводит к включению ферментативной (киназной) активности молекулы.

Дальнейшая передача сигнала обусловлена взаимодействием ZAP-70 с ее главным субстратом — адапторным белком LAT (от *Linker for activation of T-cells* — линкер активации Т-клеток). Этот белок связан с мембраной и входит в состав рафтов. После катализируемого ZAP-70 фосфорилирования LAT приобретает способность связывать сигнальные молекулы, участвующие в дальнейшей передаче сигнала: адапторные белки SLP-76, Grb2, фактор Vav, а также ферменты — PLC $\gamma$ 1 и PI $_3$ K. Активация некоторых из упомянутых белков зависит от LAT не напрямую, а косвенно. Так, через SH3-домены

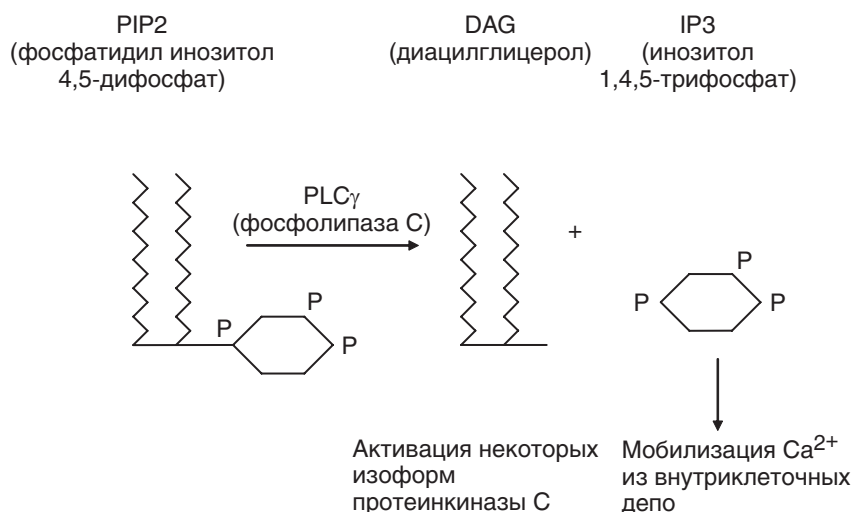
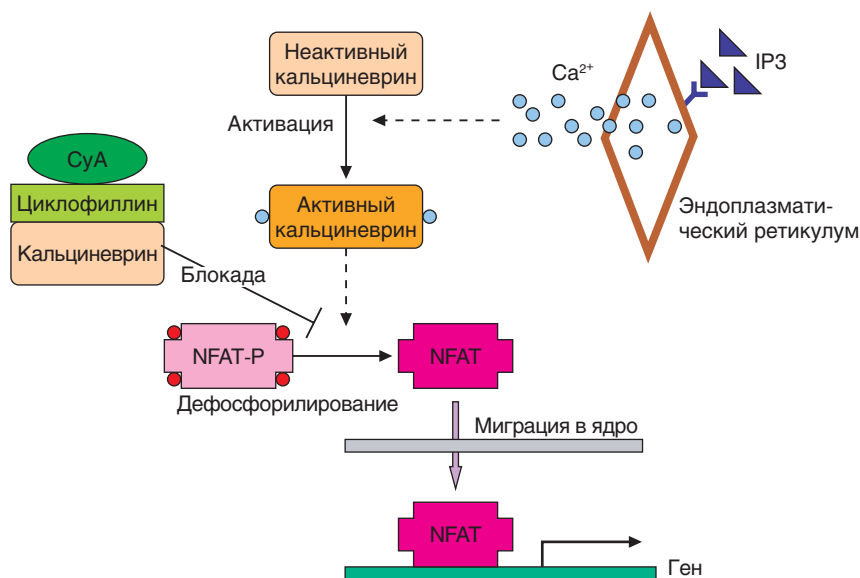


Рис. 3.95. Образование сигнальных метаболитов фосфоинозитидов

адапторных белков семейства Grb2 к сигнальному пути подсоединяются факторы SLP-76 и Sos. SLP-76, в свою очередь, опосредует подключение к сигнальному пути PLC<sub>γ</sub>1 и ГТФазы Ras. Активация PLC<sub>γ</sub>1 происходит с участием тирозинкиназы Itk, относящейся к семейству Btk — третьему (после Src и Syk) семейству тирозинкиназ, участвующих во внутриклеточной передаче сигнала при активации лимфоцитов. Все сигнальные факторы, вовлекаемые в процесс активации с прямым и косвенным участием LAT, рекрутируются в состав клеточной мембраны и взаимодействуют с ее фосфоинозитидными компонентами. Комплекс, образуемый при взаимодействии SLP-76, Vav и Nck, реагирует с белками цитоскелета PAK и WASP, служащими медиаторами перестройки в цитоскелете активируемых клеток.

Активированная PLC<sub>γ</sub>1 катализирует расщепление фосфатидилинозитола 4,5-бисфосфата с образованием диацилглицерола (DAG), который остается связанным с мембраной, и инозитол-1,4,5-трифосфата (рис. 3.95). Инозитол трифосфат поступает в цитоплазму и взаимодействует с рецепторами на поверхности эндоплазматического ретикулума, что обуславливает выход ионов Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных хранилищ. Опустошение последних вызывает открытие Ca<sup>2+</sup>-зависимых каналов в клеточной мембране, через которые в клетку поступают ионы Ca<sup>2+</sup> из внеклеточного пространства. В результате возрастает концентрация свободных ионов Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме клетки. Ионы Ca<sup>2+</sup> активируют фосфатазу кальциневрин, дефосфорилирующую цитоплазматический компонент транскрипционного фактора NF-AT (*Nuclear factor of activated T-cells* — ядерный фактор активированных Т-клеток) (рис. 3.96). Это обуславливает перемещение фактора в ядро, взаимодействие с ядерным компонентом и формирование зрелой формы молекулы NF-AT, способной взаимодействовать с ДНК в промоторных участках генов, вовлеченных в активацию Т-клеток (*IL2*, *IL2R* и др.).

Диацилглицерол традиционно рассматривали как фактор, активирующий протеинкиназу С (РКС) — уже не раз упоминавшуюся ранее серин/тре-



**Рис. 3.96.**  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое звено активации Т-клеток и его блокада циклоспорином А. Зависимый от инозитолтрифосфата сигнальный путь приводит к мобилизации в ядро транскрипционного фактора NF-AT. Этот путь может быть блокирован циклоспорином А, способным в комплексе с циклофиллином инактивировать фосфатазу кальциневрин, ответственную за дефосфорилирование цитоплазматического фактора NF-AT (что служит условием его миграции в ядро)

ониновую киназу, признаваемую одним из ключевых факторов активации Т-клеток. Однако оказалось, что изоформы PKC, активируемые диацилглицеролом, не имеют отношения к активации Т-клеток. В ней участвует изоформа  $\theta$  PKC, появляющаяся в иммунном синапсе на пике его «зрелости». Ее рекрутирование в иммунный синапс зависит от активности  $\text{PI}_3\text{K}$  и Vav (последний фактор связан с цитоскелетом, роль которого в транспорте PKC $\theta$  очень важна). Поскольку активация Vav зависит от сигнализации не только через TCR, но и через CD28, а CD28-зависимый путь реализуется с участием  $\text{PI}_3\text{K}$  (она ассоциирована с CD28 — см. далее), становится очевидным, что  $\text{PI}_3\text{K}$  и Vav представляют различные этапы одного сигнального пути и, таким образом, вовлечение в активацию молекулы PKC $\theta$  зависит от костимуляции через CD28. При этом не вызывает сомнений роль в активации PKC $\theta$  сигналов, поступающих от TCR, поскольку PKC $\theta$  фосфорилируется (и, следовательно, активируется) киназой Lck. Допускают участие в активации PKC $\theta$  и других факторов, в том числе диацилглицерола, но эти влияния второстепенны. Активация PKC $\theta$  необходима для предотвращения апоптоза активируемых клеток и включения двух из трех критических транскрипционных факторов, необходимых для экспрессии генов *IL2* и *IL2R* — AP-1 и NF- $\kappa\text{B}$ . PKC $\theta$ -зависимая активация AP-1 реализуется через Ras/JNK-ветвь MAP-каскада (о нем будет сказано далее). Путь, приводящий к активации транскрипционного фактора NF- $\kappa\text{B}$ , содержит в качестве

промежуточных звеньев последовательно активируемые (с участием РКС $\theta$ ) факторы CARMA-1, Bcl-10 и MALT-1, ИКК. ИКК фосфорилирует ингибирующую субъединицу NF- $\kappa$ B — I $\kappa$ B, придавая ей способность к связыванию убиквитина, что предопределяет ее последующую деградацию. При этом освобождается активная субъединица NF- $\kappa$ B, мигрирующая в ядро и выступающая в роли транскрипционного фактора — одного из трех, необходимых для экспрессии генов активации Т-клеток. Транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B, играющий ключевую роль при активации клеток врожденного иммунитета, был рассмотрен выше (см. раздел 2.2.4).

Столь же широко при активации клеток используется еще один сигнальный путь, запускаемый при активации Т-лимфоцитов — MAP-каскад, или MAP-модуль (от *Mitogen-activated kinases* — киназы, активированные митогеном). Его роль состоит главным образом в индукции транскрипционного фактора AP-1 (димера c-jun/c-fos). Существует 3 ветви этого каскада, приводящие к образованию трех типов MAP-киназ (MAPK) — ERK1/ERK2 (от *Extracellular signal-regulated kinases* — киназы, регулируемые внеклеточными сигналами), p38 и JNK (от *c-Jun NH2-terminal kinases* — c-Jun NH2-концевые киназы). Каскады, приводящие к активации MAP-киназ, включают с участием адапторных белков и низкомолекулярных ГТФаз. Один из адапторных белков — Grb2 (*Growth factor receptor bound protein 2*), активируется при взаимодействии с фактором LAT. Активированный Grb2 спонтанно связывается с другим LAT-активированным белком SLP-76 и фактором Sos (от *Son of sevenless*). Sos представляет фактор замещения гуаниннуклеотидов: он обуславливает замещение ГДФ на ГТФ в составе малых G-белков (т.е. белков, связывающих гуаниннуклеотиды). Поэтому комплекс SLP-76/Grb2/Sos обуславливает активацию G-белка Ras, превращая связанный с ним ГДФ в ГТФ. Ras-ГТФ активирует серин/треониновую киназу Raf (киназу киназы MAP-киназы — МККК). Далее следует каскад реакций: Raf активирует MEK (киназу MAP-киназы — МКК), а MEK активирует вышеупомянутые MAP-киназы ERK1 и ERK2. Активацию JNK-ветви MAP-каскада инициирует упоминавшийся выше фактор Vav (зависимый от LAT и связанный с активацией цитоскелета, а также РКС $\theta$ , см. выше). Он вызывает переход ГДФ в ГТФ в комплексе с G-белком Rac (семейство Rho). Rac-ГТФ активирует киназу MEKK (выступающую в роли МККК), она активирует киназу JNKK (МКК), которая, в свою очередь, активирует MAP-киназу JNK. Третий путь MAP-модуля, приводящий к образованию MAP-киназы p38, также зависит от G-белков семейства Rho. Он аналогичен по общей схеме двум другим путям, но изучен менее детально.

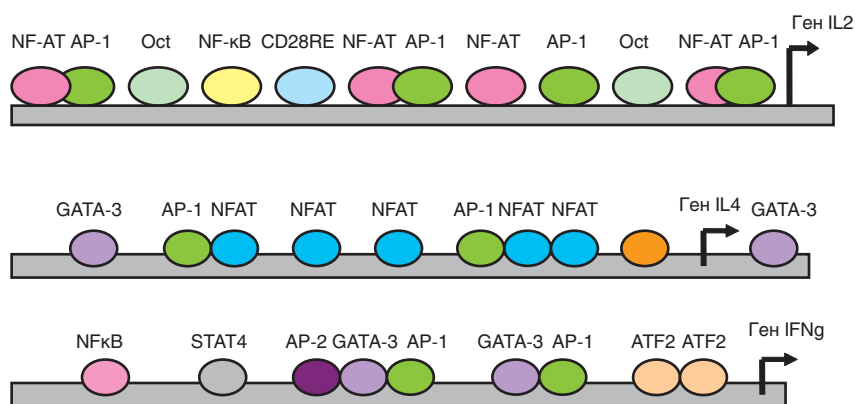
Активация MAP-киназ ERK1/ERK2, JNK и p38 осуществляется путем фосфорилирования остатков треонина и тирозина в мотиве TXY, причем роль X в трех типах киназ выполняют различные остатки (соответственно Glu, Pro и Gly). Названные MAP-киназы обуславливают формирование транскрипционных факторов, участвующих во многих клеточных процессах. ERK1/ERK2 обуславливает образование транскрипционных факторов AP-1 и Elk-1, JNK — факторов ATF2, Elk-1 и c-Jun (компонент AP-1), p38 — факторов ATF2, Elk-1 и MEF-2C.

Запуск рассмотренных выше сигнальных путей при активации Т-клеток происходит при параллельном связывании TCR и костимуляции через моле-

кулу CD28. Дифференцирование сигнальных путей, включаемых через эти мембранные молекулы, а также расшифровка взаимодействия этих путей до конца не завершены. Однако общая картина проявляется достаточно четко, чтобы в общих чертах понять молекулярные основы костимуляции. При связывании TCR, координированном со связыванием корцептора, происходит изменение конформации комплекса TCR–CD3, CD4 вызывает активацию рецепторных тирозинкиназ Fyn и Lck, а также фосфатазы CD45. Конечный результат «проксимальных» событий — фосфорилирование  $\zeta$ -цепи рецепторного комплекса и передача активационного сигнала на киназу ZAP-70. Далее с участием адапторных белков LAT, SLP-76 и Vav область, вовлеченная в передачу сигнала, существенно расширяется, включая мембранно-связанные киназы, цитоскелет и малые G-белки. Сигнальный путь, приводящий (через активацию PLC $\gamma$ 1, образование инозитолтрифосфата и активацию кальциневрина) к мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  и активации транскрипционного фактора NF-AT, по-видимому, реализуется без прямого участия сигналов, генерируемых при костимуляции. Другие пути в большей или меньшей степени зависят от костимулирующего сигнала.

Наиболее прямое следствие костимуляции через CD28 — активация мембранного фермента PI $_3$ K, физически связанного с молекулой CD28. Этот фермент катализирует образование фосфатидилинозитол 4, 5-бифосфата, служащего источником инозитолтрифосфата. Однако это событие напрямую не связано с активацией и может рассматриваться как подготовительное. При активации клетки фосфатидилинозитолтрифосфат активирует Vav — узловой фактор, ответственный за вовлечение в процесс активации цитоскелета и участвующий в рекрутировании и активации протеинкиназы PKC $\theta$ . Этот фермент важен для функционирования сигнального пути, приводящего к формированию транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B и AP-1. В обоих случаях роль PKC $\theta$  в наибольшей степени проявляется во включении Rac/JNK-ветви MAP-каскада. Raf/ERK- и Rac/p38-ветви MAP-каскада в меньшей степени зависят от PKC $\theta$ , а следовательно, от костимуляции. Таким образом, молекулярная основа костимуляции — вовлечение в процесс активации Т-хелпера сигнальных путей, реализуемых с участием трех ключевых факторов — PI $_3$ K, фактора Vav и изоформы  $\theta$  протеинкиназы C. Из трех ключевых транскрипционных факторов, запускающих гены активации Т-клеток, экспрессия двух (AP-1 и NF- $\kappa$ B) зависит от костимуляции и только для выработки NF-AT непосредственно костимуляция не требуется.

Таким образом, в результате в Т-клетке формируется 3 транскрипционных фактора — NF-AT, NF- $\kappa$ B AP-1. Формирование этих факторов происходит различными путями. Активный NF-AT образуется в результате сборки димера, включающего цитоплазматический и ядерный субкомпоненты NF-AT — NF-ATc и NF-ATn. Если NF-ATn — конститутивный фактор, всегда присутствующий в ядре Т-клетки, NF-ATc должен быть активирован для миграции в ядро, что достигается его дефосфорилированием, катализируемым кальциневрином (см. выше). Транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B активируется путем отщепления от комплекса I $\kappa$ B–NF- $\kappa$ B ингибирующей субъединицы I $\kappa$ B. Как уже говорилось выше, это происходит при фосфорилировании I $\kappa$ B киназой IKK, активируемой с участием PKC $\theta$ . Фосфорилированная субъединица становится доступной для деградации



**Рис. 3.97.** Схема расположения связывающих участков для ядерных факторов в промоторах генов IL2, IL4 и IFNg

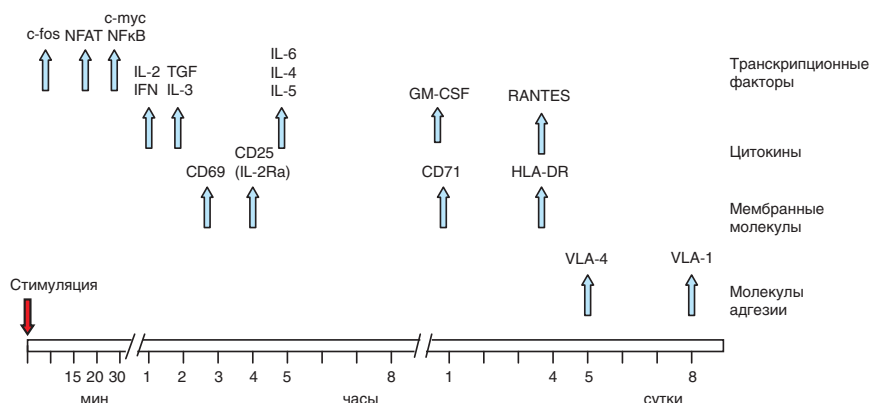
по убиквитиновому пути. Фактор AP-1 — димер белковых продуктов двух индуцибельных протоонкогенов — *c-fos* и *c-jun*. Для экспрессии этих генов и синтеза белков необходимы соответствующие транскрипционные факторы, а именно Elk-1 (для *c-fos*) и JNK (для *c-jun*). Как уже было указано выше, Elk-1 и JNK — конечные продукты деятельности различных ветвей MAP-каскада. Синтезируемые *de novo* белки *c-fos* и *c-jun* образуют гомо- и гетеродимеры, формирующие транскрипционный фактор AP-1.

Рассмотренные три фактора (NF-AT, NF-κB и AP-1) нужны для индукции генов активации Т-клеток — в первую очередь *IL2* и *IL2R*. Промоторный участок гена *IL2* содержит 9 сайтов связывания транскрипционных факторов (рис. 3.97). Среди них есть 2 участка связывания октомера Oct, не лимитирующего процесс индукции гена. Из трех ключевых транскрипционных факторов NF-κB взаимодействует с промотором в одном сайте, не зависимо от других транскрипционных факторов. Два других фактора — NF-AT и AP-1 — взаимодействуют с промотором как отдельно друг от друга (по 1 сайту связывания), так и в комплексе (3 сайта связывания). Заполнение всех сайтов соответствующими транскрипционными факторами, приводящее к индукции гена, служит конечным результатом передачи сигнала при активации Т-клеток.

Выше были подробно рассмотрены сигнальные пути, участвующие в активации Т-хелперов. Активация цитотоксических Т-клеток осуществляется по сходным механизмам.

### 3.5.2.2. Проявления активации Т-клеток

Активация CD4<sup>+</sup> Т-клеток (как и любых Т-лимфоцитов) приводит к экспрессии большого числа генов, среди которых наибольшую роль в реализации основных эффекторных событий играют гены *IL2* и *IL2R*, кодирующие соответственно цитокин IL-2 и α-цепь его рецептора. Экспрессия гена *IL2* происходит примерно через 1 ч после получения стимулирующего сигнала. Секрцию белка IL-2 стимулированными Т-клетками *in vitro* выявляют через 3–4 ч; она достигает пика через 8–12 ч и прекращается через 24 ч. *In vivo* секрция IL-2 начинается через 1–3 сут после введения антигена



**Рис. 3.98.** Временная динамика экспрессии молекул активации Т-клеток. На графике представлены сроки экспрессии ключевых молекул активации после стимуляции Т-клеток

(иммунизации) и сохраняется в течение 7–12 сут. Экспрессия  $\alpha$ -цепи рецептора IL-2 происходит несколько позже и продолжается дольше — *in vitro* ее выявляют через 4 ч после стимуляции; максимума она достигает через 2–3 сут и прекращается через 5 сут (рис. 3.98).

Одновременно с геном *IL2* в кратчайшие сроки после действия стимулятора (в физиологических условиях — антигенного комплекса пептид–МНС) экспрессируются гены *c-Myc* и *N-Myc*, называемые ранними активационными генами. Они участвуют в подготовке клеток к митозу. Через 2–3 ч на поверхности Т-клетки появляется CD69 — самый ранний активационный антиген, частично мобилизуемый из внутриклеточных депо, а частично экспрессируемый *de novo*. Его экспрессия продолжается немногим более суток. Вскоре после CD69 на поверхности клетки появляется другой ранний маркер активации — CD25, представляющий уже упомянутую  $\alpha$ -цепь рецептора для IL-2. Несколько раньше выявляют экспрессию ряда цитокиновых генов и синтез ограниченных количеств соответствующих цитокинов (IFN $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-6).

Следующие проявления активации наблюдают через сутки после действия стимулятора, когда экспрессируется молекула рецептора для трансферрина (CD71). Этот фактор играет важную роль в пролиферации, поскольку для ее осуществления необходимы ионы железа. В последующие дни (3–6 сут) экспрессируются молекулы МНС-II, относимые к поздним маркерам активации Т-клеток, а затем —  $\beta_1$ -интегрины, обозначаемые как очень поздние активационные антигены — VLA (*Very late activation antigens*), и секретируются хемокины. Эти поздние проявления активации клеток совмещаются с пролиферативным процессом.

### 3.5.2.3. Проллиферативная экспансия клонов Т-хелперов

Как уже неоднократно подчеркивалось, исходная численность клеток в каждом клоне Т-лимфоцитов мала и недостаточна для защиты организма от патогенов и других источников биологической агрессии. Именно поэтому первый процесс, в который вовлекаются активированные Т-клетки, —

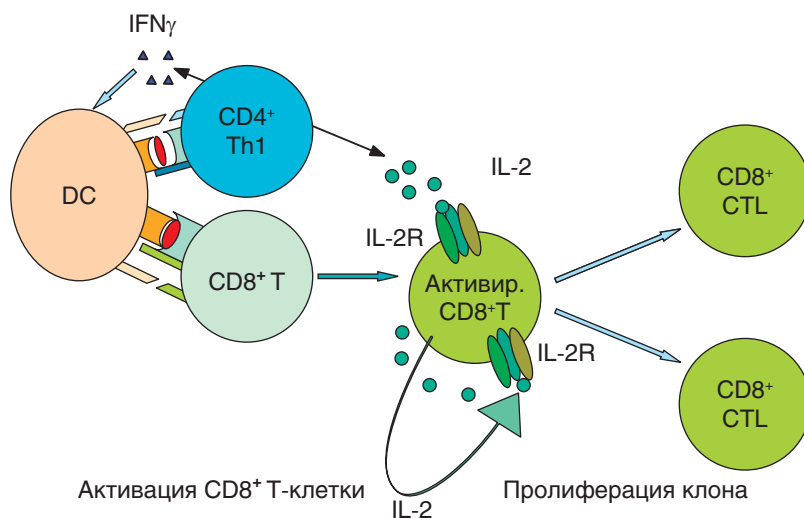
пролиферация. Связывание антигенного лиганда с TCR само по себе выводит клетку из фазы покоя ( $G_0$ ) и переводит в фазу  $G_1$ . Однако продвижение по циклу приостанавливается в середине этой фазы (между ее этапами  $G_{1a}$  и  $G_{1b}$ ). В преодолении этой задержки участвуют цитокины, в первую очередь IL-2.

Вступление клетки в цикл контролируют циклины, связывающиеся с циклинзависимыми киназами (Cdk) серин/треонинового типа. При этом происходит активация Cdk. Известно 6 циклинов (их обозначают буквами от А до Е; существует несколько вариантов циклина D) и столько же Cdk (Cdk1-Cdk6). Выделяют 3 группы циклинов, обозначаемые фазами клеточного цикла, которые они «обслуживают» —  $G_1/S$ , S и M. Циклины группы  $G_1/S$ , к которым относят циклины D и E, отвечают за подготовку клеток к репликации ДНК, S-циклин (циклин A) инициирует репликацию ДНК, а M-циклин (циклин B) участвует в запуске митоза. Партнерами упомянутых циклинов служат киназы Cdk4 и Cdk6 (для циклина D), Cdk2 (для циклинов E и A) и Cdk1 (для циклина B). При связывании Cdk с циклинами происходит фосфорилирование киназ и их активация. После завершения контролируемой ими фазы клеточного цикла циклины деградируют.

Выход клетки в цикл связан с формированием комплекса циклин E–Cdk2, а для преодоления точки рестрикции между  $G_{1a}$  и  $G_{1b}$ , помимо указанного комплекса, необходимы циклины (D1, D2 и D3), связанные с киназами Cdk4 и Cdk6. Под влиянием комплекса циклина E с Cdk2 в фазе  $G_{1b}$  происходит фосфорилирование фактора рабдомиосаркомы (Rb), а также освобождение из комплекса с ним и активация фактора E2F. Фактор E2F индуцирует экспрессию генов циклинов A и B. Как уже было отмечено выше, циклин A в комплексе с Cdk2 запускает фазу S клеточного цикла, а циклин B в комплексе с Cdk1 — обуславливает переход клетки к митозу. Разрушение циклинов, свидетельствующее о завершении очередной фазы цикла, происходит после их убиквитинирования, катализируемого различными для разных циклинов ферментами — убиквитинлигазами.

IL-2, синтезируемый и секретируемый активированными Т-лимфоцитами, служит основным ростовым фактором этих клеток; встраивание  $\alpha$ -цепи в состав рецептора для IL-2 значительно повышает его сродство к IL-2 (см. раздел 3.4.3.3), что обеспечивает запуск пролиферации Т-клеток (рис. 3.99). IL-2 служит сигналом, позволяющим преодолеть точку рестрикции между фазами  $G_{1a}$  и  $G_{1b}$  клеточного цикла. Действие IL-2 обеспечивает продвижение по циклу и достижение митоза. После завершения митоза клетка сохраняет на своей поверхности высокоаффинный рецептор для IL-2, что служит условием продолжения пролиферации.

IL-2-зависимая пролиферация  $CD4^+$  Т-лимфоцитов продолжается 3–5 сут после активации. Она обеспечивает умножение численности клеток в клонах, вовлекаемых в иммунный ответ — пролиферативную экспансию клонов. Т-клетки проходят 6–8 делений, что обеспечивает увеличение их числа примерно в 100–200 раз. Так, если исходную численность Т-клеток в клоне можно оценить у человека примерно в  $2 \times 10^3$  (исходя из оценки общего числа Т-хелперов — в  $7 \times 10^{10}$  и возможного числа клонов — в  $3 \times 10^7$ ), то после пролиферации их число может превысить  $10^6$ . Это обеспечивает должную эффективность иммунного ответа, поскольку формирование активных Т-хелперов необходимо для успешной реализации практически всех его ветвей.



**Рис. 3.99.** IL-2-зависимая пролиферация CD8<sup>+</sup> Т-клеток клона, вовлекаемого в иммунный ответ. На примере CD8<sup>+</sup> Т-клеток проиллюстрированы механизмы пролиферативной экспансии антигенспецифического клона. Презентация приводит к активации распознавших антиген CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Основным продуктом активации (IL-2) в большем количестве выделяют CD4<sup>+</sup> Т-клетки. CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты используют его для размножения до численности, необходимой для обеспечения эффективного иммунного ответа

### 3.5.3. Дифференцировка Т-хелперов

Под влиянием активации в результате изменений структуры хроматина гены цитокинов становятся доступными для регулирующих сигналов, под влиянием которых выявляют минимальный уровень экспрессии многих из этих генов. На этом этапе CD4<sup>+</sup> Т-клетки обозначаются как Th0-клетки. Помимо IL-2, обеспечивающего пролиферативную экспансию, в этих клетках слабо экспрессируются IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, GM-CSF, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и некоторые другие факторы, что на данном этапе, по-видимому, не играет существенной функциональной роли. Но уже в процессе деления CD4<sup>+</sup> Т-клеток запускается процесс их дифференцировки на субпопуляции. Такие субпопуляции называют адаптивными, поскольку они образуются в ходе адаптивного иммунного ответа на антигены, в отличие от естественных субпопуляций (см. раздел 3.3.2.1), формирующихся в ходе антигеннезависимой дифференцировки Т-клеток (табл. 3.25). Ранее других образуются 2 субпопуляции Т-хелперов — Th1 и Th2 (Th — от *T-helper*).

#### 3.5.3.1. Th1- и Th2-клетки

Дихотомию Т-хелперного звена системы адаптивного иммунитета впервые описали в 1986 г. Т. Мосманн (*T.R. Mosmann*) и соавт. Они обнаружили, что панель Т-хелперных клонов мышей по способности секретировать цитокины можно разделить на 2 группы, и обозначили их как Th1 и Th2.

Таблица 3.25. Адаптивные субпопуляции Т-хелперов

Показатель	Th1	Th2	Th17
Типичные индукторы	Внутриклеточные патогены (например, микобактерии)	Паразиты, аллергены	Внеклеточные патогены
Факторы, благоприятствующие развитию	Высокие и низкие дозы антигены, релаксан, дигидроэпиандростерон, полный адъювант Фрейнда	Промежуточные дозы антигена, глюкокортикоиды, простагландин E2, гистамин, прогестерон, дигидрооксивитамин D, алюминиевые квасцы	Презентация антигена дендритными клетками и макрофагами, стимулированными через TLR или CD40
Цитокины-индукторы	IL-12, IFN $\gamma$ , IL-18, IL-23, IL-27	IL-4	IL-6, IL-23, TGF $\beta$
Дифференцировочные факторы	Tbet	GATA-3	ROR-C
Продуцируемые цитокины	IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$	IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, IL-9, IL-10	IL-17, IL-22, IL-21
Клетки — функциональные партнеры	Макрофаги	В-клетки, эозинофилы	Нейтрофилы
Защитная функция	Защита от внутриклеточных патогенов, локализующихся в цитоплазме	Защита от паразитов и внеклеточных патогенов	Защита от внеклеточных патогенов
Повреждающая роль	Развитие клеточных аутоиммунных процессов	Развитие аллергии	Развитие аутоиммунных процессов

Первые секретируют IFN $\gamma$ , IL-2, IL-3, GM-CSF, вторые — IL-4, IL-5 и IL-6. Позже дифференцировка Т-хелперов на 2 субкласса была показана *in vivo* при иммунном ответе и была продемонстрирована функциональная значимость Th1/Th2-дихотомии. Этот важный вывод был сделан при анализе природы различий в чувствительности к *Leishmania major* мышей линий BALB/c (чувствительная линия) и C57BL/6 (устойчивая линия). Оказалось, что у мышей C57BL/6 в ответ на инфицирование лейшманиями формируются преимущественно Th1-, а у мышей BALB/c — Th2-клетки. Различие спектра гуморальных продуктов, прежде всего ключевых цитокинов Th1- и Th2-клеток (соответственно IFN $\gamma$  и IL-4) определяет основную направленность иммунного ответа в направлении клеточной или гуморальной защиты. Клеточный иммунный ответ обуславливает эффективную защиту от внутриклеточных патогенов (к которым относят лейшманий), а гуморальный ответ — защиту от внеклеточных патогенов. Только соответствие

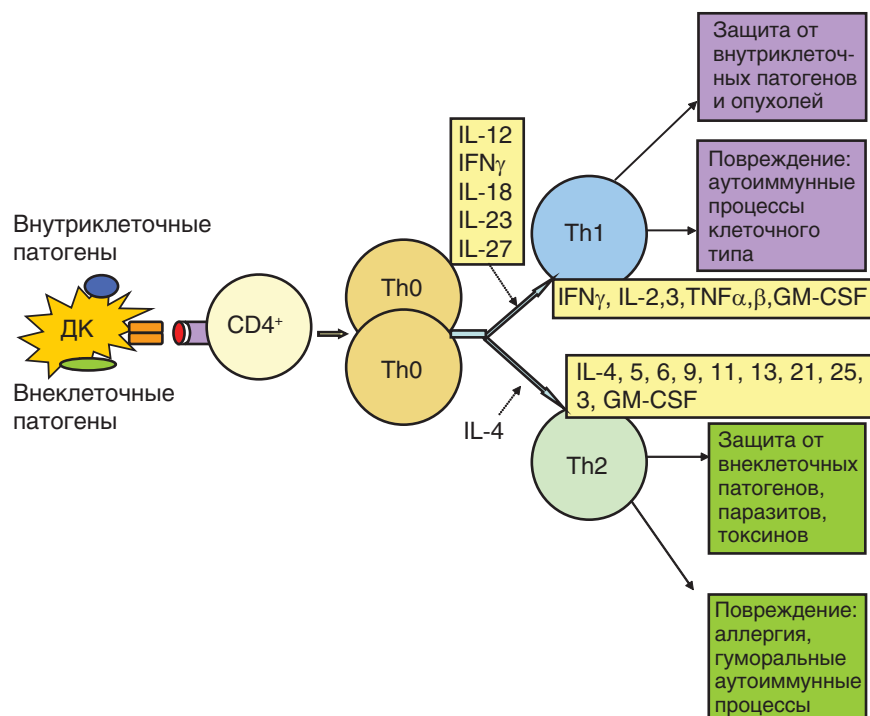
направления дифференцировки Т-хелперов (а следовательно, типа ответа) природе патогена делает эту защиту эффективной. Поэтому мыши линии C57BL/6, формирующие Th1-зависимый клеточный ответ, эффективно защищаются от лейшманиазной инфекции, а мыши линии BALB/c, реагирующие развитием Th2-зависимого гуморального ответа, оказываются беззащитными и гибнут.

Открытие адаптивных субпопуляций Т-хелперов создало основу для формирования представлений о различии клеточных механизмов иммунной защиты, в зависимости от локализации патогена (внутри- или внеклеточная). Это сильно повлияло также на представления о синтезе цитокинов (двойственность набора цитокиновых продуктов показана не только для Т-хелперов, но и для ряда других клеток иммунной системы) и послужило толчком для изучения путей дифференцировки Т-хелперов. Наконец, это открытие оказало значительное влияние на понимание природы таких форм иммунопатологии, как аллергия и аутоиммунные процессы, в развитии которых важную роль играет дисбаланс субпопуляций Т-хелперов. При всей важности этой концепции необходимо сознавать, что она в значительной степени схематизирует иммунологические процессы, что особенно заметно проявляется при рассмотрении иммунных процессов, происходящих в организме человека.

При дифференцировке Т-хелперов происходит супрессия одних и усиление экспрессии других цитокиновых генов, прежде слабо экспрессированных в Th0-клетках. Th1-клетки продуцируют  $IFN\gamma$ , IL-2,  $TNF\alpha$ ,  $TNF\beta$ , IL-3, GM-CSF, Th2-клетки — IL-4, IL-13, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-21, IL-25, IL-10, IL-3, GM-CSF. В этих спектрах есть цитокины, общие для двух линий (GM-CSF, IL-3, у человека — IL-10). Другие цитокины более или менее специфичны для субпопуляций. Среди этих цитокинов выделяют ключевые для Th1- и Th2-клеток, поскольку они не просто специфичны для них, но и причастны к выполнению их основных эффекторных функций, индукции дифференцировки клеток этих субпопуляций, самоподдержанию и подавлению развития клеток противоположного типа. Для Th1-клеток таким цитокином является  $IFN\gamma$ , для Th2-клеток — IL-4 (рис. 3.100).

Факторы и механизмы дифференцировки Th1- и Th2-клеток изучены достаточно детально. Их дифференцировка зависит от действия по меньшей мере двух сигналов. Один из них поступает через TCR и «сообщает» о распознавании антигена в комплексе с молекулой МНС. Второй сигнал поставляют цитокины. Относительная роль этих сигналов до конца не определена. Цитокинам приписывают селективную или инструктивную функции. Согласно селективной точке зрения, направление дифференцировки Т-хелперов задается при передаче сигнала через TCR, а цитокины только выбирают ту или иную субпопуляцию, обеспечивая ее факторами выживания и пролиферации. Согласно инструктивной точке зрения, через TCR передается активационный сигнал, тогда как направление дифференцировки задают цитокины через соответствующие рецепторы. В настоящее время предпочтение отдают первой точке зрения.

Развитию Th1-клеток способствуют крайние (очень высокая и очень низкая) дозы антигена и его высокое сродство к рецептору, а развитию Th2-клеток — промежуточные дозы антигена и более низкое его сродство



**Рис. 3.100.** Дифференцировка Т-хелперов типов Th1 и Th2. Указаны пути дифференцировки Т-хелперов двух основных типов, функции образующихся клеток, а также цитокины, направляющие эту дифференцировку и секретируемые самими Т-хелперами

к рецептору. О значении корецептора CD4 в выборе пути дифференцировки свидетельствует усиление дифференцировки Т-хелперов в направлении Th1-клеток при нокауте гена **CD4**. С решающей ролью в дифференцировке субпопуляций Т-хелперов антигенного сигнала можно связать то, что способность вызывать разные формы иммунного ответа через индукцию Th1- или Th2-клеток обусловлена самой природой антигенов. Так, преимущественную дифференцировку Th1-хелперов вызывают антигены лейшманий, трипаносом, хламидий, микобактерий, бордетелл, боррелий, геликобактера, кандид, вируса гриппа, а также бактериальная ДНК, содержащая последовательность CpG, двуспиральная РНК, ЛПС и суперантигены. Избирательными индукторами Th2-хелперов служат антигены шистосом, токсокар, вирусов оспы, кори, а также аллергены и протеазы паразитов. Перечень антигенов-индукторов Th1-клеток наводит на мысль, что за Th1-ориентацию иммунного ответа отвечают не антигены как таковые, а РАРР, с которыми они связаны. Антигенные эпитопы и детерминанты РАРР могут располагаться на одной молекуле, как например в случае ЛПС. Сигналы от РАРР могут воспринимать рецепторы АПК, прежде всего дендритных, в значительной степени определяющие характер передачи сигнала через антигенраспознающие рецепторы лимфоцитов. В случае антигенов, индуцирующих преимущественно Th2-ответ, молекулярные основы

данного предпочтения не установлены. Таким образом, роль антигенов в выборе пути дифференцировки Т-хелперов скорее всего связана с передачей сигнала не через TCR, а через костимулирующие молекулы. Вероятно, влиянием на АПК можно объяснить различное действие адъювантов на дифференцировку Т-хелперов. Так, полный адъювант Фрейнда (содержащий микобактерии) способствует развитию Th1-клеток, а алюминиевые квасцы и столбнячный анатоксин — дифференцировке по Th2-пути.

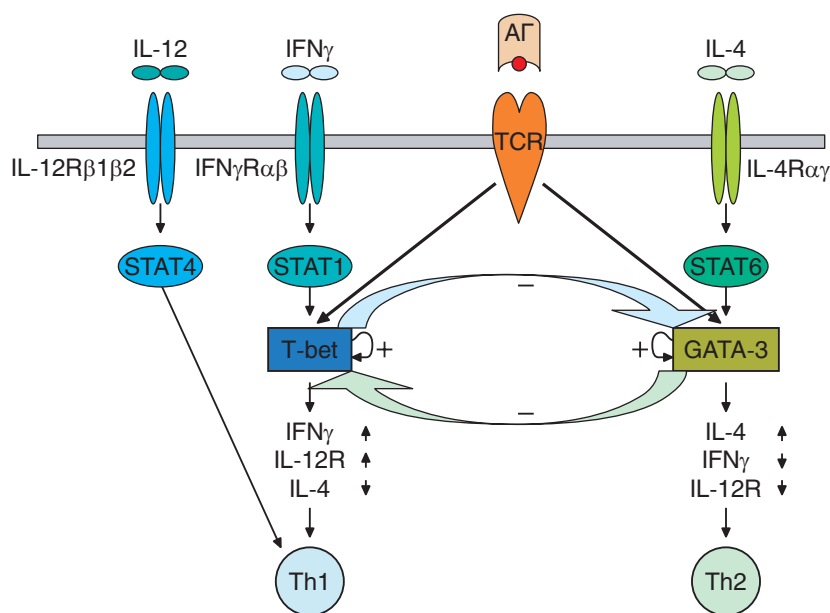
Роль костимуляции, осуществляемой АПК, в выборе пути дифференцировки Т-хелперов проявляется при анализе на уровне конкретных костимулирующих молекул. Так, преобладающее участие в костимуляции молекул Т-клетки ICOS и OX40, а также молекулы CD86, экспрессированной на дендритной клетке, направляет дифференцировку в сторону Th2-клеток, в то же время костимуляция через CD80 не оказывает существенного влияния на дифференцировку. Предварительная обработка дендритных клеток  $IFN\gamma$  или IL-12 придает им способность преимущественно индуцировать Th1-дифференцировку, а обработка IL-10 или фактором TSLP — развитие Th2-клеток. Миелоидные дендритные клетки имеют большую способность к индукции дифференцировки Th1-лимфоцитов, а плазмоцитоидные — Th2-клеток. В связи с этим сформировались представления о двух субпопуляциях дендритных клеток — DC1 и DC2, индуцирующих развитие соответственно Th1- и Th2-клеток (см. раздел 2.1.6).

Роль цитокинов в обеспечении дифференцировки Th1- и Th2-клеток изучена более детально. К настоящему времени установлено, что основным индуктором Th1-клеток служит IL-12. Развитию и поддержанию Th1-ответа способствуют также  $IFN\gamma$ , IL-18, IL-23 и IL-27. Аналогичную, но второстепенную роль играют  $TNF\alpha$ ,  $TGF\beta$ ,  $IFN\alpha$ . Цитокином, определяющим развитие Th2-клеток, служит только IL-4. Роль второстепенных факторов при их развитии играют IL-10, IL-6, IL-2, IL-19 и даже цепь p40 IL-12. Th0-клетки экспрессируют рецепторы для названных цитокинов. Они несут «полные» рецепторы для IL-12 ( $\beta_1\beta_2$ ),  $IFN\gamma$  ( $\alpha\beta$ ) и IL-4 ( $\alpha\gamma$ ), через которые получают сигналы, определяющие дальнейшую судьбу Т-хелпера. Уже после дифференцировки на некоторых клетках структура названных рецепторов становится неполной. Так, Th2-клетки утрачивают  $\beta_2$ -цепь рецептора для IL-12. Полный рецептор для  $IFN\gamma$  сохраняют только Th2-клетки, тогда как Th1-лимфоциты утрачивают  $\beta$ -цепь.

Влияние IL-12 на дифференцировку Th1-клеток реализуется через рецептор, содержащий 2 полипептидные цепи —  $\beta_1$  и  $\beta_2$ . Цитоплазматические участки цепей связаны с тирозинкиназами семейства Jak:  $\beta_1$ -цепь связана с киназой Tyk2, а  $\beta_2$ -цепь — с киназой Jak2. Эти киназы фосфорилируют (и, следовательно, активируют) транскрипционные факторы STAT1, STAT3, STAT4 и STAT5. Показано, что наиболее важен для дальнейшей передачи сигнала тандем  $\beta_2$ -цепи с киназой Jak2. Именно он отвечает за фосфорилирование транскрипционного фактора STAT4, которому принадлежит ключевая роль в передаче сигнала, приводящего к дифференцировке Th1-клеток. В активации STAT4 задействован также сигнальный путь, реализуемый через MAP-киназу p38, которая фосфорилирует STAT4. Среди эффектов STAT4 следует выделить его способность взаимодействовать с промотором гена, кодирующего  $IFN\gamma$ , и запускать его экспрессию.

Другой транскрипционный фактор, играющий ключевую роль в формировании Th1-фенотипа — T-bet (рис. 3.101). Его экспрессия коррелирует с продукцией  $\text{IFN}\gamma$ . Экспрессия этого фактора зависит от сигналов, поступающих от TCR и  $\text{IFN}\gamma\text{R}$ , но не зависит от сигналов, индуцируемых IL-12. Нокаут гена T-bet приводит к полному подавлению выработки  $\text{IFN}\gamma$  и нарушению дифференцировки Th1-клеток при активации *in vitro* и *in vivo*. Выработка Th2-цитокинов при этом усиливается. Таким образом,  $\text{IFN}\gamma$  усиливает экспрессию T-bet и в то же время экспрессия  $\text{IFN}\gamma$  зависит от T-bet. Формируется петля положительной обратной связи и достигается стабилизация фенотипа Th1-клеток. В дифференцировке Th1-клеток участвуют еще несколько факторов — Hlx, ERM, IRF-1.

Основные транскрипционные факторы, определяющие дифференцировку Th2-клеток, — STAT6 и GATA-3 (последнему принадлежит ведущая роль) (см. рис. 3.101). STAT6 активируется при связывании IL-4 со своим рецептором. Активация GATA-3 зависит как от сигнализации через TCR, так и от активности STAT6. GATA-3 «включает» петлю аутоактивации, которую рассматривают как механизм стабилизации фенотипа Th2-клеток. Совместно с дополнительными факторами, в частности cMaf и NF-AT, экспрессируемыми при участии STAT6, GATA-3 индуцирует экспрессию генов *IL4*, *IL5* и *IL13*. В опытах с нокаутом гена GATA-3 показана однозначная связь индукции Th2-цитокинов с экспрессией GATA-3. Кроме того, GATA-3 супрессирует развитие Th1-клеток, подавляя экспрессию генов STAT4 и IL-12R $\beta$ 2, что затрудняет передифференцировку Th2-лимфоцитов в Th1. GATA-3 участвует в поддержании пролиферации Th2-клеток. Таким



**Рис. 3.101.** Вклад цитокинов и дифференцировочных факторов в образование Th1- и Th2-лимфоцитов. Отражены основные внеклеточные и внутриклеточные факторы, определяющие дифференцировку Т-хелперов и их взаимное подавление

образом, фактор GATA-3 важен не только для дифференцировки Th2-клеток, но и для стабилизации их фенотипа, а также подавления программы дифференцировки Th1-лимфоцитов.

Различие транскрипционных факторов, необходимых для дифференцировки Th1- и Th2-клеток, становится особенно четким при сопоставлении структуры промоторных участков генов *IFNG* и *IL4*, кодирующих ключевые для развития этих клеток цитокины (см. рис. 3.97).

Основной источник цитокинов, обеспечивающих дифференцировку Th1-лимфоцитов, — дендритные клетки. Они выделяют IL-12 уже при первом контакте с CD4<sup>+</sup> Т-клетками. При взаимодействии с активированными Th0-лимфоцитами дендритные клетки секретируют весь набор цитокинов, необходимых для развития Th1-клеток: IL-12, IFN $\gamma$ , IL-18, IL-23, IL-27 и IFN $\alpha/\beta$ . В качестве дополнительного источника IFN $\gamma$  выступают субпопуляции естественных киллеров и NKT-клеток. Вопрос о цитокиновом обеспечении дифференцировки Th2-клеток более сложен, потому что источники IL-4 — единственного цитокина-индуктора Th2-клеток — до их появления в ходе иммунного ответа точно не установлены. Конститутивная выработка этого цитокина в той или иной степени свойственна тучным клеткам, NK-, NKT-клеткам, эозинофилам, базофилам, но четко не показано, в какой степени она реализуется при иммунном ответе *in vivo* и какова доступность выделяемого IL-4 для Th0-клеток. Существует предположение, что именно IL-4 служит фактором, в конечном счете определяющим баланс между Th1- и Th2-клетками, поскольку его эффект превосходит действие других цитокинов и направляет дифференцировку в сторону Th2-клеток.

К нецитокиновым факторам, влияющим на направление дифференцировки Т-хелперов, относят гормоны и другие медиаторы: дигидроэпиандростерон и релаксан индуцируют в основном Th1-клетки, а глюкокортикоиды, простагландин E2, гистамин, прогестерон, дигидрооксивитамин D — Th2-лимфоциты.

Определение мембранных маркеров редко используют для дифференцирования Th1- и Th2-клеток. К таким маркерам прежде всего относят хемокиновые рецепторы: для Th1 характерны CXCR3 и CCR5, реагирующие соответственно на IFN $\gamma$ -зависимые  $\alpha$ -хемокины (IP-10, MIG, I-TAC) и воспалительные  $\beta$ -хемокины (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES). Для Th2-клеток свойственны  $\beta$ -хемокиновые рецепторы — CCR3 (связывает эотаксин, MCP2, MCP3, MCP4 и RANTES), CCR4 (связывает TARC и MDC) и CCR8 (специфичен для I-309 и MIP-1 $\beta$ ). Th1- и Th2-клетки различаются также по спектру и составу цитокиновых рецепторов. Так, рецептор для IL-1 1-го типа (IL-1R1) экспрессирован на Th2, но не на Th1-клетках. Об особенностях экспрессии этими клетками рецепторов для IL-12 и IFN $\gamma$  говорилось выше. Некоторые мембранные молекулы, характерные для рассмотренных субпопуляций Т-хелперов, перечислены в табл. 3.9.

Главным подходом при разграничении Th1- и Th2-клеток служит оценка спектра секретируемых ими цитокинов, что представляется вполне адекватным, поскольку именно цитокины определяют специфические функции этих клеток. Так, ключевой цитокин Th1-клеток IFN $\gamma$  реализует основной эффект Th1-клеток — активацию макрофагов, одновременно подавляя развитие и активность Th2-клеток. IL-2, при всей важности для функционир-

ования Th1-клеток (регуляция роста Т-клеток и активации/дифференцировки различных типов цитотоксических клеток), не служит для них ключевым цитокином. Более того, со временем уровень его секреции снижается (отчасти под влиянием экспрессии T-bet). Лимфотоксин  $\alpha$  является продуктом Th1-клеток, но его роль в реализации функции Th1-лимфоцитов до конца не выяснена. TNF $\alpha$  вносит значительный вклад в проявление активности Th1-клеток, особенно в комбинации с IFN $\gamma$ , но его выработка не является строго специфичной для этих клеток.

Функции Th2-клеток в значительной степени определяются секрецией IL-4. Наиболее важные эффекты этого цитокина — обеспечение пролиферации активированных В-клеток, ведущая роль в переключении изотипов антител на IgG1 (у мышей) и особенно на IgE, а также участие в развитии тучных клеток. К ключевым цитокинам Th2-клеток относят также IL-13 и IL-5. IL-13 воспроизводит большую часть эффектов IL-4; кроме того, он стимулирует продукцию слизи эпителиоцитами и отвечает за перестройку эпителия слизистых оболочек. IL-5 обеспечивает развитие эозинофилов и служит для них хемоаттрактантом, а также участвует в поддержании пролиферации В-клеток. IL-10 в большей степени специфичен для Th2-клеток мыши, чем человека. Этот цитокин играет важную роль в запуске образования антител и ингибировании Th1-клеток. Более детальная характеристика Th1- и Th2-цитокинов представлена ниже.

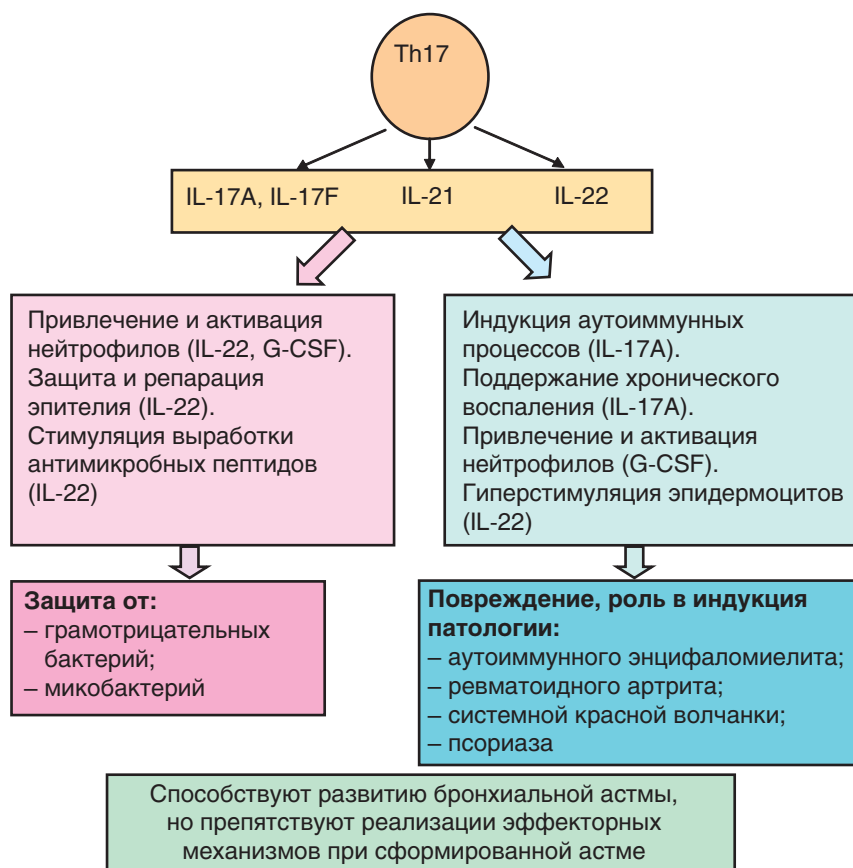
Помимо свойств цитокинов, вырабатываемых Th1- и Th2-клетками, их функция зависит от прямых контактных взаимодействий с клетками-мишенями, выступающими в качестве исполнителей эффекторных функций при иммунном ответе. Для Th1-клеток такими мишенями служат макрофаги, для Th2-клеток — В-лимфоциты. Сигналы, индуцируемые под влиянием контактных и гуморально опосредованных воздействий со стороны Т-хелперов, определяют вклад этих лимфоцитов в развитие соответственно клеточного (в его воспалительном варианте) и гуморального иммунного ответа.

Через цитокины Th1- и Th2-клетки способны ингибировать развитие и функционирование друг друга. Уже отмечалось, что IFN $\gamma$ , продуцируемый Th1-лимфоцитами, подавляет развитие Th2-клеток; у мышей подавление развития Th1-лимфоцитов реализуются преимущественно при помощи IL-10, а у человека в большей степени — через IL-4.

### 3.5.3.2. Th17 и другие адаптивные субпопуляции Т-клеток

В ходе иммунного ответа CD4<sup>+</sup> Т-клетки дифференцируются в нескольких направлениях, в результате чего помимо Th1- и Th2-клеток возникают другие адаптивные субпопуляции Т-хелперов, а также регуляторных Т-лимфоцитов. Вероятно, по времени эти процессы несколько отстают от развития Th1- и Th2-клеток.

Субпопуляция Th17-лимфоцитов, названных так по их ключевому цитокину IL-17, дифференцируется из активированных CD4<sup>+</sup> клеток независимо от Th1- и Th2-лимфоцитов (см. табл. 3.25). Их развитие направляют другие цитокины — IL-6, TGF $\beta$ , IL-23. Цитокины, секретируемые Th1- и Th2-клетками, подавляют развитие Th17-лимфоцитов. Основным дифференцировочным (транскрипционным) фактором, ответственным за



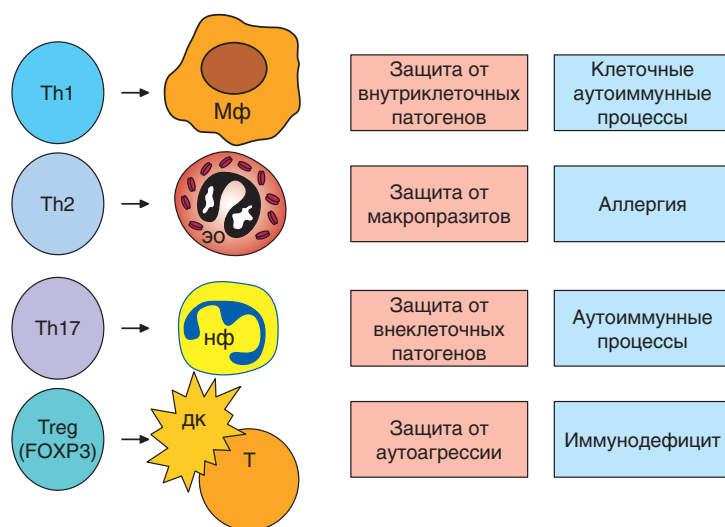
**Рис. 3.102.** Th17-лимфоциты: механизмы действия, биологические эффекты и значение

развитие Th17-клеток у мыши, служит ROR $\gamma$ t (у человека — ROR-C). Эти клетки секретируют IL-21, IL-22 и 2 цитокина семейства IL-17 — IL-17A и IL-17F (рис. 3.102).

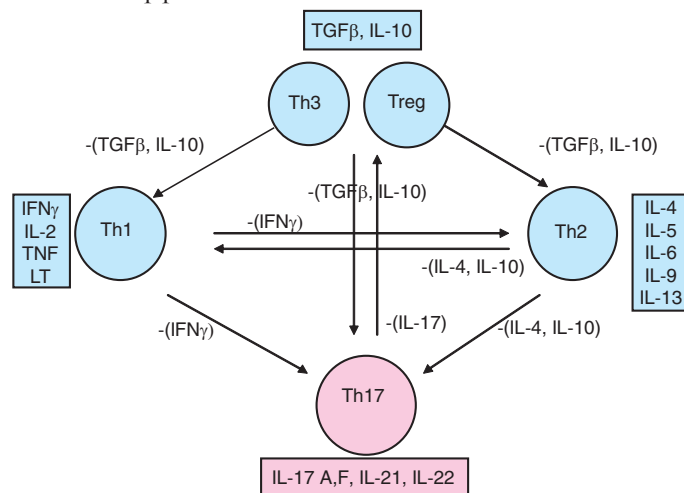
Подобно другим типам хелперных Т-лимфоцитов Th17-клетки могут участвовать как в иммунной защите от патогенов, так и в формировании иммуннопатологии. Обе этих роли опосредованы преимущественно цитокинами, секретируемыми Th17-клетками, особенно IL-17A и IL-22. Так, эти клетки способны привлекать и активировать нейтрофилы. Это свойство Th17-клеток обусловлено IL-22: он усиливает выработку G-CSF, стимулирующего образование нейтрофилов. Мобилизуя нейтрофилы, Th17-клетки участвуют в защите от грамотрицательных бактерий и в то же время могут способствовать повреждению тканей при хроническом воспалении. Для участия в аутоиммунных процессах необходима присущая Th17-клеткам провоспалительная активность, проявляемая в поддержании хронического, но не острого воспаления, развитие которого Th17-клетки скорее подавляют.

По-видимому, три описанных выше типа адаптивных субпопуляций не исчерпывают всего разнообразия Т-хелперов. Например, в качестве само-

стоятельной субпопуляции некоторые исследователи рассматривают фолликулярные Т-хелперы гуморального иммунного ответа ( $CD4^+$   $T_{FH}$ -клетки). Сообщалось о  $CD4^+$  Т-клетках, специализированных на выработке IL-9 (Th9), а также IL-20 (Th20). Не вызывает сомнений наличие нескольких субпопуляций  $CD4^+$  лимфоцитов, выполняющих функции регуляторных Т-клеток, которые будут рассмотрены в соответствующем разделе (см. 3.6.6.3). Таким образом, в настоящее время можно с определенностью говорить о существовании по меньшей мере четырех адаптивных субпопуляций  $CD4^+$  Т-лимфоцитов (рис. 3.103, 3.104).



**Рис. 3.103.** Адаптивные субпопуляции Т-клеток. Клетки-партнеры, физиологические и патологические эффекты



**Рис. 3.104.** Взаимоотношения адаптивных субпопуляций Т-хелперов. Указаны ключевые цитокины, продуцируемые  $CD4^+$  Т-клетками основных адаптивных субпопуляций и определяющие их антагонистические взаимоотношения

### 3.5.3.3. Цитокины, контролирующие и опосредующие адаптивные реакции лимфоцитов

В главе, посвященной цитокинам (см. раздел 2.5.5), были рассмотрены гуморальные факторы, участвующие в обеспечении реакций врожденного иммунитета, — провоспалительные цитокины, вырабатываемые преимущественно миелоидными клетками. В реакциях адаптивного иммунитета используются цитокины другой группы, которые вырабатываются главным образом лимфоидными клетками (т.е. лимфокины). К ним относят основную ростовой фактор Т-лимфоцитов IL-2, обеспечивающий пролиферативную экспансию клонов Т-клеток, а также цитокины, участвующие в индукции и выполнении функций различных субпопуляций Т-хелперов.

**IL-2.** Это первый открытый лимфокин, т.е. цитокин, продуцируемый лимфоцитами. Он описан в 1976 г. как фактор роста Т-клеток. В 1983 г. клонирован его ген, содержащий 4 экзона. IL-2 является мономерным гликопротеином с молекулярной массой 15 кДа, содержащим одну дисульфидную связь и один сайт гликозилирования (в гликозилированной форме его молекулярная масса составляет 17–22 кДа).

Основные продуценты IL-2 — CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты. Они составляют до 90% клеток-продуцентов этого цитокина. IL-2 образуют также цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты и некоторые другие клетки. Наиболее активно CD4<sup>+</sup> Т-клетки продуцируют IL-2 на начальном этапе после активации (стадия Th0) до дифференцировки на субпопуляции. Из субпопуляций CD4<sup>+</sup> Т-клеток (см. выше) его вырабатывают только Th1-клетки, но интенсивность секреции IL-2 этими клетками в ходе иммунного ответа постепенно ослабевает. Описано явление супериндукции IL-2 — усиление его выработки ингибиторами белкового синтеза, что объясняется снятием влияния ингибирующих белковых факторов и наличием стабильной матричной РНК. Аналогичное действие оказывает ионизирующая радиация (10–15 Гр).

Субъединичная структура рецептора для IL-2 уже была рассмотрена при иллюстрации зависимости сродства к цитокину от состава рецептора (см. раздел 2.5.5.2). Высокоаффинный рецептор для IL-2 ( $K_d=10^{-11}$  М) содержит 3 полипептидные цепи, из которых 2 —  $\beta$  и  $\gamma$  [общая для ряда цитокинов  $\gamma$ (с)-цепь] — экспрессируются на Т- и НК-клетках конститутивно (т.е. независимо от активации), тогда как экспрессия  $\alpha$ -цепи индуцируется активацией. Все полипептидные цепи рецептора являются трансмембранными белками I типа. При этом за связывание с IL-2 отвечают  $\beta$ - и  $\alpha$ -цепи, а за передачу сигнала —  $\gamma$ - и  $\beta$ -цепи. И единичная  $\alpha$ -цепь, и комбинация с  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепями обеспечивают связывание цитокина, но в силу низкого сродства рецептора к IL-2 формирующийся комплекс не поглощается клеткой и не вызывает последующей генерации сигнала. Поглощение комплекса важно для разрушения выполнившей свою функцию молекулы цитокина, что препятствует их накоплению, способному привести к нежелательным последствиям. Только тримерный рецептор состава  $\alpha\beta\gamma$  имеет необходимый уровень аффинности рецептора к IL-2, что обеспечивает интернализацию комплекса и передачу активационного сигнала. В НК-клетках  $\alpha$ -цепь, как правило, не экспрессируется и функциональным является рецептор состава  $\beta\gamma$ .

Передача сигнала от рецептора для IL-2 происходит по нескольким путям, среди которых основной и наиболее специфичный — путь, начинающийся

при активации киназ семейства Jak, связанных с  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепями рецептора. С  $\beta$ -цепью связана киназа Jak1, с  $\gamma$ -цепью — Jak3. Конформационные изменения этих цепей вызывают активацию Jak-киназ, реализующих свое действие через фосфорилирование факторов STAT3 и STAT5. Эти факторы димеризуются, мигрируют в ядро и взаимодействуют с участками промоторов различных генов, контролирующих клеточный цикл, выступая в качестве дифференцировочных факторов. Для связывания с киназами предназначены специальные участки в цитоплазматической части цепей рецептора, обогащенные отрицательно заряженными (содержащими карбоксилы) аминокислотными остатками. Под влиянием Jak-киназ происходит фосфорилирование этих остатков. Это обеспечивает возможность взаимодействия цитоплазматических участков цепей с киназой Lck, участвующей в запуске другого сигнального пути, в который вовлечена Ras/Raf-зависимая ветвь MAP-каскада. Это приводит к формированию дополнительных дифференцировочных факторов, участвующих во включении генов, необходимых для продвижения клеток по клеточному циклу. При участии Lck происходит также активация липидной киназы PI3K, активирующей белок Vav — основной фактор, ответственный за включение цепи реакций, обеспечивающих необходимую для прохождения митоза перестройку цитоскелета.

IL-2 вызывает два основных физиологических эффекта — индуцируют антигензависимую пролиферацию всех разновидностей Т-клеток и способствуют дифференцировке некоторых функциональных субпопуляций лимфоцитов — цитотоксических лимфоцитов, регуляторных Т-клеток. Спектр мишеней этого фактора довольно узок. К ним относят Т-лимфоциты и естественные киллеры, а также В-лимфоциты. IL-2 применяют в качестве главного фактора для поддержания длительной пролиферации Т-клеток с последующим их клонированием и получением постоянных культур клонов Т-лимфоцитов. Особенно чувствительны к действию IL-2 цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, для дифференцировки которых он необходим. IL-2 усиливает цитотоксическую эффективность НК-клеток, существенно расширяя спектр мишеней, на которые действуют формирующиеся под его влиянием клетки (ЛАК-клетки — см. раздел 4.1.2.3). IL-2 выступает в качестве кофактора пролиферации активированных В-лимфоцитов, способствует повышению функциональной активности моноцитов, экспрессирующих рецептор для IL-2 состава  $\beta\gamma$ . Наконец, IL-2 влияет на гемопоэз, усиливая образование тромбоцитов и эозинофилов и ослабляя миело- и эритропоэз, а также способствуя формированию экстрамедуллярных очагов гемопоэза.

Роль IL-2 в качестве ростового фактора активированных Т-клеток, еще недавно считавшаяся главной функцией IL-2, заменима, поскольку аналогичный эффект могут дать IL-7, IL-4, а также комбинации провоспалительных цитокинов. В то же время IL-2 служит незаменимым фактором индукции дифференцировки естественных регуляторных Т-лимфоцитов и главным фактором роста этих клеток. При нокауте гена *IL2* проявляются последствия повреждения именно этой функции данного цитокина. Следствием выключения IL-2 является развитие доброкачественных лимфопролиферативных процессов, захватывающих преимущественно кишечник, а также аутоиммунной полиэндокринопатии и ряда других

аутоиммунных нарушений. По не вполне понятным причинам ростстимулирующее действие IL-2 в отношении  $T_{reg}$  четко проявляется *in vivo* и с трудом воспроизводится в клеточной культуре. Изменение представлений о ключевых функциях IL-2 существенно ограничило использование этого цитокина как средства иммунотерапии (см. раздел 4.8.3.2).

Цитокины IL-12 и IFN $\gamma$  рассмотрены в главе 2 в контексте врожденного иммунитета.

**IL-4.** Описан в 1981 г. как фактор, стимулирующий активированные В-лимфоциты. Гликопротеин с молекулярной массой 15,5 кДа (гликозилированная форма — 19–22 кДа), содержит 1 функционально важную дисульфидную связь.

Основные продуценты IL-4 — Th2-клетки. Как отмечалось выше, его вырабатывают также тучные клетки, базофилы, эозинофилы, NK- и NKT-клетки, а также дендритные клетки (DC-2) — преимущественно спонтанно. IL-1, IL-2, а также глюкокортикоиды усиливают выработку IL-4.

Рецепторы IL-4 содержат 2 цепи —  $\alpha$  и  $\gamma$ (с). Полипептидные цепи рецептора относятся к семейству цитокиновых (гемопоэтиновых) рецепторов. Основные мишени IL-4 — В-лимфоциты. На одной покоящейся В-клетке содержится 200–300 высокоаффинных рецепторов; их число значительно возрастает после активации.

IL-4 служит основным ростовым фактором для В-лимфоцитов. Он может вызвать их пролиферацию без дополнительных стимулов. IL-4 способен вызвать переключение С-генов *IGH* на изотипы  $\gamma$ 1 и  $\epsilon$ , что усиливает выработку антител классов IgG1 (только у мышей) и IgE. IL-4 вызывает усиление экспрессии на В-клетках низкоаффинного рецептора Fc $\epsilon$ RII (CD23), растворимая форма которого стимулирует синтез IgE. Усиливающее действие на синтез IgE и способность поддерживать пролиферацию тучных клеток (преимущественно серозных) обуславливает участие IL-4 в патогенезе аллергических заболеваний.

Для Т-лимфоцитов IL-4 служит «запасным» ростовым фактором: он может замещать ростовое действие IL-2. К этому действию IL-4 чувствительны CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты и Th2-клетки, для которых он служит основным фактором роста. Кроме того, IL-4 — единственный цитокин, способный индуцировать дифференцировку Th2-клеток. Действуя на CD8<sup>+</sup> Т-клетки, он индуцирует развитие цитотоксических Т-лимфоцитов, секретирующих IL-4 и другие Th2-цитокины.

IL-4 служит функциональным антагонистом IFN $\gamma$ , как при непосредственном действии на клетки (он подавляет выработку IFN $\gamma$  и ослабляет некоторые его эффекты), так и при индукции образования Th2-клеток. Однако в некоторых случаях (например, при индукции и усилении экспрессии на клетках молекул МНС-II) эти цитокины проявляют синергизм. Сочетание антагонизма и синергизма выявляют и в функциональных взаимоотношениях IL-4 с IL-2.

Подавляя активность макрофагов и синтез ими IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6 и других провоспалительных цитокинов, IL-4 выступает в роли противовоспалительного цитокина. В то же время он усиливает цитотоксическую активность макрофагов и миграцию нейтрофилов в очаг воспаления. Выступая в качестве основного фактора аллергических процессов, он способствует

развитию аллергического воспаления. Кроме того, IL-4 стимулирует гемопоэз, в частности выработку колониестимулирующих факторов. Описаны его противоопухолевые эффекты.

Таким образом, IL-4 возглавляет список Th2-цитокинов и факторов, индуцирующих неклассический тип воспаления — аллергическое воспаление. Он служит также главным ростовым цитокином В-клеток и фактором, ответственным за переключение изотипов, тем самым способствуя развитию гуморального иммунного ответа.

**IL-5.** Описан как дифференцировочный фактор В-лимфоцитов. Он представляет собой гомодимер с молекулярной массой 45–60 кДа. IL-5 имеет 3 участка гликозилирования. При массе каждой цепи в 22,5 кДа, только 12,5 кДа приходится на белковую часть.

Главный источник IL-5 — Th2-клетки. Его секретируют также тучные клетки и эозинофилы. Основные мишени IL-5 — эозинофилы и активированные В-клетки (активация способствует повышению числа высокоаффинных рецепторов на клетках). Способность IL-5 поддерживать пролиферацию В-лимфоцитов реализуется на более поздних стадиях развития, чем аналогичный эффект IL-4. Это действие в значительной степени косвенное — IL-5 усиливает экспрессию рецепторов для IL-2. IL-5 стимулирует дифференцировку В-лимфоцитов в плазматические клетки. Не влияя на переключение изотипов, этот цитокин повышает число продуцентов IgM, а также, действуя на посттранскрипционном уровне, усиливает выработку IgA. Тем самым IL-5 способствует защите слизистых оболочек, в которых IgA составляет основной изотип антител.

Однако главное проявление биологического действия IL-5 — его влияние на эозинофилы: он служит фактором выживаемости, роста, дифференцировки и хемотаксиса этих клеток. Выделяемый тучными и Th2-клетками в очаге аллергической реакции, IL-5 представляет главный фактор, ответственный за развитие отложенной фазы аллергической реакции немедленного типа, центральным событием которой является миграция в очаг поражения эозинофилов и некоторых других форм лейкоцитов.

Таким образом, IL-5, являясь цитокином с относительно узким спектром биологической активности, влияет на эозинофилы и В-клетки, продвинутые по пути дифференцировки в плазматические клетки.

**IL-13.** IL-13 относят к группе Th2-цитокинов. Его молекулярная масса составляет всего 10 кДа. Ген этого цитокина расположен на 5-й хромосоме в составе кластера Th2-цитокинов (наряду с IL-4, IL-5, IL-3, IL-9, IL-13, GM-CSF). Вероятно, этот ген является продуктом дубликации гена **IL4**. Вначале IL-13 считали «заместителем» IL-4, поскольку он способен воспроизводить многие его эффекты. Основой для этого предположения, наряду со структурной гомологией, послужило сходство строения рецепторов этих цитокинов, имеющих общую  $\alpha$ -цепь (IL-R4 $\alpha$ ), но вместо  $\gamma$ (с)-цепи (входит в состав рецептора IL-4) рецептор для IL-13 содержит собственную  $\alpha$ -цепь — IL-13R $\alpha$ .

IL-13 вырабатывают Th2-клетки, эозинофилы и тучные клетки. Спектр его эффектов весьма широк — мишенями IL-13 служат не только В-лимфоциты и эозинофилы (что обычно для Th2-цитокинов), но и гладкомышечные клетки, продуцирующие слизь бокаловидные и другие эпителиальные

клетки слизистых оболочек. Будучи способным воспроизводить большинство эффектов IL-4 при аллергии немедленного типа, IL-13 может выполнять при этих реакциях также более специальные функции. Так, он отвечает за усиление продукции слизи, спазм гладкой мускулатуры бронхов и, наконец, за изменение строения стенки бронхов, обозначаемое как ремоделирование (см. раздел 4.5.1.5.). В результате IL-13 рассматривают как наиболее важный и универсальный по спектру действия эффектор аллергических реакций немедленного типа.

### 3.6. ИММУННЫЙ ОТВЕТ

При адаптивном иммунном ответе происходит формирование эффекторных механизмов, направленных на защиту от конкретных возбудителей и других агентов, представляющих угрозу для организма. В отличие от врожденного иммунитета, эффекторные механизмы которого преобразованы и распознавание источника опасности только активизирует их, компоненты адаптивного иммунитета формируются заново при каждом попадании в организм чужеродных агентов (единственным «послаблением» служит ускоренное развитие иммунных процессов при повторном поступлении одних и тех же патогенов). Этот вариант иммунитета потому и называют адаптивным, что он приспособлен (адаптирован) для защиты от индивидуальных чужеродных организмов или их продуктов. Формой реализации этих адаптивных реакций и является иммунный ответ.

Иммунный ответ представляет собой реакцию преимущественно лимфоидной составляющей иммунной системы, однако его запуск и осуществление невозможны без участия факторов врожденного иммунитета. Их значение проявляется уже на начальном этапе иммунного ответа — при вовлечении в реакцию специфических клонов Т-хелперов, несущих рецепторы, специфически распознающие чужеродные эпитопы. Эти эпитопы могут быть распознаны только с участием АПК, прежде всего дендритных, которые являются частью подсистемы врожденного иммунитета. Презентация антигена должна сопровождаться коstimуляцией, которую осуществляют специальные молекулы, появляющиеся на поверхности антигенпрезентирующих клеток при условии их активации. Только при соблюдении этих условий происходит активация клонов Т-хелперов, распознающих чужеродные эпитопы, и их пролиферативная экспансия.

События, основанные на взаимодействии клеток врожденного и адаптивного иммунитета, которые обеспечивают распознавание чужеродных агентов и запуск иммунного ответа, рассмотрены в предыдущей главе. За ними следуют процессы, приводящие к формированию эффекторных клеток, участвующих в разрушении патогена и его удалении из организма. Конкретные пути и формы реализации этих процессов могут значительно различаться в зависимости от локализации патогена (табл. 3.26). Внеклеточные возбудители, а также их растворимые продукты (токсины), доступны для специфических гуморальных факторов иммунитета — антител. Именно поэтому адекватной формой ответа на такие возбудители служит гуморальный иммунный ответ. Патогены, локализующиеся в цитоплазматических гранулах (в частности фагоцитируемые, но устойчивые

к действию бактерицидных факторов), недоступны для антител. Однако они могут быть разрушены при стимуляции бактерицидной активности фагоцитов провоспалительными факторами. Адекватная форма иммунного ответа на возбудители этого типа — воспалительный вариант клеточного иммунного ответа. При интеграции генов возбудителя (вируса) в геном клетки или при локализации патогена в цитозоле единственным эффективным способом защиты становится уничтожение инфицированной клетки. Эта форма защиты реализуется в форме цитотоксического варианта клеточного иммунного ответа.

**Таблица 3.26.** Типы иммунного ответа, определяемые локализацией патогена

Локализация патогена	МНС, презентующий антиген	Корецептор, участвующих в распознавании	Т-хелперы	Формируемые эффекторы	Эффекторные факторы
Внеклеточная (микроорганизмы)	II	CD4	Th2	Антитело-продуценты	Антитела, комплемент
Внеклеточная (макропаразиты)	II	CD4	Th2	Эозинофилы и др.	Цитотоксические белки, антитела
Внутриклеточная (цитозоль)	I	CD8	Th1	Цитотоксические Т-лимфоциты	Факторы контактного цитолиза
Внутриклеточная (гранулы)	II	CD4	Th1	Макрофаги	Цитокины, бактерицидные факторы фагоцитоза

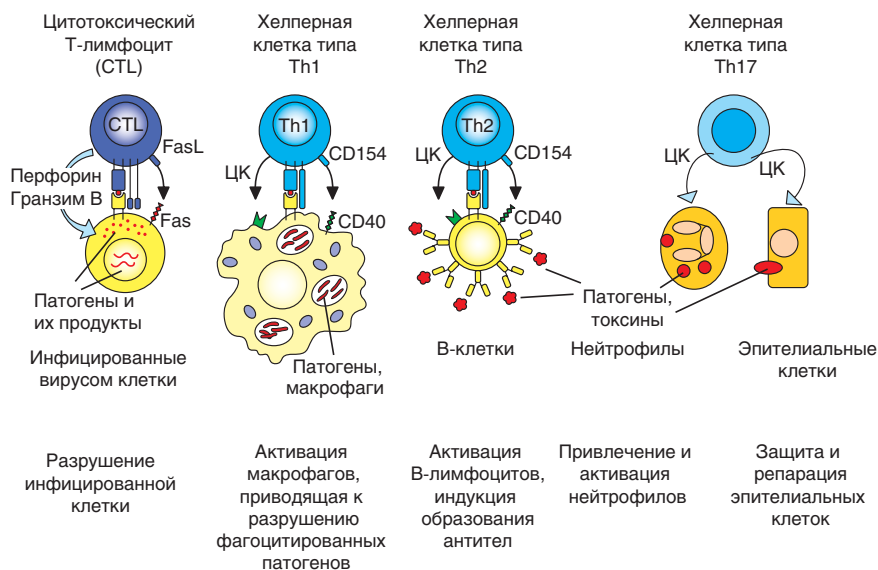
Выбор формы иммунного ответа происходит в период его запуска путем индукции развития преимущественно тех субпопуляций Т-хелперов, которые способны обеспечить ту или иную форму защиты и способствовать вовлечению в иммунный ответ различных предшественников эффекторных клеток. Выбор направления дифференцировки Т-хелперов рассмотрен в главе 3.4. Он диктуется, с одной стороны, свойствами антигенов возбудителей, с другой — дополнительными факторами (пути поступления патогена, его способность взаимодействовать с различными клетками врожденного иммунитета и т.д.). Правильность выбранной иммунной системой формы иммунной защиты и ее адекватность особенностям возбудителя — ключевые моменты, определяющие успешность защиты. В случае отсутствия такой адекватности возникает задача коррекции направления иммунной защиты, требующая точных знаний о механизмах различных форм иммунного ответа.

Любой иммунный ответ включает две основные фазы — индуктивную и эффекторную. Содержанием индуктивной фазы являются восприятие антигенного стимула лимфоцитами (достигаемое презентацией антигена) и дифференцировка эффекторных клеток. На осуществление этих процес-

сов требуется примерно 1 неделя. Содержание эффекторной фазы состоит в осуществлении защитных реакций эффекторными клетками; в случае гуморального иммунитета она включает также выработку антител и поэтому называется еще продуктивной фазой ответа. Эффекторная фаза реализуется в последующие 1–2 нед. После реализации иммунного ответа, т.е. элиминации чужеродных антигенов и их носителей, происходит запуск регуляторных (ограничительных) механизмов, приводящих к устранению морфологических и метаболических последствий иммунного ответа. В иммунной системе сохраняется «след» иммунного ответа в виде иммунологической памяти, носителями которой служат Т- и В-клетки памяти.

### 3.6.1. Клеточный иммунный ответ

Из сказанного выше следует, что клеточный иммунный ответ, осуществляемый Т-лимфоцитами, направлен на защиту от внутриклеточных патогенов. В зависимости от локализации патогенов в цитозоле или в гранулах различают 2 варианта клеточного иммунного ответа — цитотоксический и воспалительный. Характер иммунного ответа в наибольшей степени зависит от доминирующего направления дифференцировки Т-клеток, играющих универсальную роль в развитии иммунного ответа: они выступают в качестве не только хелперов и регуляторов, но и эффекторов, выполняющих собственные защитные функции. На рис. 3.105 представлены 4 основных типа эффекторных Т-клеток, определяющих развитие иммунного ответа во всех его вариантах.



**Рис. 3.105.** Типы эффекторных Т-клеток и их функции. Взаимодействие адаптивных Т-клеток с эффекторами или мишенями, имеющими отношение к реализации иммунной защиты

**3.6.1.1. Цитотоксический Т-клеточный иммунный ответ**

Цитотоксический иммунный ответ осуществляют Т-лимфоциты, экспрессирующие корецептор CD8. Это определяет главную особенность процесса распознавания антигенов при цитотоксическом ответе: антигенный пептид презентуется в составе молекул МНС-I (поскольку именно к этим молекулам проявляет сродство корецептор CD8). Особая важность этого варианта распознавания обусловлена тем, что, в отличие от молекул МНС-II, молекулы МНС-I локализуются на всех ядродержащих клетках организма, а не только на специализированных АПК (см. раздел 3.2.2.1). Вторая особенность этой формы иммунного ответа состоит в том, что в основе его эффекторных механизмов лежит контактный цитолиз, т.е. та же форма цитолиза, которая характерна для естественных киллеров — лимфоидных клеток врожденного иммунитета. Фактически цитотоксические Т-лимфоциты дублируют функции естественных киллеров, однако Т-клетки реализуют контактный цитолиз на основе специфического распознавания конкретных антигенов возбудителя и формируют иммунологическую память (табл. 3.27).

**Таблица 3.27.** Естественные и индуцированные цитотоксические Т-лимфоциты

Тип цитолиза	Эффектор-ные клетки	Распознава-мые молекулы	Роль распозна-вания МНС-I	Механизм цитолиза	Клональ-ность	Па-мять
Естест-венный цитолиз	НК-клетки (естест-венные киллеры)	Стрессор-ные молекулы (активирую-щее действие), молекулы МНС-I (инги-бирующее действие)	Подавляет реакцию	Контакт-ный цитолиз с участием перфори-на и гран-зимов	Нет	Нет
Иммун-ный цитолиз	CD8 <sup>+</sup> цитоток-сические Т-лимфо-циты	Комплекс антигенного пептида и МНС-I	Обеспе-чивают пре-зентацию антигенного пептида	Контакт-ный цитолиз с участием перфори-на и гран-зимов. Fas-зави-симый апоптоз	Есть	Есть

**Цитотоксический иммунный ответ проходит в 4 этапа** (рис. 3.106)

- I. Презентация дендритными клетками антигена CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам, приводящая к их активации.
- II. IL-2-зависимая пролиферация CD8<sup>+</sup> Т-клеток, аутокринная или индуцируемая CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами.
- III. Дифференцировка CD8<sup>+</sup> Т-клеток в цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), сопутствующая пролиферации.
- IV. Реализация цитолиза клеток-мишеней.

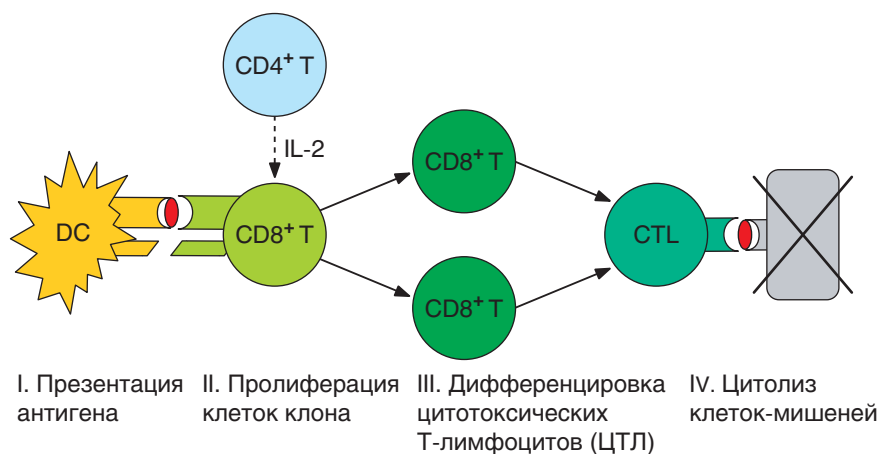


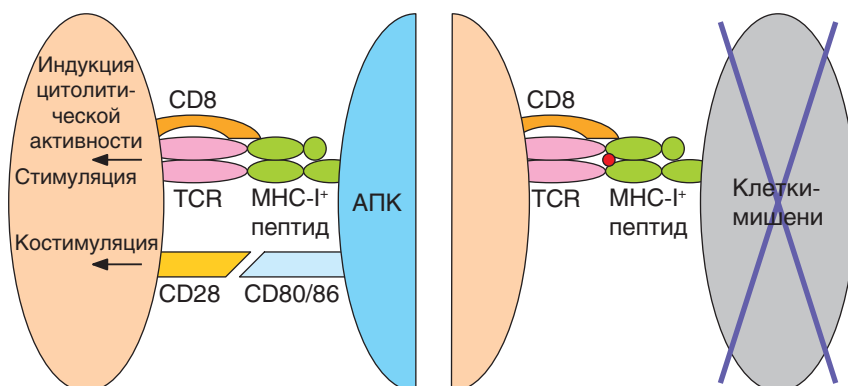
Рис. 3.106. Схема развития цитотоксического Т-клеточного ответа

### **Распознавание антигенного пептида и активация $CD8^+$ Т-клеток**

Вирусом может быть инфицирована практически любая клетка организма. Однако запуск цитотоксического иммунного ответа при контакте  $CD8^+$  Т-лимфоцита с любой инфицированной клеткой, не являющейся при этом АПК, невозможен в связи с отсутствием костимуляции. Активация  $CD8^+$  Т-клетки с последующей дифференцировкой в Т-киллер (цитотоксический Т-лимфоцит) возможна только при презентации ей АПК антигенного пептида в составе молекулы МНС-I (при первичном иммунном ответе — дендритной).

Канонический механизм включения антигенного пептида в молекулу МНС-I может быть реализован только при инфицировании АПК, что действительно может иметь место, но происходит не при любой вирусной инфекции. В типичном случае вирус или его антигены попадают в АПК в результате эндоцитоза (пино- или фагоцитоза) и оказываются в компартменте МПС, что приводит к встраиванию антигенного пептида в молекулы МНС-II. Противоречие разрешается благодаря срабатыванию механизма перекрестной презентации, состоящего в транспортировке антигенного материала из компартмента МПС в цитозоль или непосредственно в эндоплазматический ретикулум, в котором происходит встраивание фрагментов антигена внеклеточного происхождения в молекулы МНС-I. Это создает возможность распознавания такого пептида  $CD8^+$  Т-клетками — будущими цитотоксическими Т-лимфоцитами.

Презентация антигенного пептида  $CD8^+$  Т-клеткам происходит практически так же, как и презентация пептидов  $CD4^+$  Т-клеткам (см. раздел 3.5.1). Отличие заключается в том, что в распознавании комплекса пептид—МНС-I в качестве корецептора участвует молекула CD8 (рис. 3.107). В соответствии с особенностями строения антигенсвязывающей щели (закрытый тип — см. раздел 3.2.2.2) пептид, встраиваемый в молекулу МНС-I, имеет более стандартный размер (8–10 остатков), заякорен в двух позициях и не выходит за пределы щели. Расположение варьирующих остатков, формирующих участки, распознаваемые TCR и корецептором  $CD8^+$  Т-клетки в молекуле МНС-I отличается от такового в молекуле МНС-II. Презентация



**Рис. 3.107.** Особенности распознавания антигена при indukции развития цитотоксических Т-лимфоцитов и реализации их эффекторного действия. При indukции цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа необходимы не только распознавание антигенного пептида в составе молекулы МНС-I, но и костимуляция. При реализации цитолиза требуется распознавание антигена, но не костимуляция

пептида  $CD8^+$  Т-клетке также осуществляется с участием иммунного синапса и включает обязательную костимуляцию за счет взаимодействия молекулы  $CD28$  Т-лимфоцита с костимулирующими молекулами  $CD80$  и  $CD86$  АПК. Гуморальным факторам, вырабатываемым дендритными клетками ( $IL-12$ ,  $IFN\alpha$ ), принадлежит вспомогательная роль в костимуляции. Сигнальные пути, приводящие к активации  $CD8^+$  Т-клеток, идентичны таковым для  $CD4^+$  Т-клеток, поскольку оба типа корецепторов ( $CD4$  и  $CD8$ ) ассоциированы с одними и теми же тирозинкиназами  $Lck$ . Известно, что часть  $CD8^+$  Т-клеток не экспрессирует  $CD28$ . Механизм презентации антигена таким клеткам не установлен. По некоторым данным,  $CD8^+CD28^-$  Т-лимфоциты являются не эффекторными, а регуляторными Т-клетками.

#### **Роль Т-хелперов и $IL-2$ в ответе $CD8^+$ Т-клеток**

Долгое время участие  $CD4^+$  Т-хелперов в развитии цитотоксического ответа подвергали сомнению. Однако в настоящее время показано, что для развития эффективного противовирусного ответа  $CD8^+$  Т-клетки должны получить стимулы от  $CD4^+$  Т-клеток. Они включают контактную и гуморальную составляющие. Контактные стимулы Т-хелперы передают через костимулирующую молекулу  $CD40$ , гуморальные — через рецепторы для  $IL-2$ .

Спектр генов, экспрессируемых при активации  $CD8^+$  и  $CD4^+$  Т-клетками, сходен, но не идентичен. Помимо включения в случае  $CD8^+$  клеток дифференцировочной программы, обеспечивающей реализацию механизмов цитолиза, эта разница касается преимущественно степени экспрессии гена ***IL2***. Активированные  $CD8^+$  Т-клетки экспрессируют в большом количестве  $\alpha$ -цепь рецептора для  $IL-2$ , что приводит к формированию его высокоаффинной формы. Однако сам ген ***IL2*** экспрессируется слабее, чем в  $CD4^+$  Т-клетках. Выраженность экспрессии гена ***IL2*** зависит от интенсивности стимуляции дендритными клетками в процессе презентации

антигена. В результате уровень секреции IL-2 может существенно варьировать и в разной степени обеспечивать потребность в этом цитокине на этапе пролиферативной экспансии клонов Т-лимфоцитов.

Именно степень самообеспечения активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток аутокринным ростовым фактором (IL-2) определяет роль Т-хелперов в развитии цитотоксических Т-лимфоцитов и цитотоксического иммунного ответа в целом. Если CD8<sup>+</sup> Т-клетки при распознавании презентируемого им дендритными клетками пептида получают достаточно сильный сигнал, развивающиеся цитотоксические Т-лимфоциты активно секретируют IL-2 и полностью обеспечивая свою потребность в этом факторе. При более слабой стимуляции синтез IL-2 Т-киллерами менее интенсивный, поэтому возникает потребность в экзогенном IL-2, источником которого служат CD4<sup>+</sup> Т-хелперы. Этим роль Т-хелперов в цитотоксическом ответе не ограничивается. Они секретируют IFN $\gamma$ , усиливающий экспрессию молекул МНС обоих классов. Действуя на дендритные или другие АПК, IFN $\gamma$  повышает число мембранных молекул МНС-I на их поверхности, что влечет за собой повышение числа мембранных молекул, несущих антигенный пептид, а следовательно увеличивает число взаимодействий с TCR и делает передачу сигнала более интенсивной. Аналогичным действием обладают интерфероны класса I, продуцируемые плазматоидными дендритными клетками и макрофагами. IL-12, секретируемый макрофагами и дендритными клетками, усиливает экспрессию как молекул МНС, так и костимулирующих молекул. В результате повышения эффективности презентации CD8<sup>+</sup> Т-клетки получают стимул, достаточный для индукции синтеза необходимого количества IL-2.

Таким образом, хотя CD8<sup>+</sup> Т-клетки, вовлекаемые в цитотоксический иммунный ответ, способны действовать самостоятельно, они могут нуждаться в помощи со стороны Т-хелперов, дендритных клеток и макрофагов. Прежде всего эта помощь состоит в обеспечении CD8<sup>+</sup> Т-клеток ростовым фактором IL-2 для эффективной пролиферативной экспансии клонов, участвующих в иммунном ответе. В качестве ростового фактора для активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток могут выступать некоторые другие цитокины (IL-7, IL-15, IL-4) или их комбинации. Трудно сказать, насколько велик вклад этих цитокинов в физиологических условиях развития цитотоксического иммунного ответа. В отсутствие IL-2 (например, при нокауте его гена) цитотоксический ответ ослабляется, но не очень сильно.

Пролиферативная экспансия клонов CD8<sup>+</sup> Т-клеток длится 5–7 сут, за которые клетки проходят 6–8 делений. При вирусных инфекциях эти лимфоциты осуществляют 15–20 делений за несколько более длительный период. Интенсивность деления активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток выше, чем любых других лимфоцитов, вовлекаемых в иммунный ответ. Пролиферация обеспечивает увеличение численности цитотоксических Т-клеток в 50 000 раз, чего достаточно для реализации их эффекторной функции. При острых вирусных инфекциях у мышей пик численности цитотоксических Т-лимфоцитов достигается уже на 7-е сутки, а к 15-м суткам их количество снижается.

### *Цитотоксические Т-лимфоциты*

Как и в случае Т-хелперов, дифференцировка цитотоксических Т-лимфоцитов начинается в процессе их пролиферативной экспансии. Основа этого

процесса — экспрессия комплекса генов, кодирующих молекулы, которые обеспечивают реализацию цитотоксической функции, прежде всего белков перфоринового комплекса и Fas-лиганда. Дифференцировка слабо влияет на морфологию клетки. Цитотоксический Т-лимфоцит имеет несколько больший размер, чем наивный  $CD8^+$  Т-лимфоцит и, что особенно существенно, содержит в цитоплазме лизосомоподобные гранулы. В гранулах содержатся белки, участвующие в реализации цитолиза — перфорин, гранзимы, гранулизин, их мембраны несут белок CD107.

В процессе дифференцировки цитотоксических Т-лимфоцитов существенно изменяется экспрессия ими мембранных молекул. Для любых эффекторных Т-клеток (а также Т-клеток памяти) характерно изменение структуры мембранной молекулы CD45. Выше (см. раздел 3.4.2.1) эта молекула упоминалась в связи с ее участием в активации Т-клеток. При дифференцировке Т-клеток в эффекторы и клетки памяти происходят изменения во внеклеточных доменах молекулы CD45. Внеклеточную часть этой очень большой молекулы кодируют 7 экзонов. Три из них (как и кодируемые ими домены с содержащимися в них эпитопами) обозначают буквами А, В и С. В наивных Т-клетках транскрибируемая мРНК транслируется в полном объеме и формируется белок, содержащий домены (и, соответственно, антигенные эпитопы) А, В и С.

В процессе дифференцировки в эффекторные клетки происходит сплайсинг участков РНК, кодируемых экзонами сначала А, затем В и, наконец, С. Соответственно белковый продукт лишается доменов А, В и С. Продукт, содержащий все названные домены, обозначают как CD45RA (молекулярная масса — 220 кДа), промежуточные продукты — CD45RB и CD45RC (соответственно 200 кДа и 190 кДа), а продукт конечной модификации РНК, лишенный всех названных доменов, называют CD45R0 (180 кДа). Наивные Т-клетки экспрессируют CD45RA, эффекторные Т-клетки — различные переходные формы и CD45R0, Т-клетки памяти — только CD45R0.

Изменения затрагивают также комплекс мембранных молекул, определяющих направление миграции клеток. Молекулы, свойственные наивным Т-клеткам («рецептор хоминга» во вторичные лимфоидные органы CD62L, хемокиновый рецептор CCR7, направляющий клетки в Т-зоны), исчезают и заменяются другими. Эффекторные клетки приобретают  $\beta_1$ -интегрины (в частности, VLA-4), а также —  $\beta_7$ -интегрины ( $\alpha_E\beta_7$ -интегрин направляет миграцию в слизистые оболочки, а  $\alpha_4\beta_7$ -интегрин — только в их кишечный отдел — см. раздел 3.6.5.3). В ходе дифференцировки цитотоксических Т-лимфоцитов усиливается экспрессия ими  $\beta_2$ -интегрин LFA-1 — функционально важной молекулы, обеспечивающей контакт с клеткой-мишенью. Этот интегрин впервые обнаружили именно на цитотоксических Т-лимфоцитах и его название — функциональный антиген лимфоцитов (*Lymphocyte functional antigen*) — отражает его роль в реализации киллерной функции Т-клеток. Хемокиновый рецептор CCR7 практически исчезает с поверхности Т-киллеров и заменяется рецепторами CCR4, CCR6 и других цитокинов, обуславливающих миграцию клеток не в лимфоидные органы, а в барьерные ткани и очаги воспаления.

#### **Иммунный Т-клеточный цитолиз**

Цитолиз клеток-мишеней цитотоксическими Т-лимфоцитами осуществляется с использованием механизмов, практически идентичных тем, кото-

рые реализуются при цитолизе, осуществляемом естественными киллерами. Цитоллиз клеток Т-лимфоцитами происходит также в 4 этапа:

- распознавание клетки-мишени;
- формирование конъюгата киллера и клетки-мишени с их поляризацией;
- экзоцитоз гранул (программирование лизиса);
- индукция гибели клетки-мишени.

Распознавание цитотоксическим Т-лимфоцитом клетки-мишени осуществляется с участием практически тех же молекул, которые формируют иммунный синапс при презентации антигенного пептида АПК. Центральное событие при этом — распознавание комплекса антигенного пептида с молекулой МНС-I, осуществляемое TCR и корцептором CD8. Наиболее существенное отличие состоит в том, что клетки-мишени лишены костимулирующих молекул, и поэтому костимуляция при распознавании клетки-мишени отсутствует (см. рис. 3.108).

Как и при цитолизе, осуществляемом естественными киллерами, между цитотоксическим Т-лимфоцитом и клеткой-мишенью формируется синапс, называемый цитолитическим (см. раздел 2.5.4.2, рис. 2.36). Формирование синапса также происходит с участием мембранных рафтов. Прочность синапса определяют молекулы адгезии, локализованные вначале в центре синапса, а затем оттесняемые на периферию. Обычно при формировании синапса основную роль в адгезии играют молекулы  $\beta_2$ -интегрина LFA-1 на Т-клетке и его рецептор ICAM-1 — на клетке-партнере. При взаимодействии цитотоксического Т-лимфоцита с клеткой-мишенью вовлечение этой пары молекул лимитируется экспрессией ICAM-1. Являясь активационной молекулой, ICAM-1 не всегда присутствует на клетках-мишенях. Однако в условиях трансформации (например, опухолевой) ICAM-1 экспрессируется на поверхности клетки. Более стабильно участие в формировании синапса молекул CD2 (на Т-клетке) и CD58 (на клетке-мишени), поскольку CD58 присутствует на большинстве клеток. Определенную роль в формировании синапса могут играть  $\beta_1$ -интегрины, в частности VLA-4, которые появляются в ходе дифференцировки на поверхности цитотоксических Т-клеток. Центральная часть синапса, как обычно, занята молекулами, осуществляющими специфическое распознавание — TCR и CD8 на Т-клетке и МНС-I, несущей антигенный пептид, на клетке-мишени. Цитолитический синапс в данном случае ориентирован преимущественно на организацию цитолитического процесса. Происходит поляризация Т-клетки (как и клетки-мишени) и ориентация элементов ее цитоскелета (микротрубочек и микрофиламентов) на осуществление экзоцитоза. Одновременно происходит формирование в синапсе микрополости, в которую секретируются перфорин и гранзимы. Благодаря формированию центра, организующего микротрубочки (MTOS — *Microtubule-organizing center*), перфоринсодержащие гранулы перемещаются к мишени и освобождают свое содержимое в полость, сформированную в зоне контакта клеток.

Перфорин, поступающий в микрополость, в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  изменяет свою конформацию: на поверхности молекулы экспонируются гидрофобные участки, позволяющие перфोरину внедриться в мембрану клетки-мишени, где он полимеризуется. Обычно возникает канал диамет-

ром около 16 нм (10–20 нм), включающий 10–20 молекул перфорины. Через такие каналы в клетку проникает гранзим В, который, являясь протеазой хемотрипсинового типа, расщепляет внутриклеточные сериновые протеазы (каспазы), запуская тем самым механизм апоптоза клетки-мишени. Одна из его мишеней — исполнительная каспаза 3. Наиболее важным является действие гранзима В на фактор Bid, включающий митохондриальный путь апоптоза. Гранулизин способствует запуску апоптоза через сфингомиелиновый механизм (см. раздел 3.4.1.5). Этап проникновения в клетку-мишень ферментов, индуцирующих апоптоз, традиционно называют программированием лизиса. Этот термин подчеркивает, что клетка-мишень еще жива, но уже обречена: ее отсоединение от цитотоксического Т-лимфоцита не предотвращает лизис. После отделения от обреченной клетки-мишени цитотоксический Т-лимфоцит может совершить еще несколько цитолитических актов (феномен рециклинга Т-киллеров).

После реализации цитолиза по перфоринзависимому механизму на поверхности цитотоксического Т-лимфоцита остается метка в виде молекулы CD107 (LAMP — *Lysosome-associated membrane protein*) — белка, содержащегося в мембране цитотоксических гранул (и вообще лизосом). При экзоцитозе CD107 выносится на поверхность клетки и некоторое время присутствует в составе наружной мембраны. Благодаря этой метке удастся определить численность цитотоксических Т-лимфоцитов (а также естественных киллеров), выполнивших свою функцию.

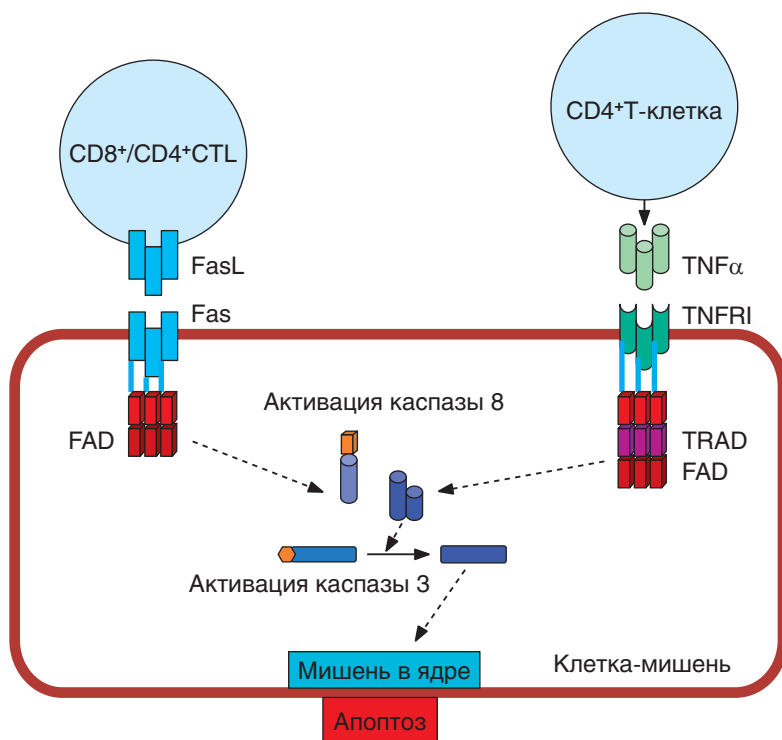
#### ***Fas-зависимый цитолиз***

Цитотоксические Т-лимфоциты используют еще один механизм контактного киллинга, причем в большей степени, чем естественные киллеры. Его суть состоит в передаче летального сигнала без экзоцитоза гранул — путем прямого контактного взаимодействия клеток, реализуемого через специализированные рецепторы и лиганды. При этом включается рецепторный механизм индукции апоптоза (рис. 3.108).

Реализация апоптотического механизма цитолиза клетки-мишени при действии цитотоксических Т-лимфоцитов происходит с участием Fas-лиганда, экспрессируемого Т-клеткой, и Fas-рецептора клетки-мишени. Наличие этого рецептора на поверхности клетки-мишени служит условием реализации данного механизма апоптоза. Fas-рецептор, относимый к активационным молекулам, присутствует на поверхности многих клеток человека и млекопитающих. Его экспрессии способствует инфицирование вирусом и опухолевая трансформация. Реже апоптоз клеток-мишеней вызывает TNF $\alpha$  при условии его распознавания рецептором I типа — TNFR1 (p55). Этот вариант апоптоза больше характерен для CD4<sup>+</sup> Т-клеток, в определенных обстоятельствах способных индуцировать программированную гибель клеток.

#### ***Миграция клеток при цитотоксическом иммунном ответе***

Цитотоксический клеточный иммунный ответ участвует преимущественно в защите от вирусных инфекций, а также от некоторых одноклеточных патогенов (лямблии, трихомонады). Кроме того, ему принадлежит важная роль в противоопухолевой защите. Источником антигенов при этом служат ткани, пораженные внутриклеточными патогенами данного типа —



**Рис. 3.108.** Механизмы реализации цитотоксического эффекта через индукцию апоптоза (см. также рис. 3.66 и 3.67)

чаще всего эпителий барьерных тканей (слизистой оболочки респираторного тракта) или солидных органов (например, печени). Отсюда дендритные клетки доставляют антигенные пептиды в лимфоидные органы, в типичном случае — в региональные лимфатические узлы. В Т-зонах этих органов (паракортикальных зонах лимфоузлов, параартериальных муфтах селезенки) антигены презентруются одновременно  $CD8^+$  и  $CD4^+$  Т-клеткам. Здесь же происходит пролиферативная экспансия клонов и дифференцировка цитотоксических Т-лимфоцитов.

Благодаря смене мембранных молекул адгезии и хемокиновых рецепторов, о чем говорилось выше, цитотоксические Т-лимфоциты мигрируют в нелимфоидные ткани, преимущественно барьерные. В эпителии слизистой оболочки кишечника они составляют преобладающий клеточный тип (закономерности расселения эффекторных клеток и клеток памяти будут рассмотрены далее — см. раздел 3.6.5.3).

В очагах инфицирования вирусами и другими патогенами цитотоксические Т-лимфоциты реализуют иммунный цитолиз. Поскольку его основные варианты сводятся к индукции апоптоза клеток-мишеней, которые удаляются путем фагоцитоза еще до их распада, цитолиз не сопровождается развитием воспалительной реакции и повреждением тканей.

Цитотоксические реакции, осуществляемые естественными киллерами и цитотоксическими Т-лимфоцитами, отличаются друг от друга в основном

специфичностью цитолиза (Т-клетки атакуют клетки, презентующие в составе МНС-I чужеродные пептиды). Таким образом, клетки адаптивного иммунитета используют эффекторную реакцию, сформировавшуюся в рамках врожденного иммунитета, проявляя при этом более высокую избирательность, прицельность действия. Другое приобретение адаптивного иммунитета — формирование иммунологической памяти, благодаря чему при повторном инфицировании тем же вирусом пораженные клетки устраняются быстрее и эффективнее.

После успешного завершения цитотоксического иммунного ответа происходит быстрая и радикальная ликвидация последствий реакции для самой иммунной системы — устранение последствий интенсивной экспансии клонов цитотоксических Т-лимфоцитов, участвовавших в иммунном ответе. В течение нескольких дней после завершения ответа 90–95% цитотоксических Т-лимфоцитов подвергается апоптозу. В то же время завершается формирование популяции  $CD8^+$  Т-клеток памяти, которые сами по себе лишены цитотоксической активности, но быстро приобретают ее при повторном распознавании специфического антигена.

#### 3.6.1.2. Воспалительный Т-клеточный иммунный ответ

Эта форма иммунного ответа предназначена для защиты от внутриклеточных патогенов, локализующихся в цитоплазматических гранулах — микроорганизмов, фагоцитированных клетками, но не разрушенных из-за недостатка адекватных эффекторных механизмов или их блокады патогенами. Типичные представители таких патогенов — различные виды микобактерий, а также многие простейшие (например, лейшмании, хламидии), риккетсии, плазмодии, грибы (кандиды) и др.

Клеточный иммунный ответ воспалительного типа осуществляется в 4 этапа (рис. 3.109).

- I. Презентация дендритными клетками антигена  $CD4^+$  Т-лимфоцитам, приводящая к их активации.
- II. Развитие хелперных Т-лимфоцитов типа Th1.
- III. Презентация антигена макрофагами ранее сформировавшимся Т-хелперам (Th1-типа), их взаимная активация и выделение цитокинов.
- IV. Активация цитолиза в фагосомах макрофагов.

За реализацию этой формы защиты отвечают Th1-клетки и макрофаги. Th1-клетки формируются на этапе запуска иммунного ответа и отвечают за специфическую составляющую реакции (распознавание антигена и направление реакции на его носителя). Макрофаги выступают в качестве эффекторных клеток. Начальный этап реакции против внутриклеточных патогенов, локализованных в фаголизосомах, осуществляется так же, как при запуске любой формы иммунного ответа: дендритные клетки, захватившие патоген или его фрагмент, презентуют антигенный пептид  $CD4^+$  Т-клеткам, которые активируются, пролиферируют и дифференцируются в хелперные Т-лимфоциты. Уже на этапе распознавания антигена происходит ориентация дифференцировки  $CD4^+$  Т-лимфоцитов в хелперы Th1-типа, которая затем поддерживается цитокинами, продуцируемыми дендритными клетками — IL-12,  $IFN\gamma$  (см. раздел 2.5.5.5).

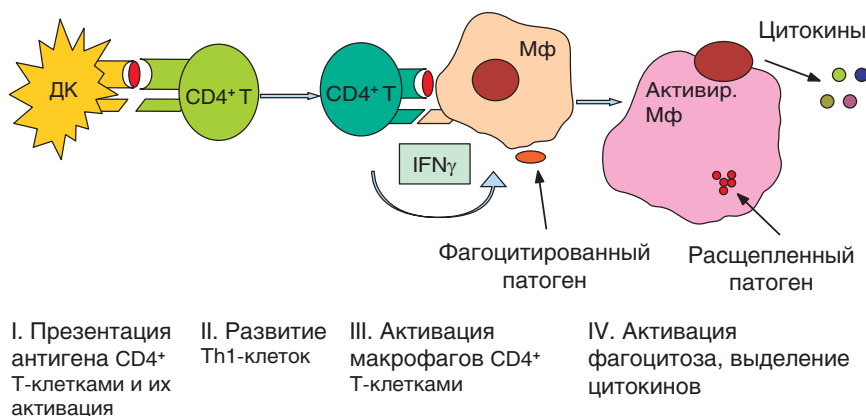


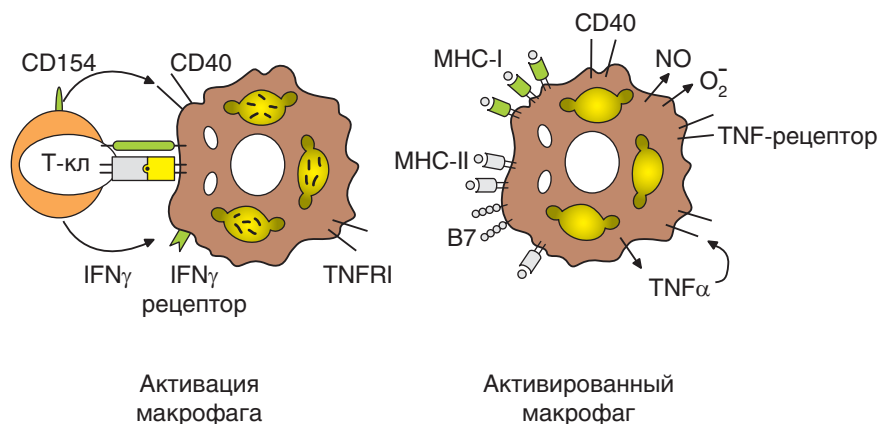
Рис. 3.109. Схема развития клеточного иммунного ответа воспалительного типа

### Активирующее взаимодействие Th1-клеток с макрофагами

Этот этап характерен именно для воспалительного иммунного ответа. Он состоит во взаимодействии специфических Th1-клеток с макрофагами, которые содержат на своей поверхности молекулы МНС-II, несущие пептидный фрагмент антигена. При взаимодействии формируется иммунный синапс. В результате генерируются активирующие сигналы, направленные как в Th1-клетку, так и в макрофаг. В Th1-лимфоцит сигналы поступают через молекулы TCR/CD4 и CD28. В результате этой повторной стимуляции Т-клетки (первая стимуляция была вызвана презентацией антигена дендритной клеткой) происходит усиление выработки цитокинов, важных для реализации последующих событий (в частности IFN<sub>γ</sub> и TNF<sub>α</sub>).

Стимуляция макрофага при взаимодействии с Th1-клеткой реализуется с помощью двух механизмов (рис. 3.110). Один из них — контактный — через костимулирующую молекулу CD40, с которой связывается ее лиганд CD154. CD40 спонтанно экспрессируется макрофагами, тогда как ее лиганд появляется на поверхности Th1-клеток в результате активации при формировании иммунного синапса. В передаче сигнала от молекулы CD40 участвуют адапторные факторы TRAF-1, TRAF-2, TRAF-6. В результате происходит активация фактора NF-κB и запуск Рас-зависимой ветви MAP-каскада, завершающейся формированием транскрипционного фактора c-Jun. Второй механизм активации опосредуется IFN<sub>γ</sub>. При связывании этого цитокина с рецептором включается сигнальный путь, вовлекающий киназы Jak1 и Jak2, транскрипционный фактор STAT1, а также дополнительные пути с участием MAP-каскада.

Результат активации макрофагов — экспрессия многочисленных генов, приводящая к повышению содержания на поверхности клетки молекул МНС-I и особенно МНС-II, сборке NADPH-оксидазы, активации ферментов окислительного метаболизма. Наиболее специфичное проявление ответа макрофагов на стимулирующее действие IFN<sub>γ</sub> — экспрессия гена индуцибельной NO-синтазы. Именно NO и его производные, такие



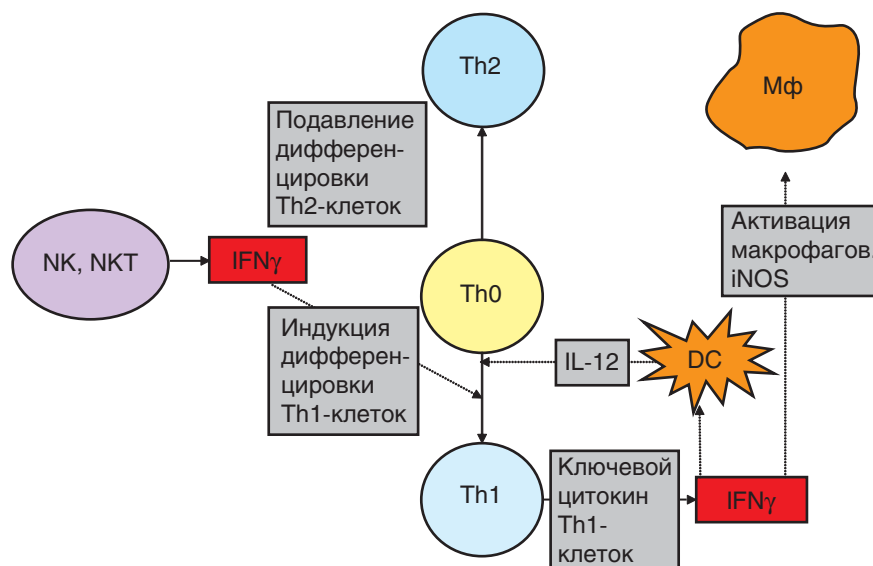
**Рис. 3.110.** Активация макрофагов Т-хелперами. Показаны механизмы воздействия Th1-клеток на макрофаги (контактный и опосредованный цитокинами), а также индуцируемые Т-клетками проявления активации макрофагов

как пероксинитрит ( $\text{OO}^*\text{NO}$ ), вызывают гибель микобактерий и других внутриклеточных патогенов, сохранявшихся и даже размножавшихся в фагосомах. Все эффекты  $\text{IFN}\gamma$ , в том числе способность индуцировать образование NO-синтазы, усиливаются  $\text{TNF}\alpha$ , продуцируемым как Th1-клетками, так и самими макрофагами. Эффективность действия цитокинов, вырабатываемых Th1-клетками, существенно повышается в связи с сосредоточением их секреции в области контакта с макрофагами. Это, кроме того, уменьшает активацию посторонних клеток и их повреждение. Для обеспечения этой ориентированной секреции необходима поляризация клеток в ходе формирования иммунного синапса.

Особого внимания заслуживает взаимодействие цитокинов IL-12 и  $\text{IFN}\gamma$  при воспалительном иммунном ответе (рис. 3.111). Экспрессия IL-12 в макрофагах индуцируется при связывании PAMP с TLR. Экспрессия гена *IL12* — один из результатов сигнального пути, вовлекающего адапторный белок MyD88 и транскрипционный фактор NF- $\kappa\text{B}$ . IL-12 играет решающую роль в индукции дифференцировки Th1-клеток и стимулирует выработку этими клетками  $\text{IFN}\gamma$ , один из важнейших эффектов которого — усиление выработки макрофагами IL-12. Таким образом, эти цитокины вместе с рецепторами и сигнальными путями, ответственными за экспрессию их генов, образуют единую функциональную систему, которой принадлежит ключевая роль в реализации воспалительной формы клеточного иммунного ответа. Дефекты в любом звене этой системы приводят к развитию иммунодефицитов, сопровождающихся повышенной чувствительностью к микобактериям и другим патогенам, в ответ на которые вовлечены Th1-клетки и макрофаги.

#### **Воспалительная составляющая Th1-клеточного иммунного ответа**

В отличие от цитотоксического иммунного ответа, не связанного очевидным образом с воспалительной реакцией, иммунный ответ, опосредованный Th1-клетками, полностью реализуется в ее рамках. Запуск ответа происходит по классической схеме. В очаге инфицирования (обычно в



**Рис. 3.111.** Роль интерферона  $\gamma$  в дифференцировке и реализации функций Т-хелперов. Интерферон  $\gamma$ , продуцируемый клетками врожденного иммунитета, определяет направление развития адаптивного иммунного ответа, в ходе которого он также секретируется Th1-клетками и активирует основные эффекторы воспалительной формы клеточного ответа — макрофаги

барьерных тканях) дендритные клетки поглощают патоген или его фрагмент и транспортируют его в региональный лимфатический узел или иные вторичные лимфоидные органы. Дифференцировавшиеся специфические Th1-клетки поступают в рециркуляцию. Подобно цитотоксическим Т-лимфоцитам, они утрачивают мембранные молекулы, направляющие их миграцию в лимфоидные органы (CD62L, CCR7) и приобретают обычные свойства эффекторных клеток, включая усиленную экспрессию мембранных интегринов (LFA-1, VLA-4) и рецепторов для хемокинов, секретируемых в очагах воспаления и барьерных тканях (для Th1-клеток — CXCR3, CCR5, CCR2 и др.).

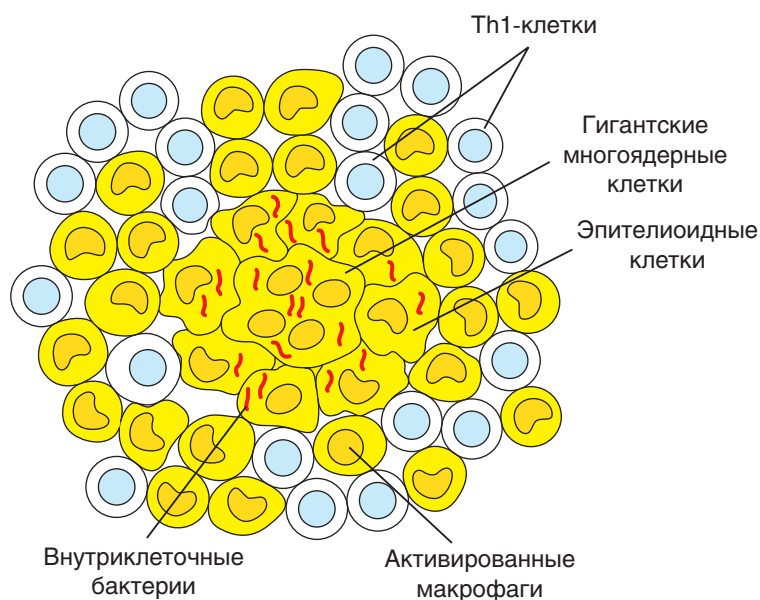
Оказавшись в очагах инфицирования, Th1-клетки в кооперации с макрофагами осуществляют реакции, описанные выше. В результате взаимодействия этих клеток, особенно действия  $\text{IFN}\gamma$ , происходит максимально выраженная активация макрофагов. Эта активация результативна с точки зрения защиты от внутриклеточных патогенов, но деструктивна для окружающих тканей. Активированные макрофаги выделяют весь спектр своих секреторных продуктов. Он включает разнообразные провоспалительные факторы и факторы бактерицидности. К последним относят активные формы кислорода, их галоидные производные, оксид азота и его дериваты, ферменты и т.д. Среда в окружении таких клеток закисляется. Поскольку контакт макрофагов с Th1-клетками к этому моменту прекращается, секреция уже не носит ориентированного характера. Выделяемые молекулы выступают как факторы внеклеточной

микробицидности и одновременно вызывают повреждение окружающих нормальных клеток организма. Таким образом, продукты Th1-клеток дополнительно усиливают воспалительную реакцию, в то же время придавая ей специфичность в отношении конкретных возбудителей.

Вариант воспаления, реализуемый с участием Th1-клеток, называют иммунным воспалением, а сам Th1-клеточный иммунный ответ носит название воспалительного клеточного иммунного ответа. В рамках этой формы иммунного ответа особенно ярко проявляется соотношение факторов врожденного и адаптивного иммунитета: эффекторным механизмом служит типичная реакция врожденного иммунитета — фагоцитоз, однако он усиливается и приобретает специфичность в отношении конкретных антигенов благодаря вовлечению в реакцию клеток адаптивного иммунитета.

### **Гранулема**

При неэффективном клеточном ответе воспалительного типа, т.е. в случаях, когда разрушения и переваривания внутриклеточных патогенов не происходит, формируется гранулема (рис. 3.112). Гранулема представляет собой морфологическую структуру округлой формы, в центре которой расположены инфицированные макрофаги, а также клеточный детрит и патогены, освободившиеся в результате разрушения макрофагов. Вследствие слияния макрофагов образуются гигантские многоядерные клетки. Некоторые макрофаги претерпевают морфологические изменения, приобретая фенотип так называемых эпителиоидных клеток. Периферическая часть гранулемы образована активированными макрофагами, лишенными патогенов, и Т-лимфоцитами (преимущественно Th1-клетками). Т-клетки постоянно



**Рис. 3.112.** Схема строения гранулемы

перемещаются, причем эта подвижность важна для сохранения структурной целостности гранулемы. Формирование гранулемы сопряжено с деструкцией ткани и нарушением функционирования большого участка пораженных органов (например, легких при туберкулезе), что делает ее патологическим образованием. С другой стороны, гранулема представляет способ изоляции патогена, с уничтожением которого иммунная система не справляется, и в этом смысле выступает как защитное приспособление организма.

#### ***Эффекторные реакции, опосредованные Th2-клетками***

Th2-клетки участвуют в эффекторных реакциях, направленных на защиту от многоклеточных паразитов. Эти реакции изучены пока крайне мало. При этом, подобно Th1-клеткам, Th2-лимфоциты вовлекают в защитную реакцию клетки миелоидного ряда. В отличие от реакций, опосредованных Th1-клетками, эти клетки представлены не макрофагами, а эозинофилами и тучными клетками.

Роль Th2-клеток в этих процессах в значительной степени состоит в секреции цитокинов: IL-4, IL-5, IL-13, IL-9, IL-3 и GM-CSF. Каждый из них в той или иной степени участвует во взаимодействии с исполнительными клетками. Основную роль при этом играет IL-5. Этот цитокин служит фактором выживания эозинофилов, поддерживает их развитие и привлекает эти клетки в очаг поражения. Эозинофилы инфильтрируют ткань вокруг паразита и выделяют продукты своих гранул, из которых главный белок эозинофилов (MBP), пероксидаза эозинофилов (ЕРО) и катионный белок эозинофилов (ЕСР) обладают цитопатогенной активностью в отношении клеток гельминтов и других макропаразитов.

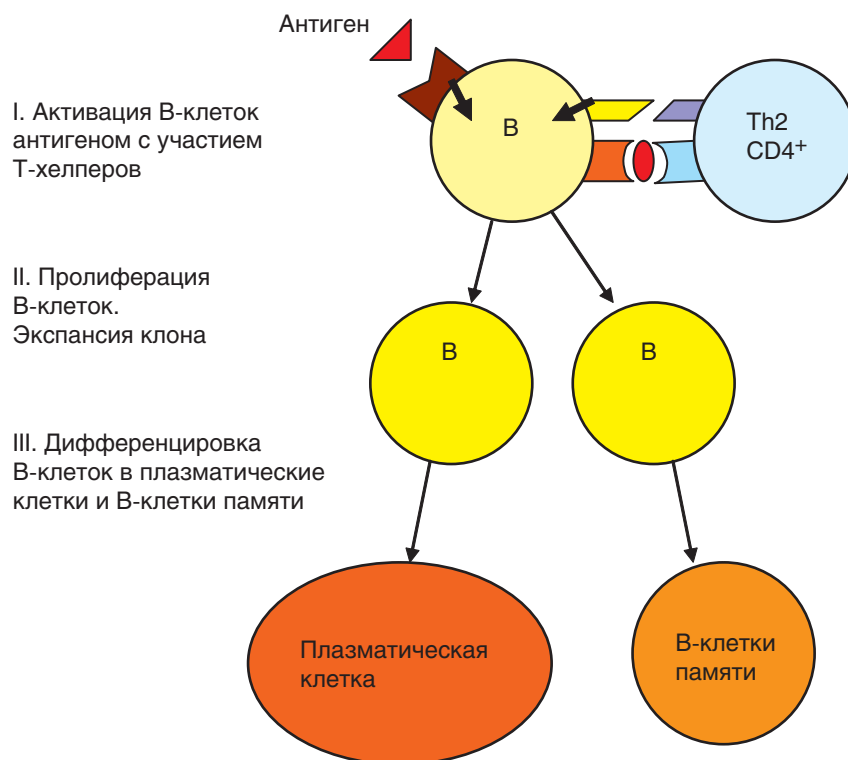
Вспомогательную роль в подобных реакциях играют антитела класса IgE. Полагают, что этот минорный класс иммуноглобулинов, известный как ключевой фактор аллергии немедленного типа, предназначен для осуществления антипаразитарной защиты. Помимо прямого блокирующего действия на паразитов, IgE способен «армировать» макрофаги, связываясь с высокоаффинными FcεRI-рецепторами на их поверхности, что придает прицельность действию макрофагов и служит дополнительным фактором их активации.

### **3.6.2. Гуморальный иммунный ответ**

Основная задача гуморального иммунного ответа состоит в образовании антител, специфичных к антигенам возбудителей. Эти антитела обеспечивают защиту от внеклеточных патогенов путем их прямой блокады или привлечения дополнительных факторов цитотоксичности. Антителообразующие клетки являются производными В-лимфоцитов. Таким образом, клетки В-ряда служат основными исполнителями этой формы иммунного ответа. В качестве хелперных клеток выступают преимущественно Th2-лимфоциты.

Выделяют 4 этапа превращения В-лимфоцитов при гуморальном иммунном ответе (рис. 3.113).

- I. Стимуляция В-клетки антигеном с участием Т-хелперов.
- II. Активация и пролиферация В-клеток (экспансия клона).
- III. Переключение изотипа рецептора В-клетки и «созревание» его аффинитета.
- IV. Дифференцировка В-клеток в плазматические клетки и В-клетки памяти.



**Рис. 3.113.** Схема развития гуморального иммунного ответа

Два первых этапа укладываются в индуктивную фазу гуморального иммунного ответа, третий частично относится к продуктивной фазе, а четвертый составляет его основное содержание.

### 3.6.2.1. Активация В-лимфоцитов. Роль Т-клеток и цитокинов

С точки зрения роли в иммунологических процессах, В-лимфоциты являются клетками с двойственной функцией. С одной стороны, это антигенраспознающие лимфоциты, способные дифференцироваться (обычно при участии Т-хелперов) в эффекторные клетки — антителопродуценты. С другой стороны, В-лимфоциты служат «профессиональными» АПК, способными активировать хелперные Т-лимфоциты. Схема их участия в гуморальном иммунном ответе, особенно при взаимодействии с Т-хелперами, очень сходна с аналогичной схемой участия макрофагов в клеточном ответе воспалительного типа.

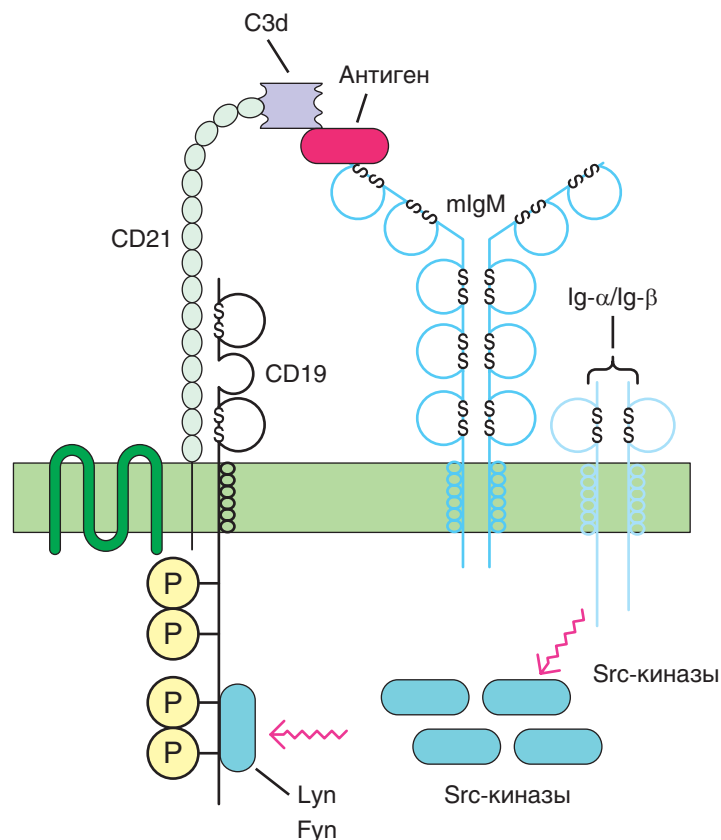
Несмотря на то, что контакт В-лимфоцитов с патогенами и их продуктами возможен в очагах поступления патогенов в организм (в частности, в барьерных тканях), вовлечение этих клеток в первичный иммунный ответ возможно только во вторичных лимфоидных органах. Это обусловлено тем, что именно здесь создаются оптимальные условия для взаимодействия трех компонентов пусковой реакции — антигена, наивной В-клетки и Т-хелпера типа Th2. Это взаимодействие происходит в межфолликулярном пространстве,

или «короне» фолликула, где В- и Т-лимфоциты соседствуют друг с другом. Антиген доставляется в эти зоны (обычно с афферентной лимфой) не только в составе молекул МНС на поверхности дендритных клеток, но и в свободной форме.

Как было сказано выше, антигенсвязывающие рецепторы В-лимфоцитов — BCR — способны взаимодействовать как со свободным, так и мембраносвязанным антигеном в его нативной, нерасщепленной форме. Связывания антигена, самого по себе, недостаточно для активации В-клетки. Оно как бы обозначает те клоны В-лимфоцитов, которым предстоит участвовать в иммунном ответе. Для полноценной активации В-клетки требуется дополнительный сигнал, порождаемый контактным взаимодействием с Т-хелпером (Th2).

При взаимодействии антигена с BCR должен быть выполнен ряд условий, определяющих эффективность распознавания антигена. Прежде всего необходимо перекрестное сшивание иммуноглобулиновых рецепторов или иная форма их агрегации. Связывание антигеном двух и более рецепторов возможно при наличии в молекуле антигена повторяющихся эпитопов, что не характерно для белковых антигенов. Поэтому в действительности срабатывают другие, неспецифические механизмы агрегации мембранных рецепторов. Связывание антигена и агрегация BCR обуславливают конформационные изменения в мембранном иммуноглобулине. Эти изменения передаются на димер  $Ig\alpha/Ig\beta$  (CD79a/b), а через него — на рецепторные киназы, которые при этом активируются. Важное усиливающее событие — взаимодействие антигена не только с мембранным IgM, но и с другими составляющими рецепторного комплекса. Доказан дополнительный вклад C3-компонента комплемента в активацию В-клеток антигеном (рис. 3.114). Образование комплекса антигена с мембранными рецепторами-антителами приводит к активации комплемента по классическому пути и расщеплению фактора C3 сначала до C3b, затем — до iC3b и C3d. Входящая в состав рецепторного комплекса В-клеток молекула CD21 является рецептором для комплемента (CR2), способным связывать фрагмент C3d. Возникающее при этом изменение конформации молекулы CD21 передается молекуле CD19 и вызывает активацию рецепторных тирозинкиназ, связанных с цитоплазматической частью CD19. Сочетанная активация тирозинкиназ, связанных с молекулами CD79 и CD19, формирует первый сигнал, ответственный за вовлечение в иммунный ответ клонов В-клеток, распознавших антиген.

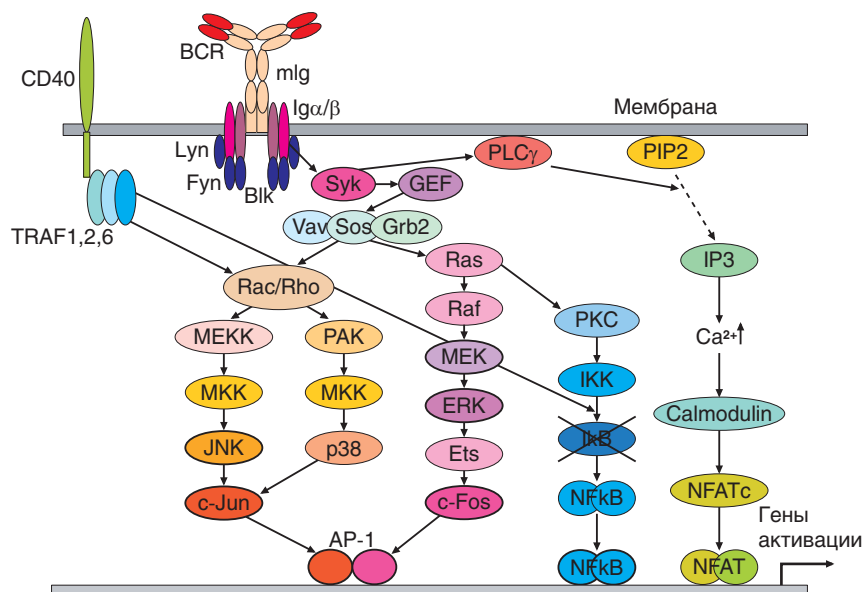
За начальные этапы передачи сигнала о связывании антигена в В-клетках ответственны тирозинкиназы Lyn, Blk и Lck, фосфорилирующие цитоплазматические части полипептидных цепей BCR и тирозинкиназу Syk. Этот фермент выполняет роль посредника между рецепторным аппаратом и внутриклеточными сигнальными факторами, подобно тирозинкиназе ZAP-70 Т-клеток, также относящейся к семейству Syk. Среди многочисленных молекул, активируемых Syk-киназой, важная роль принадлежит связанным с мембраной факторам, составляющим промежуточное звено передачи сигнала — адапторным и гуанозинсвязывающим (GEF) белкам, а также  $\gamma$ -изоформе фосфолипазы С



**Рис. 3.114.** Межмолекулярные взаимодействия в рецепторном комплексе В-клеток, необходимые для запуска активации и пролиферации В-клеток. Для активации В-клетки важны конформационные изменения мембранного иммуноглобулина в результате связывания антигена. Другое событие реализуется с участием системы комплемента. Образование комплекса антигена с мембранными антителами приводит к активации комплемента по классическому пути и расщеплению фактора C3 до C3d, распознаваемого молекулой CD21 (см. текст). За счет этих двух источников генерируется сигнал, ответственный за вовлечение в иммунный ответ конкретного клона В-клеток

(PLC $\gamma$ ). Эти факторы обеспечивают дальнейшую передачу сигнала — уже по нескольким параллельным путям (рис. 3.115).

Однако для полноценной активации В-клеток, определяющей их дальнейшее развитие и дифференцировку в антителообразующие клетки, необходим дополнительный второй сигнал, возникающий в процессе контактного взаимодействия с Т-хелперами. Это взаимодействие, как уже отмечалось, происходит в морфологических структурах, где соседствуют Т- и В-лимфоциты — прежде всего в межфолликулярных пространствах. Как и в случае презентации антигена дендритными клетками Т-хелперам при контакте Т- и В-клеток, распознающих эпитопы одного и того же анти-

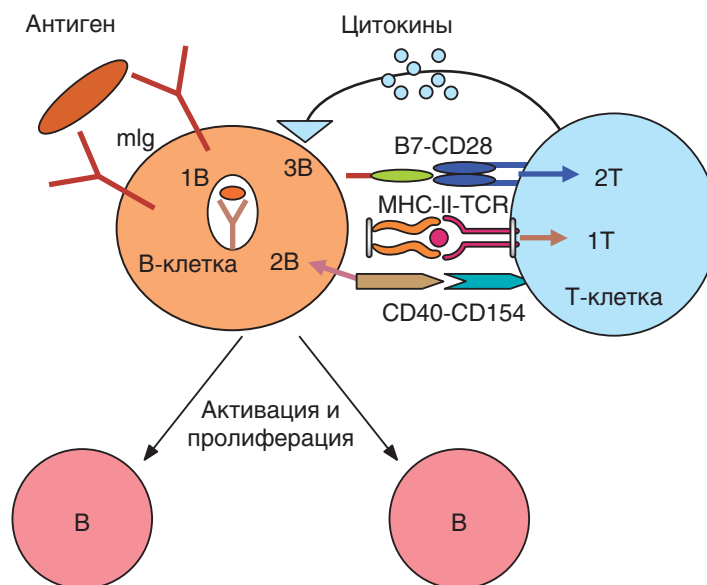


**Рис. 3.115.** Схема сигнальных путей при активации В-клеток. Схема в принципе близка таковой для активации Т-клеток (см. рис. 3.94). Основное отличие состоит в различной природе костимулирующего сигнала, поставляемого в В-клетку через молекулу CD40

гена, возникают сложности, обусловленные наличием малого числа клеток, специфичных к конкретному антигену. Это препятствие удастся преодолеть лишь благодаря процессу непрерывной рециркуляции Т- и В-лимфоцитов.

Схематически процесс взаимодействия наивных В-клеток и Th2-лимфоцитов представлен на рис. 3.116. После связывания антигена с BCR в В-клетке комплекс антиген–рецептор интернализуется, как это происходит в любой АПК. По ряду свойств, необходимых для презентации антигена (уровень эндоцитоза, эффективность процессинга поглощенных молекул антигенов и т.д.), В-лимфоциты значительно уступают дендритным клеткам. Однако они имеют существенное преимущество, которое состоит в избирательности поглощения антигенов при их распознавании BCR. Захваченный антиген процессируется и включается в состав молекул МНС-II так же, как это происходит в других АПК. Однако если в составе МНС на поверхности дендритной клетки на долю конкретного эпитопа может приходиться не более 0,1% комплексов пептид–МНС-II, то мембранные комплексы поверхности В-клетки существенно обогащены эпитопами тех антигенов, которые распознаются их рецепторами.

Принципиально важно, что в состав МНС-II избирательно включаются не те эпитопы, которые распознаются BCR (как известно, структурные характеристики В- и Т-эпитопов различны), а другие — Т-клеточные эпитопы. Выше уже рассматривалась природа В- и Т-эпитопов и их различия между собой (см. раздел 3.2). Практически каждая молекула имеет уникальный набор детерминант, распознаваемых рецепторами В- и Т-клеток. Если



**Рис. 3.116.** Природа сигналов, генерируемых при взаимодействии В-клеток с Т-хелперами и необходимых для активации и запуска пролиферации В-клеток. Связывание антигена с мембранным иммуноглобулином (mIg) В-клеточного рецептора служит источником 1-го активационного сигнала (1В), усиливающего экспрессию молекул МНС-II и костимулирующих молекул В7 (CD80 и CD86). Комплекс антиген–рецептор интернализуется, фрагменты антигена включаются в молекулы МНС-II, экспрессируемые на поверхности В-клетки. Т-клеточный рецептор Th2-клетки распознает комплекс МНС-II–пептид (индуцируется сигнал 1Т). Вместе с костимуляцией (сигнал 2Т) через CD28 это приводит к активации Т-клетки, экспрессии CD154 и секреции цитокинов. В результате взаимодействия CD40–CD154 возникает 2-й активационный сигнал для В-клеток (сигнал 2В), что приводит к экспрессии рецепторов для цитокинов. Цитокиновые сигналы, индуцируемые при связывании IL-2, IL-4, IL-5 с их рецепторами (3В), обеспечивают продвижение В-лимфоцитов по клеточному циклу и их пролиферацию

эти наборы и перекрываются, то только частично. В-лимфоцит распознает В-клеточные эпитопы своим BCR и в то же время встраивает Т-клеточные эпитопы в состав молекул МНС-II, подготавливая лиганд для TCR. Эти лиганды распознают Т-клетки, принадлежащие к соответствующим клонам. Таким образом, в отношении В-эпитопов антигена В-клетка является распознающей, а в отношении Т-эпитопов — презентующей.

На этом этапе иммунного процесса во взаимодействие с В-лимфоцитом вовлекаются не наивные Т-клетки (их могут активировать только

дендритные клетки), а Th2-лимфоциты, уже ранее получившие такой же антигенный сигнал от дендритных клеток в Т-зонах вторичных лимфоидных органов. Вовлечение во взаимодействие с В-лимфоцитами Th2-, а не Th1-клеток, обусловлено направлением миграции этих типов Т-хелперов. Если Th1-клетки из мест своего образования (Т-зоны) с эфферентным током лимфы попадают в рециркуляцию, то большинство Th2-клеток, экспрессирующих хемокиновый рецептор CXCR5, движется в сторону фолликулов и на этом пути встречается с В-лимфоцитами. В-лимфоцит и Th2-клетка взаимодействуют посредством иммунного синапса, принципиально аналогичного по своей структуре синапсу, формируемому между дендритной клеткой и Т-хелпером (см. раздел 3.4.1.3). Во время длительного существования синапса (часы) генерируются активационные сигналы, направленные в Т- и В-клетки (см. рис. 3.116). В Th2-клетки сигналы поступают через TCR и CD28, и это способствует экспрессии костимулирующей молекулы CD154 (лиганда молекулы CD40) и усилению секреции Th2-цитокинов. То и другое служит источником дополнительных сигналов для В-лимфоцита.

Принцип внутриклеточной передачи сигнала в В-лимфоцитах аналогичен таковому в Т-клетках. В активации В-клеток участвуют сходные сигнальные пути, приводящие к образованию тех же трех транскрипционных факторов — NF-AT, AP-1 NF-κB (см. раздел 3.5.2.1). Источником костимулирующих сигналов в случае В-клетки выступает молекула CD40, вовлекаемая в активацию в результате контактного взаимодействия с Т-хелпером. При связывании с ней CD40-лиганда (CD154) генерируется костимулирующий сигнал, в проведении которого основную роль играют молекулы TRAF1, TRAF2, и в меньшей степени TRAF6. Этот сигнал играет важную роль в формировании Рас-зависимых ветвей MAP-каскада, приводящих к активации киназ JNK и p38. Эти киназы нужны для экспрессии белка c-Jun, участвующего в формировании транскрипционного фактора AP-1. CD40/TRAF-зависимый путь необходим также для активации фосфатазы IKK, обеспечивающей дефосфорилирование ингибиторной субъединицы IκB, что приводит к ее расщеплению и активации транскрипционного фактора NF-κB. Подобно процессу активации Т-клеток, наименее зависим от костимуляции при активации В-клеток Ca<sup>2+</sup>-зависимый путь, приводящий к формированию транскрипционного фактора NF-AT (см. рис. 3.115).

Последствия активации В-клеток аналогичны таковым при активации Т-лимфоцитов (см. раздел 3.5.2.2). Они состоят в экспрессии комплекса генов, необходимых для реализации первого этапа реакции клонов, вовлекаемых в иммунный ответ, — их пролиферативной экспансии. Для В-клеток это означает прежде всего появление на их поверхности рецепторов для цитокинов, которые обеспечивают сначала их пролиферацию, а затем дифференцировку: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-1, IL-2. В отличие от Т-хелперов, В-лимфоциты не обеспечивают себя этими цитокинами, а зависят в этом отношении от других клеток. Ситуация облегчается тем, что почти все эти цитокины секретируются Th2-лимфоцитами, с которыми контактируют В-клетки. IL-2, не вырабатываемый Th2-клетками, присутствует в зоне активации в достаточном количестве. Его секретируют CD4<sup>+</sup>Т-клетки (в том числе предшественники Th2-лимфоцитов), активируемые дендритными клетками. Источником IL-1 служат главным образом макрофаги.

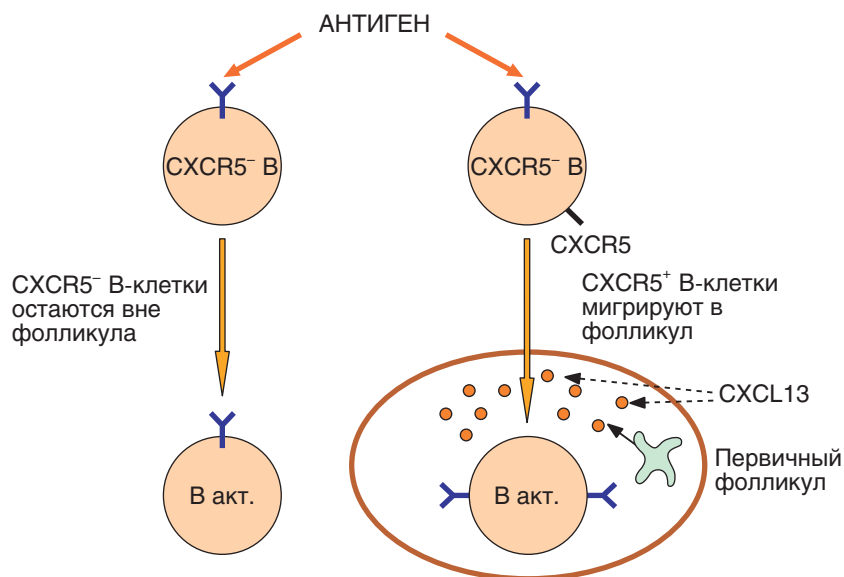
Активацию и последующее развитие В-лимфоцитов контролирует целый комплекс цитокинов. Рецепторы для них появляются на поверхности В-клеток во время фазы G1 клеточного цикла. Среди факторов, индуцирующих пролиферацию активированных В-клеток, раньше других (в фазу G1a) свою активность проявляют IL-4 (основной ростовой фактор) и IL-1 (кофактор). Уже после преодоления точки рестрикции (в фазе G1b) основными факторами, обуславливающими продвижение клетки по циклу, становятся IL-2 и IL-5, при участии которых В-клетка вступает в митоз. Как правило, на активированную В-клетку одновременно действует не один, а несколько цитокинов, среди которых основной — IL-4. Из сказанного следует, что цитокины, участвующие в индукции пролиферации В-клеток, относятся к разряду заменимых и мутации генов каждого из них не сказываются на пролиферативной экспансии клонов В-лимфоцитов.

После завершения митоза клетки не возвращаются в фазу покоя ( $G_0$ ); для продолжения пролиферации им нужны сигналы от цитокинов, но не контакт с Т-лимфоцитами. Как и Т-клетки, стимулированные В-лимфоциты совершают 6–8 делений за 5–7 сут (продолжительность периода пролиферации определяется длительностью экспрессии рецепторов на поверхности В-клеток). Одновременно с делением происходит реализация дифференцировочной программы, запускаемой при активации В-клеток. Завершение этой программы в значительной степени зависит от микроокружения В-клеток.

#### 3.6.2.2. Дифференцировка и селекция В-клеток в зародышевых центрах

Судьба активированных В-клеток и эффективность их дифференцировки зависит от того, мигрируют ли они в зародышевые центры или поступают в мозговые шнуры, минуя эти фолликулярные структуры (рис. 3.117). В процессе дифференцировки на большинстве В-лимфоцитов экспрессируется хемокиновый рецептор CXCR5, распознающий  $\alpha$ -хемокин CCL13 (BLC). Этот хемокин синтезируется в лимфоидных фолликулах и привлекает активированные В-лимфоциты в зародышевые центры, формирующиеся в фолликулах при гуморальном иммунном ответе. CXCR5<sup>+</sup> В-клетки не способны мигрировать в первичные фолликулы и остаются в межфолликулярном пространстве, а затем мигрируют в мягкотные шнуры, где происходит их дифференцировка в IgM-образующие клетки при минимальном участии Т-лимфоцитов. Изотип и аффинитет антител, секретируемых этими клетками, остается неизменным. Эти клетки отличаются коротким сроком жизни (3–5 сут). CXCR5<sup>+</sup> В-клетки, при активации антигеном приобретающие способность мигрировать в первичные фолликулы, проходят путь Т-зависимой дифференцировки в зародышевом центре с участием фолликулярных дендритных клеток и Т-лимфоцитов (CD4<sup>+</sup> фолликулярных Т-хелперов — T<sub>FH</sub>). В этих В-клетках происходит переключение изотипов и «созревание» аффинитета. Они дифференцируются в долгоживущие антителообразующие клетки. Этот путь развития для антителообразующих клеток является основным и будет рассмотрен подробнее.

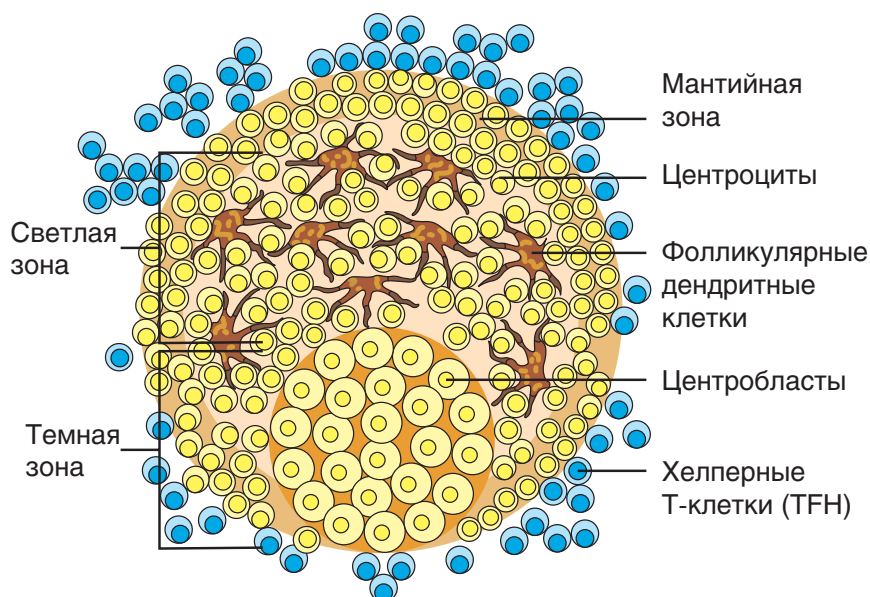
При рассмотрении строения вторичных лимфоидных органов мы упоминали о первичных фолликулах — основных морфологических структу-



**Рис. 3.117.** Различные пути развития антителообразующих клеток в зависимости от способности В-клеток мигрировать в фолликулы. В зависимости от экспрессии хемокинового рецептора CXCR5, В-клетки или мигрируют в первичный фолликул, или оказываются вне его. В первом случае, распознав антиген, В-лимфоциты проходят все стадии развития (включая переключение изотипов и созревание аффинитета) в антителообразующие клетки с продолжительным сроком жизни. Вне фолликулов В-клетки дифференцируются в короткоживущие IgM-продуценты

рах, свойственных различным лимфоидным органам и служащих местом локализации наивных В-клеток. В ходе иммунного ответа в фолликулах формируются зародышевые центры, или центры размножения; при этом В-клетки первичного фолликула оттесняются на периферию зародышевого центра, образуя его мантию. Фолликулы, в которых сформировался зародышевый центр, называют вторичными. Зародышевые центры имеют яйцевидную форму; в них выделяют апикальную и базальную зоны, а в последней — светлую (верхняя) и темную (нижняя) зоны (рис. 3.118).

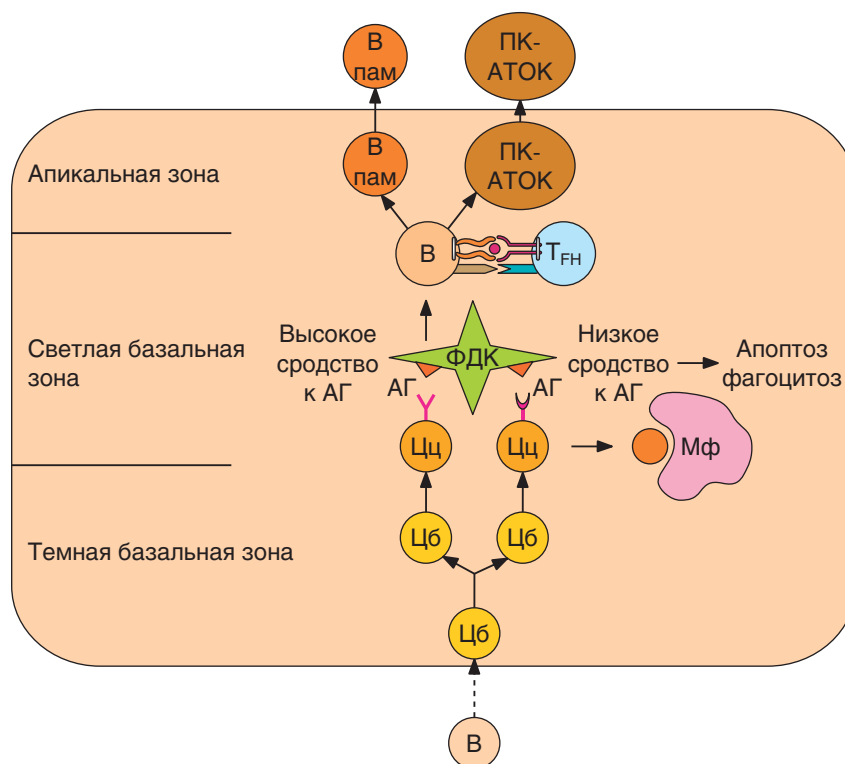
Морфогенез зародышевых центров осуществляется под влиянием мембранного гетеродимера лимфотоксина  $\alpha_1\beta_2$  лимфоцитов при активном участии фолликулярных дендритных клеток, экспрессирующих мембранные рецепторы к лимфотоксину  $\beta$ . Фолликулярные дендритные клетки происходят из местных мезенхимальных клеток-предшественников и их родство с обычными дендритными клетками вызывает сомнение. Именно фолликулярным дендритным клеткам принадлежит ключевая морфогенетическая роль в развитии зародышевых центров: при нокауте генов лимфотоксинов эти клетки не дифференцируются и формирования зародышевых центров не происходит. Фолликулярные дендритные клетки секретируют хемокин CXCL13, который привлекает В- и Т-лимфоциты, несущие хемокиновые рецепторы CXCR5. Другая особенность этих клеток состоит в экспрессии



**Рис. 3.118.** Схема строения вторичного фолликула

Fcγ-рецепторов, способных связывать иммунные комплексы. Уже говорилось, что в зародышевые центры мигрирует большинство активированных В-клеток. В последнее время возникло представление о существовании особой разновидности Т-лимфоцитов — фолликулярных Т-хелперов (T<sub>FH</sub>-клеток). T<sub>FH</sub>-лимфоциты — активированные CD4<sup>+</sup> Т-хелперы, основными особенностями которых, помимо упомянутой экспрессии хемокинового рецептора CXCR5, является экспрессия транскрипционного фактора Bcl-6 и секреция цитокина IL-21.

В-лимфоциты, связавшие антиген и получившие дополнительные сигналы от Т-клеток в перифолликулярном пространстве, мигрируют в зародышевый центр. Здесь они вовлекаются в 2 процесса, играющих важную роль в обеспечении «высокого качества» конечных продуктов гуморального иммунного ответа — антител. Активированные клетки проникают в зародышевый центр через базальную темную зону и перемещаются до апикальной зоны (рис. 3.119). В зародышевом центре они трансформируются в бласты (центробласты) и интенсивно делятся, чему способствует экспрессия внутриклеточного фактора Bcl-6. На поверхности центробластов исходно присутствует IgM, в то время как IgD экспрессирован слабо или отсутствует. Одновременно с делением происходит переключение изотипов Н-цепей иммуноглобулинов. Молекулярно-генетические аспекты переключения изотипов рассмотрены в разделе 3.1.4.3. Этот процесс реализуется при обязательном участии Т-лимфоцитов под влиянием двух групп сигналов. Контактные сигналы передаются в В-клетку через костимулирующие молекулы CD40 и ICOS. Эта передача сигнала отвечает за включение процесса. Выбор С-гена конкретной Н-цепи происходит под влиянием эпигенетических влияний, регулируемых цитокинами. Уже отме-



**Рис. 3.119.** Селекция В-лимфоцитов и дифференцировка антителопродуцентов и В-клеток памяти в зародышевом центре. В темной базальной зоне зародышевых центров происходит усиление мутагенеза в V-генах пролиферирующих центробластов (Цб). В светлых базальных зонах осуществляется отбор В-центроцитов (Цц) с наиболее высоким сродством к антигену (АГ); клетки, не поддержанные селекцией, подвергаются апоптозу и фагоцитируются макрофагами (Мф). В апикальной зоне В-клетки, получившие сигнал от фолликулярных Т-хелперов (Т<sub>ФН</sub>), дифференцируются в плазматические клетки и В-клетки памяти. Детали см. в тексте

чалось (см. рис. 3.19), что у мышей IL-4 отвечает за переключение изотипов на  $\gamma 4$  и  $\epsilon$ , IFN $\gamma$  — на  $\gamma 2a$  и  $\gamma 3$ , TGF $\beta$  — на  $\alpha$  и  $\gamma 2b$ . У человека эффекты цитокинов определяют не столь однозначно. Тем не менее можно назвать доминирующие эффекты цитокинов: IL-4 индуцирует переключение на  $\gamma 4$  и  $\epsilon$ ; IFN $\gamma$  — на  $\gamma 1$  и, возможно,  $\gamma 3$ ; TNF $\beta$  — на  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  и, возможно,  $\gamma 2$  (в переключении на изотип  $\gamma 1$  участвует также IL-21). Действие цитокинов продолжается на посттранскрипционном уровне. IL-10 стимулирует запуск синтеза антител практически всех классов. IL-6 усиливает синтез IgM и IgG1, IL-5 стимулирует выработку IgA, а IL-13 — образование IgE. Перечисленные цитокины действуют на различных уровнях — одни из них усиливают процесс трансляции, другие поддерживают пролиферацию В-лимфоцитов и незрелых плазматических клеток. Для переключения изотипов необходима также экспрессия гена *AID*, играющего ключевую роль в другом процессе — гипермутагенезе V-генов.

Ген *AID* (*Activation-induced cytidine deaminase*) экспрессируется в делящихся центробластах. Кодруемый им фермент осуществляет дезаминирование остатков цитидина в одноцепочечной ДНК до дезоксиуридина. В норме *AID* играет важную роль в сохранении целостности генома и репарации ДНК после эксцизии измененных оснований. В зародышевых центрах *AID* катализирует замены оснований, приводящие к резкому повышению частоты соматических мутаций (см. раздел 3.1.4.2). Степень повышения частоты мутаций очень высока: она составляет 4–5 порядков (до  $10^{-2}$ – $10^{-3}$  при исходной частоте  $10^{-6}$ – $10^{-8}$ ). Мутации имеют точечный характер и относятся к трансциям (т.е. превращениям внутри одного класса нуклеотидов — пуриновых или пиримидиновых). Повышение частоты мутаций происходит практически исключительно в *V*-гене, особенно в его участке CDR3, соответствующем области соединения зародышевого *V*-гена с сегментами D и J (см. раздел 3.1.4.1). Одновременно в В-клетках происходит ослабление экспрессии антиапоптотического фактора Bcl-2, что повышает риск развития апоптоза.

Миграция В-клеток в светлую базальную зону совпадает с прекращением деления и усиленного мутагенеза. В-центробласты уменьшаются в размере и превращаются в В-центроциты. На молекулярном уровне этому соответствует ослабление экспрессии внутриклеточного фактора Bcl-6 и начало экспрессии фактора Blimp-1, обеспечивающего дифференцировку В-центроцитов в плазматические клетки. В светлой зоне В-центроциты отбираются по высокому сродству их BCR к антигену (см. рис. 3.119). В результате гипермутационного процесса образуются В-клетки, несущие множество вариантов исходного иммуноглобулинового рецептора. В подавляющем большинстве случаев мутации нарушают сродство активного центра рецептора к антигену, однако неизбежно возникают варианты с более высоким сродством.

Назначение селекции состоит в отборе В-клеток, несущих BCR с максимальным сродством к антигену. Как уже упоминалось, фолликулярные дендритные клетки экспрессируют на поверхности Fcγ-рецепторы, которые связывают иммунные комплексы. В таком виде чужеродные антигены способны очень долго сохраняться в зародышевых центрах. Количество антигена, фиксированного на фолликулярных дендритных клетках, ограничено. Это обуславливает конкуренцию В-лимфоцитов за связывание с этим антигеном. Связывание антигена служит источником сигнала к выживанию, который приводит к усилению экспрессии фактора Bcl-2 и тем самым предотвращает развитие апоптоза. Связывание антигена сопровождается установлением контактов между В-центробластами и фолликулярными дендритными клетками. При этом происходит взаимодействие ряда мембранных молекул, в частности CD21 (на В-клетке) и CD23 (на фолликулярной дендритной клетке). Это взаимодействие повышает эффективность распознавания антигена и снижает риск развития апоптоза В-клетки в 100 раз. В-центроциты, не связавшие антиген в силу более низкой аффинности их BCR, подвергаются апоптозу и фагоцитируются макрофагами.

Дополнительный сигнал, поддерживающий жизнеспособность В-клетки, получают также при контакте с фолликулярными Т-хелперами при условии предварительного связывания В-клеткой антигена и презентации его фрагмента Т-клетке (т.е. при этом повторяется процесс, происходящий при получении

В-клеткой хелперного сигнала в межфолликулярном пространстве). Источником поддерживающего сигнала со стороны Т-клеток является взаимодействие молекул CD154 и CD40 (сигнал в В-клетку подается через молекулу CD40).

В результате в зародышевых центрах происходит переключение класса мембранных иммуноглобулинов и повышение их сродства к антигенным эпитопам. Эти эффекты взаимосвязаны, поскольку повышение аффинности мембранных иммуноглобулинов невозможно при сохранении исходного изотипа — IgM. Аффинность IgG-антител при первичном иммунном ответе возрастает примерно в 100 раз: если исходная величина Kd как для IgM, так и для IgG составляет исходно около  $10^{-6}$  М, то в ходе первичного иммунного ответа Kd IgG-антител достигает  $10^{-8}$ – $10^{-9}$  М, тогда как для IgM-антител эта величина практически не меняется. При вторичном иммунном ответе происходит дополнительный, очень существенный рост аффинитета IgG-антител. Другой аспект «повышения качества» гуморального иммунного ответа состоит в том, что антитела класса IgG более действенны как эффекторные молекулы, чем IgM-антитела. Это обусловлено тем, что к IgG-антителам на поверхности эффекторных клеток врожденного иммунитета есть рецепторы (FcγR), тогда как Fcμ-рецепторов не существует. Важно отметить, что иммуноглобулины, составляющие основу мембранных рецепторов, служат прообразом антител, которые секретируются плазматическими клетками — потомками В-лимфоцитов, участвующих в иммунном ответе. Следовательно, миграция активированных В-клеток в зародышевые центры служит обязательным условием развития высокоэффективного гуморального иммунного ответа.

### 3.6.2.3. Дифференцировка плазматических клеток и секреция антител

При переходе в апикальную зону В-клетки вновь делятся и дифференцируются в двух направлениях — в плазматические (антителообразующие) клетки и В-клетки памяти (табл. 3.28).

**Таблица 3.28.** Сравнительная характеристика наивных и активированных В-лимфоцитов, плазматических клеток и В-клеток памяти

Клетка	Морфология	Локализация	Иммуноглобулины	Мембранные маркеры
Покояющаяся наивная В-клетка	Малый лимфоцит	Лимфоидные фолликулы, наружные слои коры узлов, маргинальная зона и т.д.	Мембранные IgM и IgD	CD19, CD20, CD21, CD22, CD72, CD81, CD40, CD45, MHC-II, CXCR5
Активированный В-лимфоцит	Лимфобласт	Зародышевые центры, мякотные шнуры	Мембранный IgM; переключение изотипов	CD19, CD20, CD21, CD22, CD72, CD81, CD40, CD45, MHC-II, CXCR5, CD25, CD69, CD126, CXCR4 и т.д. Внутриклеточно — AID, Bcl-6

Окончание табл. 3.28

Клетка	Морфология	Локализация	Иммуноглобулины	Мембранные маркеры
Плазматическая клетка	Крупная клетка с базофильной цитоплазмой и развитым эндоплазматическим ретикуломом	Костный мозг, красная пульпа селезенки, мягкотные шнуры	Цитоплазматические и секретируемые Ig любого класса	CXCR4, CD138, LFA-1, CD44. Внутриклеточно — Blimp-1
В-клетка памяти	Малый лимфоцит	<i>Lamina propria</i> слизистых оболочек, дерма, костный мозг	Мембранные IgG, IgA, реже IgE	CD19, CD20, CD21, CD22, CD40, CD45, CD72, MHC-II, ICAM-1, CXCR4

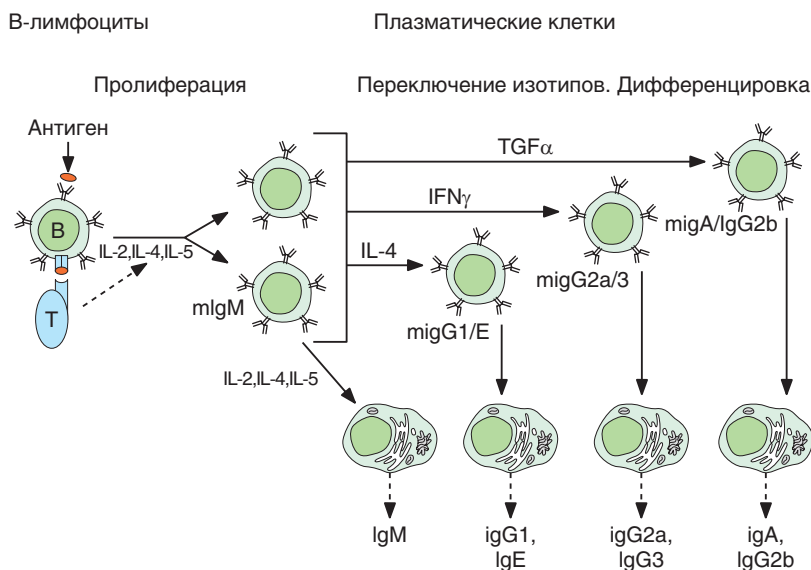
В апикальной части зародышевого центра образуются плазмобласты (см. рис. 3.119). Они еще сохраняют способность к пролиферации, причем в качестве ростового фактора для них выступает IL-6. Плазмобласты подвижны, экспрессируют на поверхности молекулы МНС. В то же время они утрачивают хемокиновый рецептор CXCR5 и приобретают рецептор CXCR4, что позволяет им покинуть зародышевый центр. Полагают, что эмиграция из зародышевых центров клеток, которым предстоит секретировать антитела, необходима, чтобы предотвратить нейтрализацию антителами антигена, сохраняемого на фолликулярных дендритных клетках. Вначале плазмобласты мигрируют в мозговые шнуры лимфатических узлов, маргинальные зоны и красную пульпу селезенки, где они дифференцируются в зрелые плазматические клетки. Еще находясь на стадии плазмобластов, будущие продуценты антител покидают лимфатические узлы и селезенку. В конечном счете большинство этих клеток попадает в костный мозг (40–45%) и слизистые оболочки, преимущественно кишечника (33–35%). Во вторичных лимфоидных органах остается меньше 25% антителообразующих клеток (7–8% в селезенке и 15–17% в лимфатических узлах). В слизистых оболочках плазмциты локализуются в *lamina propria* и подслизистом слое, в коже — в дерме.

Зрелые плазматические клетки полностью утрачивают подвижность, а также способность реагировать практически на все внешние стимулы. Это обусловлено потерей характерных для В-клеток мембранных молекул — иммуноглобулинов и других компонентов BCR, молекул МНС, костимулирующих молекул. Наиболее характерный мембранный маркер плазмцитов — белок синдиан (CD138), участвующий во взаимодействии плазматических и стромальных клеток. Дифференцировка плазматических клеток обусловлена утратой экспрессии ответственного за пролиферацию фактора Bcl-6 и дифференцировочного фактора В-клеток Pax-5, а также экспрессией дифференцировочного фактора Blimp-1. Помимо других факторов этому способствует IL-21, секретируемый фолликулярными Т-клетками.

Плазматические клетки имеют большой размер (20 мкм и более). Для ядра этих клеток характерна периферическая конденсация хроматина. Цитоплазма характеризуется большим объемом, базофилией и сильно развитым аппаратом синтеза белка (разветвленный эндоплазматический ретикулум, рибосомы, аппарат Гольджи). Цитоплазма имеет максимальный объем на стадии незрелой плазматической клетки, которая еще сохраняет способность к делению. Зрелые плазмциты представляют собой образец высокоспециализированных клеток. До 50% матричной РНК в зрелых плазматических клетках кодирует иммуноглобулин, на долю которого приходится около 30% синтезируемого белка.

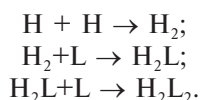
Каждая плазматическая клетка синтезирует и секретирует антитела одного изотипа, аллотипа, идиотипа и одной специфичности. Все эти характеристики совпадают со свойствами мембранного иммуноглобулина В-клетки предшественницы плазмцита (рис. 3.120). При образовании растворимых форм иммуноглобулинов/антител плазмциты вместо мембранной синтезируют свободную молекулу иммуноглобулина. Механизм этого переключения рассмотрен выше (см. раздел 3.1.4.4). Оно состоит в удалении (путем сплайсинга) из молекулы матричной РНК, кодирующей Н-цепь, экзонов МС, ответственных за синтез мембранного домена молекулы, и экспрессии экзона SC, кодирующего С-концевую часть растворимой молекулы иммуноглобулина.

Синтез полипептидных цепей антител происходит в полисомах, связанных с шероховатым эндоплазматическим ретикулумом. Сборка мономерной молекулы происходит по одному из двух путей. Первый из них состоит в

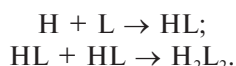


**Рис. 3.120.** Дифференцировка антителообразующих (плазматических) клеток. Проиллюстрировано переключение изотипов, реализуемое на уровне рецепторов В-клеток при участии цитокинов. Результат — секреция антител различных изотипов

димеризации Н-цепей с последовательным подсоединением к Н-димеру двух L-цепей:



Второй путь начинается с образования димера Н- и L-цепей; затем два таких димера объединяются и формируется «зрелая» молекула иммуноглобулина:



Первый вариант характерен для синтеза IgG, второй — для синтеза IgM. Растворимая форма иммуноглобулина не способна встраиваться в мембрану; молекула поступает из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи, где подвергается процессингу, гликозилированию, переходит в секреторные везикулы и секретируется.

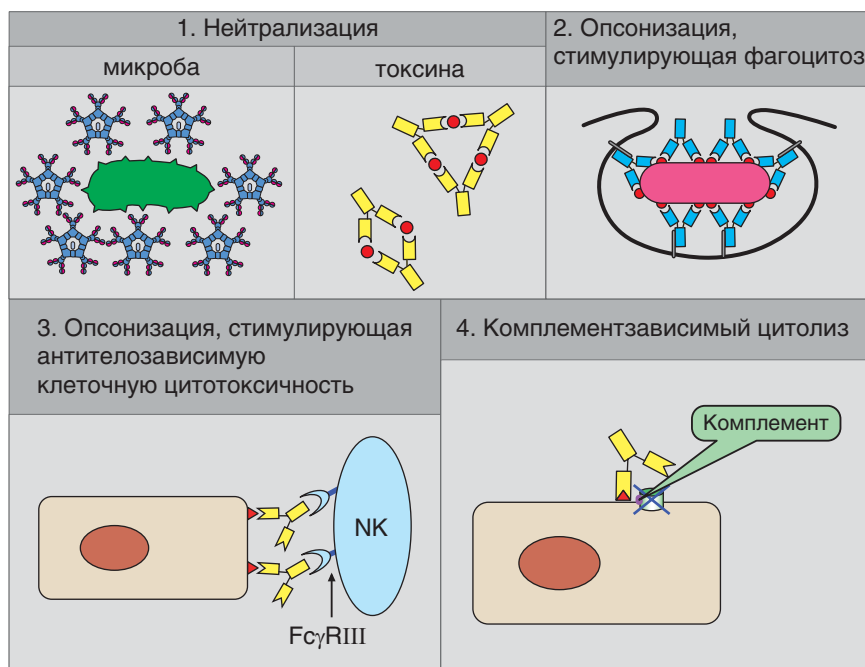
При первичном иммунном ответе вначале секретируются IgM-антитела. У мышей возрастание числа клеток, секретирующих эти антитела, регистрируют уже на 2-е сутки после внутрибрюшинного введения антигена. Пик их содержания в селезенке приходится на 4-е сутки, а после 5-х суток их уровень быстро сокращается. IgG-антителообразующие клетки выявляют в селезенке, начиная с 4-х суток, их число достигает максимума на 8–10-е сутки, а последующая убыль происходит медленнее, чем снижение числа IgM-продуцентов. Титры сывороточных антител имеют сходную динамику, но с некоторой задержкой: пик IgM-антител выявляют на 5–6-е, а IgG-антител — на 10–12-е сутки. Высокое содержание сывороточных IgG-антител сохраняется до 20–25-х суток, а затем оно медленно снижается в течение 2–3 мес. Антитела класса IgG, точнее субкласса IgG1, доминируют среди сывороточных иммуноглобулинов, особенно при вторичном иммунном ответе. Во вторичных лимфоидных органах вне барьерных тканей 55–66% образуемых антител приходится на долю IgG, 11–30% — на долю IgA и 15–23% — на долю IgM. Сывороточные IgA- и IgE-антитела в целом повторяют кинетику антител класса IgG. В слизистых оболочках преобладает синтез и секреция антител класса IgA (до 90% от всех секретируемых иммуноглобулинов).

Долгое время не удавалось объяснить пожизненное сохранение достаточно высокого уровня антител, индуцированного вакцинацией против некоторых патогенов (описана продолжительность жизни плазматической клетки, секретирующей антитела, в 75 лет). Длительность жизни антителообразующих клеток, индуцированных *in vitro* или выделенных из организма после индукции *in vivo*, невелика — она составляет 5–7 сут. Таков же срок жизни антителообразующих клеток, сформировавшихся в неоптимальных условиях (например, не прошедших через зародышевые центры — см. выше). Продолжительность жизни плазматических клеток в лимфатических узлах и селезенке обычно составляет 4–7 нед. Она значительно удлиняется в костном мозгу, где плазматические клетки

могут сохраняться десятки лет — срок, сопоставимый с продолжительностью жизни человека. Длительное выживание плазматических клеток поддерживается контактными взаимодействиями со стромальными клетками, особенно при участии молекул CD138, CD44,  $\beta_2$ -интегрина LFA-1, селектинов Е и Р, при действии цитокинов — IL-6, IL-21, IL-5, TNF $\alpha$  и особенно хемокина CXCL12 (SDF-1), узнаваемого рецептором CXCR4. Имеет значение и длительное поддержание экспрессии внутриклеточных факторов — Bcl-1, Blimp-1 и т.д. Миграция плазматических клеток в очаги воспаления (при экспрессии хемокинового рецептора CXCR3) также способствует длительному выживанию плазматических клеток, поддерживаемому стромальными клетками в очаге воспаления. Считают, что долгоживущими становится 10–20% плазматических клеток.

### 3.6.2.4. Эффекторные функции антител

Участие антител в реализации иммунной защиты может осуществляться как путем прямого действия на молекулы или организмы (носители антигенов), так и косвенно, путем привлечения дополнительных эффекторных механизмов (комплемент, фагоциты) (рис. 3.121).



**Рис. 3.121.** Основные механизмы действия антител. Нейтрализующее действие антител (вариант 1) проиллюстрировано на примере IgM-антител, блокирующих микроорганизм и IgG-антител, формирующих иммунный комплекс с токсином. Варианты 2 и 3 (опсонизация, усиливающая фагоцитоз, и стимуляция цитотоксической активности НК-клеток) реализуются через взаимодействие иммуноглобулинов с Fc $\gamma$ -рецепторами клеток. Взаимодействие с антигеном (вариант 4) открывает комплементсвязывающие участки IgG-антител, что приводит к запуску комплемента по классическому пути и лизис или опсонизацию клетки-мишени

*Нейтрализующее и блокирующее действие антител*

Лучше всего изучены 2 механизма прямой реализации защитной функции антител — нейтрализация токсинов и поверхностная блокада патогенов. Экзотоксины — основные факторы патогенности ряда микроорганизмов (например, возбудителей дизентерии, столбняка, ботулизма, газовой гангрены). Нейтрализация наиболее эффективна, если функциональная группа токсина одновременно служит эпитопом или пространственно перекрывается с ним. На нейтрализующей способности антител основана серотерапия и серопротекция дифтерии, бешенства, заболеваний, вызываемых анаэробными бактериями. Блокада нейтрализующими антителами поверхности вирусов препятствует инфицированию ими клеток. Нейтрализация антигенов — основная функция антител субклассов IgG2 и IgG4, слабо связывающих комплемент и не взаимодействующих с Fc-рецепторами фагоцитов.

Блокирующая активность антител связана с нарушением функций мембранных структур патогенов, с которыми взаимодействуют антитела, или которые пространственно экранируются ими. Общеизвестным проявлением такого действия является обездвиживание бактерий при взаимодействии антител с антигенами жгутиков или иных структур, отвечающих за подвижность клетки. Блокирующий эффект составляет основу действия IgA-антител, особенно секреторных (см. раздел 3.6.5.5). Их активность проявляется, главным образом, в полости кишечника или других трактов. Взаимодействуя с антигенами поверхности микроорганизмов, антитела не только нарушают их подвижность, но и препятствуют их адгезии на поверхности эпителиальных клеток слизистых оболочек, тем самым предотвращая колонизацию эпителиального покрова и проникновение патогенов через эпителиальный барьер во внутреннюю среду организма.

*Защитная активность антител, опосредованная связыванием комплемента*

Значительно больше востребован другой механизм проявления защитной активности антител. Формируя иммунный комплекс с антигенами поверхности чужеродных клеток (прежде всего патогенов), антитела изменяют свою конформацию таким образом, что при этом демаскируются участки доменов C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3, экранированные в интактной молекуле антитела L-цепями. Это обеспечивает связывание с иммунным комплексом сывороточной молекулы C1q, что приводит к каскадной активации комплемента по классическому пути (см. раздел 2.5.1.3) и реализации двух эффекторных иммунных механизмов. Один из них связан с опсонизацией — отложением на поверхности клетки-мишени избыточного количества фрагментов C3b. При дальнейшем расщеплении эти фрагменты превращаются в iC3b и C3d, распознаваемые C3-рецепторами фагоцитирующих клеток, что обеспечивает поглощение и разрушение ими патогена. Второй механизм обусловлен литическим действием комплемента: последовательное вовлечение в реакцию «поздних» компонентов комплемента завершается формированием (с преимущественным участием фактора C9) в мембране клетки-мишени поры, нарушающей целостность клеточной стенки микроорганизма и приводящей к его гибели. Комплементсвязывающая способность в наибольшей степени свойственна антителам классов IgM, IgG1 и IgG3 (в связи с высоким сродством их Fc-доменов к C1q). Как уже отмечалось (см. раздел 2.5.1.7),

вклад прямого литического действия комплемента в его суммарный защитный эффект невелик и оно распространяется на ограниченный круг микроорганизмов, прежде всего нейссерий. Дефицит C3 и других, более ранних компонентов комплемента имеет больше проявлений в виде различных иммунодефицитов, что свидетельствует о важной роли опсонизирующего действия комплемента.

***Защитное действие антител, опосредованное привлечением эффекторных клеток***

Способность Fc-рецепторов различных клеток, прежде всего фагоцитов, распознавать участки в доменах C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3 молекул IgG-антител в составе иммунных комплексов имеет многообразное отражение в норме и при патологии. Антитела в составе растворимых иммунных комплексов распознаются Fc-рецепторами, что обеспечивает их поглощение (эндоцитоз) и последующее расщепление внутри клеток. Элиминацию растворимых иммунных комплексов осуществляют преимущественно макрофаги. Это очень важная функция, поскольку накопление растворимых комплексов, способных взаимодействовать с самыми разнообразными клетками и откладываться в различных тканях, привлекая воспалительные клетки, приводит к развитию патологии (см. раздел 4.5.2.2).

Антитела, связывающиеся с молекулами поверхности патогенов или иных чужеродных клеток, сами по себе, без комплемента, оказывают опсонизирующее действие, так как распознаются Fc-рецепторами фагоцитов и тем самым облегчают фагоцитоз. Опсонизирующей активностью в наибольшей степени обладают антитела изотипов IgG1 и IgG3. По опсонизирующей активности антитела несколько уступают компонентам комплемента, но часто эти факторы окладываются на поверхности клетки одновременно, что обеспечивает максимальную эффективность опсонизации. Суммирование эффектов двух опсонизирующих агентов (антител и компонентов комплемента) наглядно иллюстрируют результаты экспериментов по оценке выживаемости микроорганизмов *in vitro* после введения в систему сначала антител, а затем комплемента: каждый из этих факторов снижает выживаемость на 2 порядка.

Выше рассматривалось клеточное распределение различных типов Fc-рецепторов (см. раздел 2.3.4.2). Они широко представлены на всех фагоцитирующих клетках, но богаче всего ими макрофаги, которые экспрессируют все три основных типа рецепторов, (в том числе FcγRI, способный связывать свободные, не входящие в иммунный комплекс антитела). На этом основан особый механизм вовлечения антител в реализацию эффекторных функций макрофагов. Свободные антитела фиксируются FcγRI на их поверхности. При накоплении в тканевой жидкости больших количеств антител к определенным патогенам (при инфицировании) макрофаги могут удерживать на своей поверхности большое число молекул антител одной специфичности. Это обеспечивает специфическое распознавание патогена макрофагами, которые сами по себе не способны осуществлять антигенспецифическое распознавание. Такие макрофаги называют армированными. Им приписывают очень высокую антимикробную активность; *in vitro* они проявляют также противоопухолевую активность.

К опсонизирующим эффектам можно отнести способность антител, прикрепленных к клеткам-мишеням (опухолевым, аллогенным), облегчать реализацию клеточного (контактного) цитолиза НК-клетками. И в этом случае наибольшую активность проявляют антитела изотипов IgG1 и IgG3 — в соответствии с их наибольшим сродством к рецептору FcγRIII, экспрессируемому естественными киллерами. Распознавание фиксированных антител облегчает узнавание киллером клетки-мишени. Этот вариант цитотоксической реакции называют антителозависимым клеточноопосредованным цитолизом. Для реализации этого цитолиза требуется не особая разновидность НК-клеток (как считали ранее), а экспрессия на поверхности НК-клеток рецептора FcγRIII, т.е. молекулы CD16. Это характерно для субпопуляции естественных киллеров с фенотипом CD56<sup>lo</sup>CD16<sup>+</sup>, преобладающей в циркуляции. Этот же механизм цитолиза используют другие клетки, не являющиеся «профессиональными» контактными киллерами, например, нейтрофилы и макрофаги.

Таким образом, как и клеточные факторы адаптивного иммунитета, антитела реализуют свое защитное действие, преимущественно привлекая факторы врожденного иммунитета — фагоциты, естественные киллеры, компоненты комплемента. При этом они существенно повышают их эффективность и придают их действию прицельность.

### 3.6.2.5. Гибридомы и моноклональные антитела. Генно-инженерные антитела

Доказательством клональной основы иммунного ответа послужило создание гибридомной технологии для получения моноклональных антител. Технология основана на двух достижениях клеточной биологии:

- разработке метода гибридизации соматических клеток (первоначально его использовали преимущественно в генетике);
- получении линий миеломных клеток.

В 1976 г. Г. Келер (*G. Koehler*) и Ц. Мильштейн (*C. Milstein*) применили соматическую гибридизацию для слияния миеломных и нормальных антителообразующих клеток, что привело к созданию качественно новой клеточной технологии гибридом (рис. 3.122), революционизировавшей как иммунологию, так и биотехнологию.

Несколько ранее Ц. Мильштейн впервые использовал миеломные белки как источник гомогенных иммуноглобулинов, необходимых для изучения структуры V-доменов антител. Иногда удавалось определить специфичность этих моноклональных иммуноглобулинов, но большой проблемой была невозможность получения моноклональных антител заданной специфичности. В данном чисто исследовательском контексте и решалась задача получения гибридом — клеток, совмещающих два свойства: способность к неограниченному росту, которую они наследуют от миеломных (опухолевых) клеток, и задаваемую иммунизацией специфичность, которую они получают от антителообразующих клеток, присутствующих в селезенке иммунизированных мышей.

Первоначально для слияния клетки обрабатывали вирусом Сендай. Позже с этой целью стали применять полиэтиленгликоль, вызывающий слияние клеточных мембран, благодаря наличию в его составе, наряду с гидрофильными, гидрофобных групп. Для создания гибридом, продуциру-

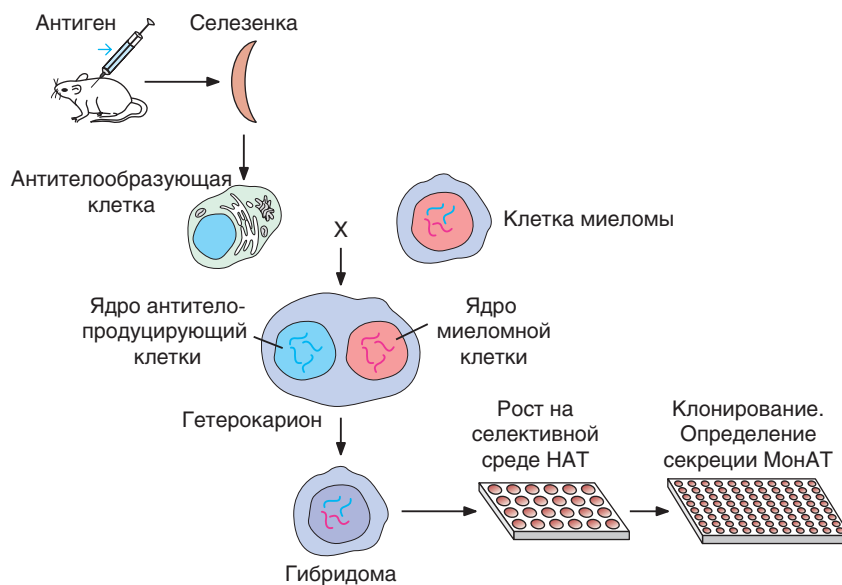


Рис. 3.122. Схема получения гибридом

ющих чистые моноклональные антитела, были получены мутанты миеломы, не секретирующие иммуноглобулины. Практически все линии миелом, используемые в настоящее время для гибридизации, происходят от культивируемого варианта РЗ миеломы МОРС-2, развившейся у мышей линии BALB/c и продуцирующей IgG κ-типа. При получении гибридом чаще других применяют сублинии РЗ Х63-Аg8.653, NS-Аg4/1 и Sp2/0-Аg14 (последняя сама по себе гибридома — продукт слияния клеток линии РЗ Х63-Аg8.653 и нормальных спленоцитов мышей линии BALB/c).

Клетки этих линий, утратившие способность секретировать собственные иммуноглобулины, были отобраны на селективных средах на устойчивость к 8-азагуанину и 6-тиогуанину (что отражено в их обозначениях). У этих клеток блокирован запасной путь синтеза нуклеотидов из гипоксантина и гуанина, используемых в качестве предшественников нуклеотидов. Эти особенности используют для отбора гибридных клеток после слияния. При соблюдении всех деталей технологии доля слившихся клеток с нужными характеристиками (возникших при слиянии клетки миеломы и антителообразующей клетки) невелика, поэтому необходимо создавать особые условия для их селекции. Нормальные партнеры для слияния способны выживать *in vitro* в течение нескольких дней и затем погибают. Для подавления роста опухолевых партнеров используют селективную среду HAT, содержащую гипоксантин (Н — *Hypoxanthine*), аминоптерин (А — *Aminopterin*) и тимидин (Т — *Thymidine*). Аминоптерин — яд, подавляющий основной путь биосинтеза нуклеотидов, гипоксантин и тимидин — субстраты для реализации запасных путей, заблокированных у миеломных клеток (о чем свидетельствует устойчивость к 8-азагуанину и 6-тиогуанину), но реализуемых у гибридных клеток, которые наследуют соответствующий ген от нормальной

родительской клетки. В результате культивирования на среде НАТ выживают только гибриды нормальных и опухолевых клеток, унаследовавшие от клеток миеломы «бессмертие», а от нормальных клеток — способность синтезировать нуклеотиды из гипоксантина и тимидина. Неслившиеся опухолевые клетки или гибриды типа «миелома×миелома» погибают, поскольку в среде НАТ нет субстрата для синтеза ими нуклеотидов или этот процесс заблокирован. Неслившиеся нормальные клетки или их гибриды друг с другом погибают, поскольку не способны длительное время выживать *in vitro*. Выжившие клетки переводят сначала на среду НТ, а затем на обычную ростовую среду RPMI 1640. Затем возникает необходимость в отборе клеток-продуцентов антител нужной специфичности. Это необходимо сделать как можно раньше, чтобы нужный клон не был подавлен другими клетками. Антитела к растворимым антигенам выявляют в иммуноферментной тест-системе, а к мембранным — методом проточной цитометрии. При выявлении продуцентов антител нужной специфичности их клонируют — проводят несколько пассажей клеток, постепенно увеличивая их разведение вплоть до одной клетки на лунку. Для каждого пассажа берут клетки из лунок с наибольшим титром антител. Получив несколько клонов, поддерживают те из них, которые обладают преимуществами перед другими по специфичности антител, продуктивности, скорости роста и изотипу (предпочтение отдают IgG-антителам). Моноклональность подтверждают методом изоэлектрофокусирования, доказательством гомогенности по изотипу и т.д. Обычно на этапах отбора и повторного клонирования теряется много клонов. Отобранные и стабилизированные путем повторных клонирований гибридомы хранят в замороженном состоянии в жидком азоте. Для наработки моноклональных антител клетки гибридомы культивируют *in vitro* или *in vivo* в брюшной полости сингенных мышей линии BALB/c или их гибридов с другими линиями.

Несмотря на значительные целенаправленные усилия, не удалось разработать адекватные методы получения гибридом на основе клеток человека, хотя потребность в человеческих моноклональных антителах, которые можно было бы использовать при иммунотерапии, очень велика. В настоящее время эту проблему решают с помощью генно-инженерных подходов. Самый распространенный среди них — «гуманизация» мышинных антител. Метод состоит в создании генетических комплексов, объединяющих V-гены мышинных антител и C-гены иммуноглобулинов человека. Следующим шагом послужила замена не только C-генов, но и каркасных последовательностей V-генов мыши соответствующими последовательностями генов человека. В этом случае от мышинных антител остаются только гипервариабельные участки, определяющие специфичность антител, но не их антигенность.

В настоящее время получение моноклональных антител стало одним из наиболее доходных направлений биотехнологического бизнеса. Получено огромное число моноклональных антител, с помощью которых решены многие принципиальные проблемы иммунологии и других разделов биологии. Моноклональные антитела широко используют в иммунодиагностике. Проточная цитометрия была усовершенствована и нашла чрезвычайно широкое распространение в значительной степени благодаря применению моноклональных антител. Их используют также для фракционирования клеток,

чрезвычайно востребованного в экспериментальных исследованиях, а в последние годы ставшего очень актуальным в связи с быстрым развитием цитотерапии. Наконец, моноклональные антитела используют в иммунотерапии как самостоятельные факторы и основу для создания иммунотоксинов.

Гибридомы получают также путем слияния клеток иной природы, чем антителопродуценты, например Т-лимфоцитов. Однако этот прием используют исключительно в экспериментальной иммунологии.

### ***Генно-инженерные антитела***

Часто возникает необходимость получить (с различными целями) искусственный белок, воспроизводящий минимальную часть молекулы антитела, содержащую ее антигенсвязывающий участок. Такая молекула должна содержать V-домены H- и L-цепей. С точки зрения генной инженерии получение такой конструкции не представляет особого труда. Однако для решения задачи отбора антителоподобных молекул требуемой специфичности потребовалось разработать специальную технологию фагового дисплея.

Для создания библиотек фагового дисплея V-гены H- и L-цепей, выделенные из библиотек экспрессируемых генов В-лимфоцитов, комбинируют в случайных сочетаниях. В результате получают огромный набор Fab-молекул разнообразных специфичностей — комбинаторную библиотеку. Гены этих молекул сливают с генами филаментозного белка оболочки бактериофага рIII. Такие фаги размножают в бактериях, которые продуцируют частицы фага, несущие продукты слитых генов. Комплекс таких фагов и составляет библиотеку фагового дисплея. При необходимости связывая с фиксированным антигеном, из популяции извлекают фаги, кодирующие Fab-домены нужной специфичности. Таким фагом можно инфицировать бактериальные клетки, которые будут служить источником данных антигенспецифических молекул.

В качестве минимальной антигенсвязывающей молекулы используют scFv (*Single chain fragment variable*). Они представляют собой единую молекулу, содержащую связанные ковалентно V-домены H- и L-цепей. Такие молекулы могут быть димеризованы. Другой вариант молекул антител, сконструированных методами генной инженерии — мини-тела (*Minibody*). Они представляют единую полипептидную цепь (молекулярная масса около 60 кДа), содержащую два  $\beta$ -слоя из V<sub>H</sub>-домена по 3  $\beta$ -складки в каждом. В этих слоях содержатся гипервариабельные петли H1 и H2. При их создании и селекции также используют методы фагового дисплея.

Подобные минимальные антигенсвязывающие белки дают значительные преимущества при создании более сложных молекулярных конструкций (конъюгатов с маркерными молекулами, ферментами, флуорохромами), используемых в настоящее время как в исследовательских, так и в диагностических целях), а также для доставки лекарственных средств и токсинов в целях иммунотерапии. Гены мини-тел формируют не только из нативных генов, но и комбинируя их гипервариабельные участки (CDR).

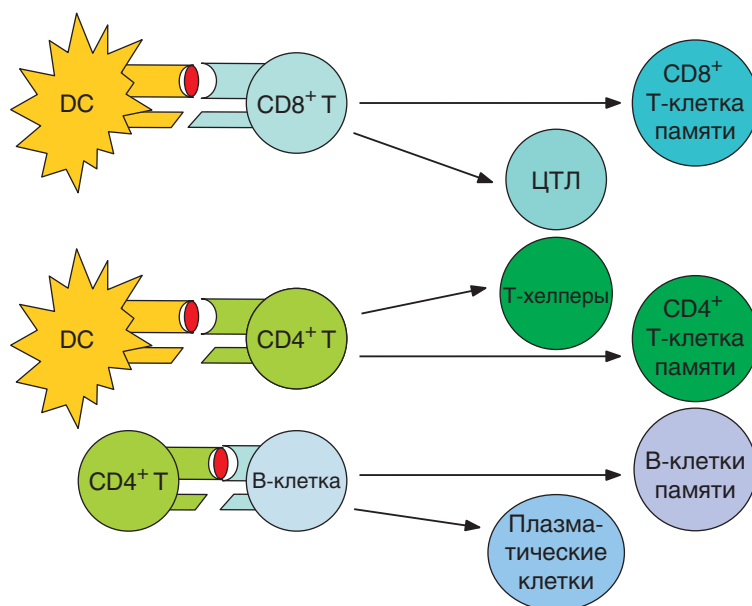
### **3.6.3. Иммунологическая память и вторичный иммунный ответ**

В ходе иммунного ответа на антиген формируется иммунологическая память. Ее материальные носители — клетки памяти. Эти клетки возни-

кают позже, чем эффекторные клетки (обычно через 3 нед, т.е. после завершения основных событий классического иммунного ответа), но длительно (иногда пожизненно) циркулируют в организме и обеспечивают ускоренный и более сильный ответ на тот же антиген. Способность формировать клетки памяти в ответ на контакт с антигеном составляет одно из наиболее кардинальных отличий адаптивного иммунитета от врожденного и, без сомнения, является главным преимуществом первого. Особенность клеток памяти состоит в том, что они не участвуют в иммунном ответе, в ходе которого они образовались (например, в первичном иммунном ответе). Но при повторном поступлении специфического для этих клеток антигена их реакция оказывается более быстрой, мощной и результативной, чем ответ наивных лимфоцитов. Присутствие в организме клеток памяти к антигенам возбудителей обеспечивает устойчивость к ним организма (собственно, наличие иммунитета).

### 3.6.3.1. В-клетки памяти

В-клетки памяти развиваются одновременно с плазматическими антителообразующими клетками в апикальном отделе зародышевых центров (рис. 3.123). Источник этих клеток — В-центроциты, прошедшие все стадии развития в базальной зоне зародышевого центра. Это означает, что в них уже реализовались процессы соматического гипермутагенеза, переключения изотипов и созревания аффинитета. В-клетки памяти



**Рис. 3.123.** Параллельное развитие эффекторных лимфоцитов и клеток памяти. При первичном иммунном ответе одновременно с формированием эффекторных Т-клеток и антителообразующих клеток дифференцируются Т- и В-клетки памяти, не участвующие в первичном иммунном ответе, но обеспечивающие усиление иммунного ответа при повторном поступлении антигена

морфологически не отличаются от наивных В-клеток. Однако последствия вышеупомянутых процессов позволяют отличить их от наивных В-лимфоцитов (см. табл. 2.28). В-клетки памяти несут на своей поверхности IgG, IgA или реже IgE, но не IgD. IgM<sup>+</sup> В-клетки памяти образуются лишь в ходе Т-независимого иммунного ответа на ТН-2 антигены. В V-генах иммуноглобулинов в этих клетках выявляются последствия мутационного процесса и их мембранным иммуноглобулинам свойственно более высокое сродство к антигену, чем у наивных В-клеток. В зависимости от стадии развития В-клетки памяти несут на поверхности или лишены рестриктированной формы молекулы CD45 — B220 (у более зрелых В-клеток памяти она отсутствует). В-клетки памяти значительно отличаются от плазматических клеток, прежде всего морфологически, а также локализацией иммуноглобулина на поверхности клетки, а не в цитоплазме, отсутствием секреции антител, наличием разнообразных рецепторных структур на поверхности и отсутствием характерной для плазматических клеток молекулы CD138 (синдикана).

Молекулярная предпосылка дифференцировки В-клеток памяти — ослабление экспрессии внутриклеточного фактора Bcl-6 в отсутствие экспрессии фактора Blimp-1 (условием дифференцировки плазматических клеток наряду с утратой Bcl-6, наоборот, является экспрессия Blimp-1).

Для последующей миграции В-клеток памяти важна смена хемокиновых рецепторов на поверхности дифференцирующихся клеток: ослабляется экспрессия рецептора CXCR5, обуславливающего задержку клеток в зародышевых центрах, и усиливается экспрессия CXCR4, распознающего хемокин CXCL12, известный также как SDF-1 (*Stroma-derived factor 1*), продуцируемый стромальными клетками лимфоидных органов и костного мозга. Эти изменения, а также повышение подвижности клеток в значительной степени ответственны за выход В-клеток памяти из зародышевых центров в рециркуляцию и их миграцию в костный мозг.

Срок жизни В-клеток памяти и его зависимость от повторного распознавания антигена точно не установлены, но В-клеточная память сохраняется годами. В связи с этим обсуждают вопрос о возможности причисления к клеткам памяти долгоживущих плазматических клеток, в значительной степени сосредоточенных в костном мозгу и способных мобилизоваться из него при повторной иммунизации. Как известно, срок жизни этих клеток сопоставим с продолжительностью жизни человека и животных (см. раздел 3.6.2.3).

#### 3.6.3.2. Т-клетки памяти

Т-клетки памяти дифференцируются из активированных Т-лимфоцитов (CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>) в Т-зонах лимфоидных органов под действием антигена, презентируемого им дендритными клетками (см. рис. 3.123). Т-клетки памяти развиваются несколько позже эффекторных Т-клеток: если пик численности эффекторных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов приходится на 7-е сутки после инфицирования вирусом, а к 15-м суткам их численность уже снижается, CD8<sup>+</sup> Т-клеточная память формируется между 3-й и 4-й неделями после иммунизации. Эти данные относятся и к CD4<sup>+</sup> Т-клеткам памяти. Развитие CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти нуждается в помощи CD4<sup>+</sup> Т-клеток.

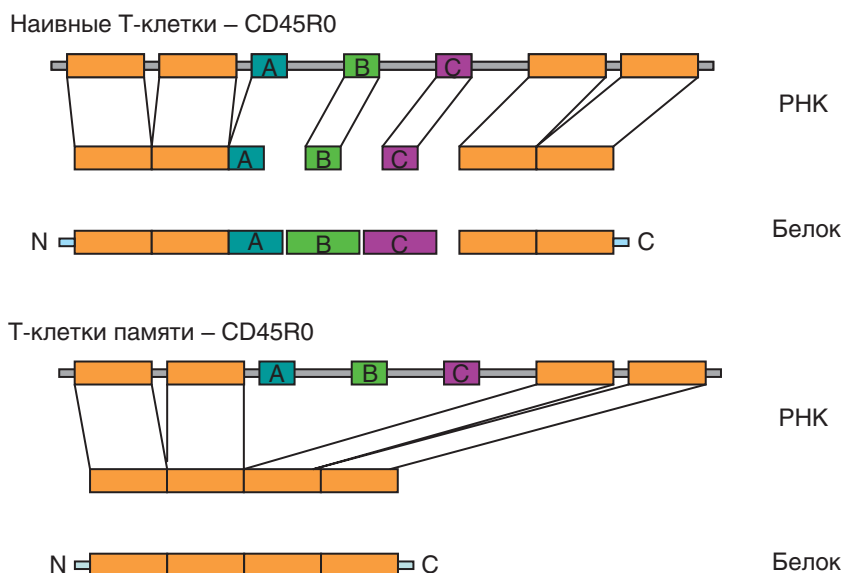
Вопрос о дифференцировке Т-клеток памяти из уже дифференцированных субпопуляций Т-хелперов в настоящее время до конца не решен. Известно, что предшественниками клеток памяти не являются  $IFN\gamma$ -продуцирующие клетки (т.е. Th1-клетки), в то же время ими могут быть как  $IL-4^-$ , так и  $IL-4^+ CD4^+$  Т-клетки (т.е. Th2-клетки).

Т-клетки памяти имеют морфологию малых лимфоцитов, но отличаются от наивных Т-клеток многими деталями мембранного фенотипа. От эффекторных Т-клеток они отличаются прежде всего отсутствием функциональной активности — синтеза цитокинов, а  $CD8^+$  Т-клетки памяти — еще и отсутствием цитотоксической активности и ее морфологических (цитолитические гранулы) и молекулярно-генетических (экспрессия генов перфорина и гранзима В) проявлений.

Тем не менее, многие свойства сближают Т-клетки памяти с эффекторными Т-лимфоцитами (табл. 3.29). При развитии тех и других повышается экспрессия продуктов генов МНС классов I и II,  $CD2$ , его лиганда  $CD58$ ,  $\beta_2$ -интегрина LFA-1 и индуцируется экспрессия  $\beta_1$ -интегринов (в наибольшей степени VLA-4). В то же время степень экспрессии TCR и корецепторов не изменяется. На поверхности наивных Т-клеток в период покоя TCR и корецепторы  $CD4/CD8$  физически не связаны и только при формировании иммунного синапса между ними устанавливается нековалентная связь, благодаря которой TCR перемещается в рафт (см. раздел 3.5.1.3). По некоторым данным, эта связь сохраняется в Т-клетках памяти.

**Таблица 3.29.** Сравнительная характеристика наивных и активированных Т-лимфоцитов, плазматических клеток и Т-клеток памяти

Клетка	Молекулы адгезии	Хемокиновые рецепторы	Варианты экспрессируемых молекул $CD45$	Костимулирующие молекулы	Другие молекулы активации
Покояющаяся Т-клетка	$CD62L$ , LFA-1, $CD2$	CXCR7	$CD45RA$	$CD28$	Не установлены
Активированная Т-клетка	Ослабление экспрессии $CD62L$ , LFA-1, $CD2$ . Появление VLA-4, ICAM-1	CCR4, CCR6, CCR9, CCR10	Последовательный переход на экспрессию $CD45RB$ , $CD45RC$ и $CD45R0$	$CD28$ , $CD154$ , $CD152$ , ICOS	$CD69$ , $CD25$ , МНС-II, $CD71$ , $CD95$
Центральная Т-клетка памяти	$CD62L$ , LFA-1, VLA-1	CCR7	$CD45R0$	$CD28$	Не установлены
Эффекторная Т-клетка памяти	$CD44$ , VLA-4, LFA-1, $CD2$ , $\beta_7$ -интегрины	CCR4, CCR6, CCR9, CCR10, CXCR4	$CD45R0$	$CD28$ , ICOS	МНС-II



**Рис. 3.124.** Особенности сплайсинга рибонуклеиновой кислоты и структуры внеклеточной части молекулы CD45R наивных Т-клеток и Т-клеток памяти

Выше уже упоминалось об изменениях структуры молекулы CD45, происходящих при дифференцировке Т-лимфоцитов в эффекторные клетки. Эти особенности молекулы CD45 свойственны также Т-клеткам памяти. Суть изменений состоит в утрате внеклеточных доменов А, В и С и превращении молекулы в укороченный вариант CD45R0, облегчающий активацию клетки (рис. 3.124). Молекула CD45R0 в качестве маркера Т-клеток памяти не очень надежна, поскольку со временем может замещаться исходным вариантом молекулы CD45RA и лишь при повторной стимуляции восстанавливается изоформа CD45R0.

Биологический смысл изменений структуры молекулы CD45 неясен. Есть сведения о том, что формирование иммунного синапса с участием клеток, несущих укороченный вариант молекулы CD45, облегчается за счет устранения помех для взаимодействия клеток, создаваемых протяженной молекулой CD45RA. С этим связывают более быструю и эффективную активацию Т-клеток, несущих укороченный вариант молекулы. Кроме того, установлено, что CD45RA<sup>+</sup> Т-клетки с большей вероятностью подвергаются апоптозу при действии активирующих стимулов. Устойчивость Т-клеток памяти к апоптотической гибели повышается также в связи с усиленной экспрессией антиапоптотических молекул Bcl-2 и Bcl-X<sub>L</sub>. Эффекторным Т-клеткам вначале тоже свойственна сильная экспрессия этих молекул, но затем она ослабляется, что обуславливает их относительно раннюю гибель.

Большое число изменений мембранных молекул, общих для эффекторных Т-клеток и значительной части Т-клеток памяти (эффекторных Т-клеток памяти), затрагивает свойства, определяющие направление миграции клеток. Прежде всего происходит ослабление экспрессии L-селектина (CD62L), обуславливающее поступление рециркулирующих наивных Т-кле-

ток во вторичные лимфоидные органы. Кроме того, эффекторные клетки перестают экспрессировать хемокиновый рецептор CCR7 — проводник клеток в Т-зоны. Ослабление экспрессии CD62L и утрата CCR7 обуславливает значительное ослабление способности этих клеток мигрировать в Т-зоны вторичных лимфоидных органов. Вместо этого эффекторные Т-клетки, включая Т-клетки памяти, начинают экспрессировать CD44 (распознает гиалуронаты), а также ряд интегринов ( $\beta_1$ ,  $\beta_7$ ) и хемокиновых рецепторов, не характерных для наивных Т-клеток. Эти молекулы обуславливают миграцию несущих их клеток в барьерные ткани, а также в очаги воспаления. Хемокиновые рецепторы, экспрессируемые эффекторными Т-клетками памяти, направляют миграцию этих клеток в определенные участки организма: CCR6 — в различные слизистые оболочки, CCR9 — в кишечник, CCR4 и CCR10 — в кожу, CXCR4 — в костный мозг. Кроме того, некоторые из этих рецепторов (CCR4, CCR6) необходимы для миграции Т-клеток памяти в воспаленные ткани.

Однако помимо эффекторных Т-клеток памяти существует другая их разновидность — центральные Т-клетки памяти. Сравнительная характеристика двух вариантов Т-клеток памяти представлена в табл. 3.29. Эти клетки сохраняют молекулы хоминга, свойственные наивным Т-клеткам. Это определяет сохранение центральными Т-клетками памяти способности мигрировать в Т-зоны вторичных лимфоидных органов. Центральные и эффекторные Т-клетки памяти различаются также по скорости мобилизации во вторичный иммунный ответ (она существенно выше у эффекторных). Существует 2 различных взгляда на взаимоотношение этих клеток. Согласно одному из них центральные и эффекторные — 2 разные субпопуляции Т-клеток памяти; согласно другому — это стадии развития Т-клеток памяти (предполагают, что центральные клетки служат предшественниками эффекторных клеток памяти).

Таким образом, эффекторные Т-клетки памяти по своей локализации и путям рециркуляции существенно отличаются от наивных Т-клеток и центральных Т-клеток памяти. Если два последних типа клеток в процессе рециркуляции постоянно возвращаются в Т-зоны вторичных лимфоидных органов (лимфатических узлов, селезенки и пейеровых бляшек), то эффекторные Т-клетки памяти рециркулируют, практически минуя эти органы, и мигрируют в костный мозг и нелимфоидные органы, особенно в барьерные ткани. Эти пути рециркуляции пересекаются в брыжеечных лимфатических узлах, в которые могут проникать как наивные Т-лимфоциты, так и Т-клетки памяти.

Для Т-клеток памяти характерен очень продолжительный срок жизни, сопоставимый со сроком жизни всего организма. Об этом свидетельствует сохранение в течение десятков лет клеток, несущих хромосомные перестройки, индуцированные лучевыми воздействиями. Описано сохранение памяти к антигенам вирусов (обусловлена CD8<sup>+</sup> Т-клетками) в течение 75 лет. В настоящее время не вызывает сомнений, что для поддержания длительного персистирования в организме Т-клеток памяти повторные контакты их с антигеном не требуются. Суммарная численность Т-клеток памяти с возрастом постепенно увеличивается, достигая в преклонном возрасте половины всех Т-лимфоцитов. В то же

время клональная структура популяции Т-клеток памяти существенно отличается от таковой наивных Т-клеток. Как уже отмечалось, численность клонов наивных Т-лимфоцитов составляет  $10^5$ – $10^6$  клеток, а численность клеток в каждом клоне составляет  $(1\text{--}2)\times 10^5$ . При общей численности Т-клеток памяти, сопоставимой с численностью наивных Т-лимфоцитов, популяция Т-клеток памяти содержит примерно  $10^3$  клонов, т.е. на 2–3 порядка меньше, чем в популяции наивных Т-клеток. Следовательно, число Т-клеток памяти в каждом клоне в 100–500 раз больше, чем в клонах наивных Т-клеток. Уже это обстоятельство свидетельствует о преимуществах вторичного ответа (который начинается с активации клеток памяти) перед первичным.

Репертуар Т-клеток памяти отражает часть антигенраспознающего репертуара лимфоидных клеток организма, который имеет отношение к распознаванию антигенов, реально окружающих данный организм, т.е. «актуальных» антигенов. Реаранжировка V-генов создает случайный антигенраспознающий репертуар, не учитывающий реальные потребности организма, а процесс селекции вносит в него коррективы, удаляя ненужные (не распознающие молекул МНС) и опасные (аутоспецифические) клоны. Под влиянием прямого воздействия экзогенных антигенов формируется антигенраспознающий репертуар Т-клеток памяти — третий по счету и наиболее адекватный реальным потребностям организма вариант антигенраспознающего репертуара.

Как уже отмечалось, для поддержания жизнеспособности Т-клеток памяти не требуется участие антигена. Численность Т-клеток памяти определяют 3 процесса:

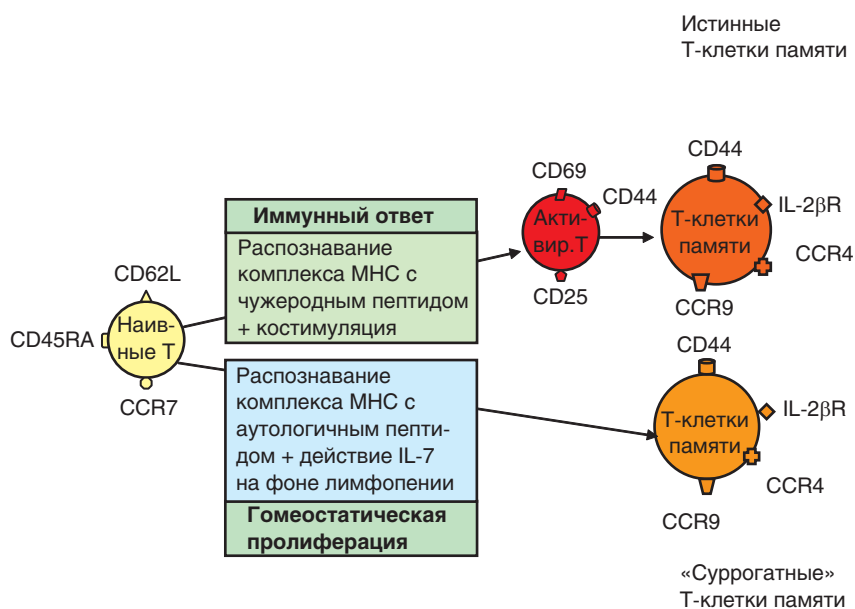
- выживаемость клеток;
- фоновая пролиферация;
- гомеостатическая пролиферация (направлена на устранение изменений численности клеток, вызванных различными причинами).

Гомеостаз Т-клеток памяти поддерживается по «облегченному» варианту по сравнению с гомеостазом наивных Т-клеток, поскольку потребность в контактном распознавании комплексов молекул МНС с антигенными пептидами клеток памяти минимальна, а контроль осуществляется почти исключительно гомеостатическими цитокинами IL-15 и IL-7 (см. рис. 3.79). Фоновую пролиферацию  $CD8^+$  Т-клеток памяти поддерживает IL-15, а  $CD4^+$  Т-клеток памяти — IL-7. Те же цитокины служат факторами выживаемости упомянутых клеток, хотя для  $CD8^+$  Т-клеток IL-15 может быть заменен на IL-7. Наконец, гомеостатическую пролиферацию  $CD8^+$  Т-клеток памяти индуцирует IL-7 и только при индукции гомеостатической пролиферации  $CD4^+$  Т-клеток памяти наряду с действием IL-7 требуется распознавание комплексов МНС с пептидными фрагментами аутоантигенов. Постепенное увеличение с возрастом объема популяции Т-клеток памяти в значительной степени связано с увеличением спонтанной выработки IL-15. IL-15 презентруется  $CD8^+$  Т-клеткам памяти (как и NK-клеткам) в комплексе с  $\alpha$ -цепью его рецептора (IL-15R $\alpha$ ), а распознается димерным рецептором  $\beta\gamma$ -рецептором для IL-2/IL-15 промежуточного аффинитета.

Поскольку размер пула Т-клеток памяти для каждого возраста стабилен, возникает проблема его изменения при действии очередного антигена. Так,

при инфицировании патогенами, с которыми организм ранее не контактировал, возникают новые клоны Т-клеток памяти, что должно было бы привести к увеличению объема их популяции. Этого не происходит благодаря феномену сокращения (*attrition*): все клоны Т-клеток равномерно уменьшают свою численность в соответствии с уровнем гомеостатических цитокинов, а также действием  $IFN\alpha$ , ограничивающего фоновую пролиферацию этих клеток.

Следует упомянуть еще один источник Т-клеток памяти, обозначаемых как «суррогатные». Массовая гибель Т-лимфоцитов под влиянием повреждающих факторов (облучение, цитотоксические лекарственные средства и т.д.) приводит к запуску гомеостатической пролиферации наивных периферических Т-лимфоцитов. В результате численность Т-клеток восстанавливается, но происходит **конверсия** мембранного фенотипа Т-клеток: вместо молекул, характерных для наивных Т-клеток, экспрессируются молекулы, свойственные Т-клеткам памяти (рис. 3.125). Вследствие этого образующиеся Т-клетки рециркулируют подобно Т-клеткам памяти. В отличие от естественного процесса дифференцировки Т-клеток памяти, процесс конверсии происходит без предварительной активации Т-клеток и поликлонально. Эти клетки пополняют пул эффекторных Т-клеток памяти. Однако такая поликлональная реакция лишена функциональной целесообразности и имеет отрицательные последствия. Так, эти клетки, не обогащающие



**Рис. 3.125.** Особенности формирования Т-клеток памяти при иммунном ответе и подобных им (суррогатных) Т-клеток при гомеостатической пролиферации. Классический путь дифференцировки Т-клеток памяти в результате распознавания антигена и активации сопоставлен с формированием поликлональных «суррогатных» Т-клеток в процессе гомеостатической пролиферации, не предусматривающей контакта с антигеном и активации

антигенраспознающий репертуар «актуальными» клонами, занимают в нишах место, предназначенное для истинных Т-клеток памяти и тем самым сужают объем «полезных» клонов. Другое отрицательное последствие конверсии регенерирующих наивных Т-клеток в Т-клетки памяти состоит в повышении угрозы развития аутоиммунных процессов. К рассмотрению этого вопроса мы вернемся позже (см. раздел 4.4.1.1).

### 3.6.3.3. Вторичный иммунный ответ

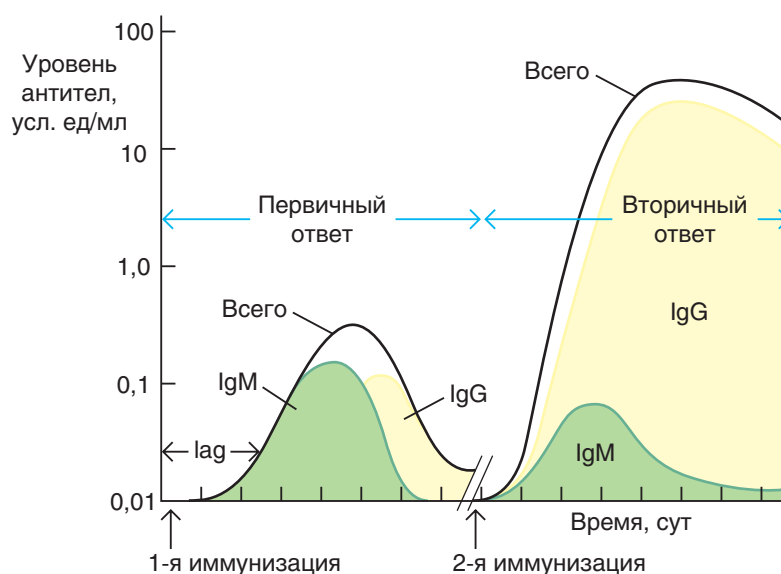
Вторичный иммунный ответ отличается от первичного по многим параметрам (табл. 3.30). Он развивается быстрее, требует меньших доз антигена, его проявления более интенсивны, он имеет более выраженные признаки «созревания» аффинитета (прежде всего высокое сродство антител к антигену), специфичность его гуморальных и клеточных факторов по отношению к иммуногену выше и, наконец, он обеспечивает более эффективную защиту организма, чем первичный иммунный ответ. Особенно четко особенности вторичного иммунного ответа могут быть проиллюстрированы на примере антителиобразования.

**Таблица 3.30.** Сравнительная характеристика первичного и вторичного иммунного ответа

Характеристика	Первичный иммунный ответ	Вторичный иммунный ответ
Место запуска иммунного ответа	Региональный лимфатический узел	Барьерные ткани и любые места попадания антигена
Антигенпрезентирующие клетки	Дендритные	Дендритные клетки, макрофаги, В-клетки, активированные эпителиальные клетки и т.д.
Реагирующие клетки	Наивные лимфоциты	Клетки памяти
Исходная частота антигенспецифических клеток-предшественников	$10^{-5} - 10^{-6}$	$10^{-3} - 10^{-4}$
Дифференцировка клеток	Клетки проходят все стадии дифференцировки от наивной до эффекторной клетки	Прохождение клетками некоторых стадий развития (переключение изотипов, созревание аффинитета, дифференцировка Th1/Th2 и т.д.) не требуется
Лаг-период гуморального ответа	4–7 сут	1–3 сут
Пик гуморального IgG-ответа	8–10 сут	4–5 сут
Аффинность IgG-антител	$10^{-5} - 10^{-6}$	$10^{-7} - 10^{-10}$
Интенсивность гуморального ответа	Варьирует	В 100–1000 раз выше, чем при первичном

Темп и интенсивность IgM-ответа примерно одинакова при первичной и вторичной реакции на антиген, и аффинность IgM-антител практически не изменяется, оставаясь низкой — около  $10^{-5}$  М. Очевидно, это означает, что в популяции В-клеток памяти практически отсутствуют клетки, несущие мембранный IgM, такие клетки вовлекаются в ответ на повторное поступление антигена как в первичный иммунный ответ. Что касается IgG-ответа, то его уровень при вторичном иммунном ответе несопоставимо выше, чем при первичном. Этому способствует более высокая частота антигенспецифичных клеток-предшественников ( $10^{-3}$ – $10^{-4}$  против  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  при первичном ответе), а также облегченная активация клеток (особенно Т-хелперов). При этом значительно ускоряется темп возрастания титра антител и он достигает более высоких величин. Антитела дольше персистируют в сыворотке крови (рис. 3.126). При вторичном иммунном ответе в зародышевых центрах происходит повторение процессов, приводящих к повышению сродства антител к антигену — вновь усиливается мутагенез V-генов и затем происходит селекция высокоаффинных клонов, основанная на их конкуренции за антиген, презентруемый фолликулярными дендритными клетками. В результате аффинитет антител при каждой повторной иммунизации возрастает примерно на порядок или несколько выше (до  $10^{-7}$ – $10^{-8}$  М после повторной, до  $10^{-8}$ – $10^{-10}$  после третьей иммунизации и т.д.).

Быстроту развития вторичного гуморального ответа можно подтвердить и морфологическим определением клеток, секретирующих IgG-антитела в лимфатических узлах и селезенке. Если при первичном иммунном ответе



**Рис. 3.126.** Динамика образования IgM- и IgG-антител при первичном и вторичном иммунном ответе. Показано резкое усиление образования IgG-антител при вторичном иммунном ответе по сравнению с первичным, и сходный уровень образования IgM-антител при первичном и вторичном ответах

пик численности IgG-антителообразующих клеток в лимфоидных органах достигается к 8–10-м суткам, то при вторичном ответе его регистрируют на 5–7-е сутки. При этом обращает на себя внимание быстрота исчезновения этих клеток из лимфоидных органов. Это можно объяснить более быстрой эмиграцией антителопродуцентов из фолликулов лимфоидных органов в костный мозг, в котором преимущественно реализуется продуктивная фаза вторичного иммунного ответа (до 80% образуемых антител).

Более высокая эффективность свойственна также вторичному гуморальному иммунному ответу, обеспечивающему защиту слизистых оболочек. Присутствие  $\text{IgA}^+$  В-клеток памяти в *lamina propria* позволяет сократить длительную индуктивную фазу, свойственную первичному IgA-ответу, при котором много времени необходимо для миграции клеток, стимулированных антигеном, в лимфатические узлы и обратное движение созревающих IgA-клеток. При вторичном иммунном ответе  $\text{IgA}^+$  В-клетки активируются на месте, быстро превращаются в IgA-плазмобласты и начинают секретировать IgA-антитела.

Хотя такие же четкие данные, иллюстрирующие преимущества вторичного Т-клеточного ответа перед первичным отсутствуют, наличие подобных преимуществ не вызывает сомнений, о чем свидетельствуют многочисленные косвенные данные. Изучение реакции цитотоксических Т-лимфоцитов на аллоантигены *in vitro* свидетельствует о том, что использование Т-клеток от предварительно иммунизированных животных существенно ускоряет и усиливает ответ. При этом в меньшей степени, чем при первичном ответе, проявляется его зависимость от костимуляции, хотя потребность в IL-2 для осуществления пролиферативной экспансии клонов Т-клеток сохраняется.

Как и при гуморальном иммунном ответе, темп нарастания числа цитотоксических Т-клеток при вторичном клеточном ответе на вирусные антигены значительно выше, чем при первичном. Вторичный клеточный ответ воспалительного типа также протекает более интенсивно и результативно, чем первичный, о чем можно судить по усилению реакции гиперчувствительности замедленного типа при повторном действии того же стимулятора или по ускорению реакции отторжения трансплантата при повторной подсадке ткани того же фенотипа. Значительный вклад в интенсификацию вторичных реакций клеточного ответа вносит выброс больших количеств цитокинов не только Т-клетками, но и макрофагами. При реакции на аллотрансплантат это обуславливает нарушение ангиогенеза и васкуляризации подсаженной ткани и вызывает ее быструю гибель.

Преимущества вторичного иммунного ответа перед первичным — результат формирования иммунологической памяти. Эти преимущества обусловлены рядом факторов.

- Исходная численность каждого клона клеток памяти на 2–3 порядка выше, чем клона наивных клеток.
- Клетки памяти пребывают в клеточном цикле, а наивные лимфоциты — в фазе покоя ( $G_0$ ), для выхода из которой им требуется время и особые воздействия (активация).
- При действии антигена клетки памяти не должны проходить некоторые стадии развития (в случае В-клеток — переключение изотипов, мутагенез V-генов и созревание аффинитета; в случае Т-клеток —

формирование связей TCR с корцепторами, перемещение TCR в рафты, дифференцировку Th1/Th2; для всех лимфоцитов — изменение спектра хемокиновых рецепторов и др.).

- Клетки памяти быстрее и эффективнее реагируют на антиген (активируются, дифференцируются в эффекторные клетки), что обусловлено изменениями сигнальных путей. Так, изоформа CD45R0, характерная для клеток памяти, способствует более быстрой активации, чем CD45RA, свойственная наивным Т-клеткам. В результате Т-клетки памяти могут быть активированы при презентации антигена любыми АПК, тогда как наивные Т-клетки — только дендритными клетками.
- В силу более интенсивной рециркуляции и способности мигрировать в барьерные и нелимфоидные ткани Т-клетки памяти с большей вероятностью могут «встретить» антиген. Этот антиген может быть презентируван им на месте, а не только во вторичных лимфоидных органах, как в случае наивных Т-клеток.

Наличием иммунологической памяти характеризуют состояние иммунитета к возбудителям инфекционных заболеваний. Индукция клеток памяти — цель вакцинации, разработка эффективных методов которой послужило основой для развития научной иммунологии.

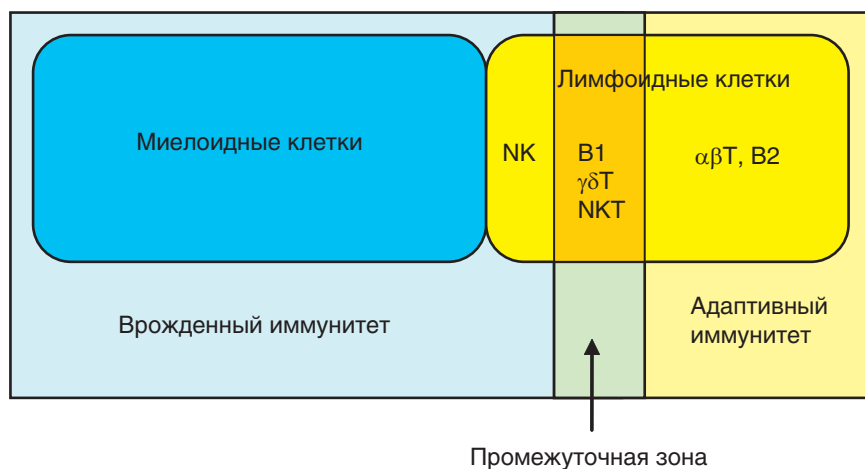
### 3.6.4. Неклассические проявления иммунных реакций

Главные участники и исполнители адаптивного иммунитета — Т- и В-лимфоциты с их вариабельными рецепторами и клональной структурой популяций. NK-клетки, напротив, лишены клональной варибельности и функционируют в рамках врожденного иммунитета, хотя и отличаются рядом признаков от классических представителей этой ветви иммунитета — миелоидных клеток. Существует несколько субпопуляций В- и Т-лимфоцитов, занимающих промежуточное положение между врожденным и адаптивным иммунитетом. Они несут вариабельные рецепторы для антигена, но их вариабельность выражена слабее, чем у классических Т- и В-лимфоцитов. В то же время эти клетки имеют свойство клеток врожденного иммунитета — готовность к выполнению защитных функций без предварительной, достаточно длительной фазы подготовки.

Знания об этих субпопуляциях пока очень ограничены и их место в иммунной системе определено не четко. Несмотря на клональную структуру и способность распознавать индивидуальные антигены, эти клетки тем не менее по особенностям реактивности следует относить к клеткам врожденного иммунитета. Придерживаемся компромиссного варианта и рассматриваем эти клетки в рамках адаптивного иммунитета в качестве клеток «промежуточного типа» (эквивалент англ. от термина *Innate-like*) (рис. 3.127).

#### 3.6.4.1. Функциональная активность В1-клеток

По своим функциональным характеристикам В1-клетки (см. раздел 3.3.1.3) принадлежат к группе «промежуточных» лимфоидных клеток. В1-лимфоциты отличаются от обычных В2-клеток особенностями локализации и развития. Большинство В1-лимфоцитов отвечают на ТН-антигены, т.е. не требуют обязательного участия в ответе Т-лимфоцитов. Есть



**Рис. 3.127.** Миелоидные и лимфоидные клетки «обслуживают» различные типы иммунитета. Цвет овалов соответствует двум основным типам иммуноцитов, фоновый цвет прямоугольников — типам иммунитета. Следует обратить внимание на промежуточную зону, в которой специфическое распознавание антигена антигенраспознающими рецепторами сочетается с быстротой мобилизацией клеток и независимостью реакции от иммунного ответа

данные, что В1-клетки способны продуцировать антитела конститутивно, т.е. независимо от стимуляции антигеном. Однако в этом вопросе много неясного, поскольку нельзя исключить активацию этих клеток аутоантигенами. К этому следует добавить, что подавляющее большинство В1-клеток в брюшной полости (основном месте их локализации) имеют активированный фенотип ( $CD80/86^+$ ), т.е. несут следы предшествовавшего «антигенного опыта».

Природа стимулов, запускающих дифференцировку В1-клеток в антитело-продуценты, до конца невыяснена. В1-клетки функционируют преимущественно в *lamina propria* слизистых оболочек и селезенке. В основных местах их локализации — в серозных полостях — В1-лимфоциты, по-видимому, не продуцируют иммуноглобулины. Причина этого в настоящее время неизвестна, но, вероятно, угнетение активности В-клеток в серозных полостях обусловлено действием локального микроокружения. В1-клетки не мигрируют в первичные фолликулы и зародышевые центры вторичных фолликулов в силу отсутствия у них рецептора CXCR5.

Поскольку В1-лимфоциты отвечают преимущественно на ТН-антигены, в процессе их развития не происходит переключения изотипов, гипермутационеза и созревания аффинитета. Исключение составляют IgA-продуценты слизистой оболочки кишечника (до 50% из них происходит от В1-лимфоцитов). Поскольку В1-клетки экспрессируют молекулы CD80 и CD86, они могут выступать в качестве АПК. Таким образом, несмотря на то, что для ответа на антигены В1-клеткам непосредственная помощь Т-лимфоцитов не требуется, сами В1-клетки могут индуцировать дифференцировку наивных  $CD4^+$  Т-клеток (в Th1- и Th17-клетки, но не регуляторные Т-лимфоциты).

B1-клетки продуцируют антитела в основном классов IgM или IgA. V-домены этих антител кодируются зародышевыми последовательностями генов. Эти антитела обладают низким сродством к антигену, для них характерна полиспецифичность. Обычно они взаимодействуют с аутоантигенами (ДНК, компоненты цитоскелета, фосфатидилхолин и т.д.) или распространенными антигенами микроорганизмов (например, полисахаридами клеточной оболочки бактерий). Последнее обстоятельство, а также спонтанный (независимый от поступления антигена) синтез иммуноглобулинов делают эти клетки важным компонентом врожденного иммунитета. Эта их функция реализуется следующим образом. В организме присутствуют пресинтезированные малоспецифичные (полиспецифичные) низкоаффинные антитела (нормальные иммуноглобулины). При проникновении патогена во внутреннюю среду организма эти антитела реагируют с антигенами его поверхности. Сами по себе такие антитела не могут повредить микроорганизм. Они также не способны привлекать через Fc-рецепторы макрофаги и другие эффектор-ные клетки, поскольку рецепторов для Fc-части IgM не существует. Однако иммунные комплексы, образуемые этими антителами, связывают комплемент и обуславливают опсонизацию патогена фрагментами C3b и C3d, что облегчает его фагоцитоз. Несмотря на слабую аффинность антител, продуцируемых B1-клетками (и, следовательно, неустойчивость их связывания с патогенами), их защитная роль достаточно велика, поскольку она реализуется в самый ранний срок после инфицирования, когда более совершенные опсонизирующие средства отсутствуют (пентраксины, выполняющие аналогичную роль, обладают еще меньшей специфичностью и сродством к патогенам).

#### **3.6.4.2. Тимуснезависимый иммунный ответ и антигеннезависимая дифференцировка антителообразующих клеток**

Гуморальный ответ на ТН-антигены существенно отличается от классического тимусзависимого ответа. При этом сильно различается ответ на ТН-1- и ТН-2-антигены (о тимуснезависимых антигенах см. раздел 3.2.1.2).

Как известно, ТН2-антигены — полимеры (обычно полисахаридные) с повторяющимися идентичными эпитопами (например, конъюгаты динитрофенола с декстраном или фиколлом). Это позволяет одной молекуле антигена связываться с многими BCR и вызвать их кластеризацию, что служит достаточным стимулом для активации В-клеток без дополнительных сигналов, поставляемых Т-клетками через костимулирующие молекулы CD40. С другой стороны, полисахаридные антигены не презентуются Т-лимфоцитам, что исключает возможность запуска ими Т-зависимого иммунного ответа. В то же время показано, что В-клетки при ответе на ТН-2-антигены получают сигнал через CD40. Однако в этом участвует не CD154 (CD40L), а какая-то другая молекула, вероятно, экспрессируемая не Т-клеткой. На такое воздействие способны реагировать только зрелые В-клетки. Источниками цитокиновых сигналов, поддерживающих пролиферацию этих клеток, служат NK-клетки, макрофаги или Т-лимфоциты (при классическом ответе, опосредованном В2-клетками, источником таких сигналов служат преимущественно Th2-лимфоциты).

Ответ на ТН-2-антигены проходит вне зародышевых центров, что определяет его недостатки: слабовыраженное переключение изотипов, прак-

тически полное отсутствие гипермутагенеза и повышения аффинности, слабое развитие памяти (клетки памяти практически не образуются). Тем не менее при ответе на ТН-2-антигены образуются антитела не только IgM-, но и IgG3- и IgA-классов. В результате ответ на ТН-2-антигены существенно уступает в «качестве» тимусзависимому. В то же время в процессе дифференцировки В-лимфоцитов в плазматические клетки при ответе на ТН-2-антигены, как и при ответе на тимусзависимые антигены, экспрессируются транскрипционный фактор Blimp-1, маркирующий этот этап дифференцировки. Поскольку распространенные компоненты многих патогенов, в особенности капсулярные антигены бактерий, обладают свойствами ТН-2-антигенов, для гуморального иммунного ответа на них характерна определенная степень дефектности, а развитие Т-клеточного иммунного ответа невозможно. Таким образом, особенности гуморального иммунного ответа на ТН-2-антигены определяются их свойствами — неспособностью стимулировать Т-клетки, частично компенсируемой способностью автономно активировать В-лимфоциты при минимальном участии вспомогательных клеток.

К перечисленным недостаткам гуморального иммунного ответа на ТН-2-антигены следует отнести также его позднее становление в онтогенезе. Это связано с упоминавшимся ранее фактом (см. раздел 3.2.1.2) — ответ на ТН-2-антигены могут осуществлять только наиболее зрелые (у мышей — Lyb5<sup>+</sup>) В-клетки, популяция которых формируется в онтогенезе только к 2–3 годам. Это обстоятельство имеет важное практическое значение, поскольку иммунизация бактериальными полисахаридами малоэффективна до указанного возраста. Эту проблему можно решить, используя полисахариды, конъюгированные с белками, что придает им свойства тимусзависимых антигенов.

Механизмы гуморального иммунного ответа на ТН-1-антигены изучены еще слабее. Способность ТН-1-антигенов активировать В-лимфоциты была рассмотрена в разделе 3.6.4.1. Напомним, что в малых концентрациях ТН-1-антигены активируют только клетки специфических клонов. Однако при большой концентрации эти антигены приобретают митогенные свойства и становятся способны активировать все В-клетки, независимо от специфичности их BCR. Активированная В1-клетка не мигрирует в зародышевый центр и не проходит этапов «усовершенствования» (переключения изотипов, созревание аффинитета и т.д.). В этой ситуации практически отсутствует формирование клеток памяти.

В настоящее время открывают все новые факты, расширяющие наше понимание процессов, задействованных в ТН-ответе и не вполне укладывающиеся в рамки существующих гипотез. Таким образом, нельзя исключить, что многие представления о ТН-ответе претерпят значительные изменения в ближайшее десятилетие.

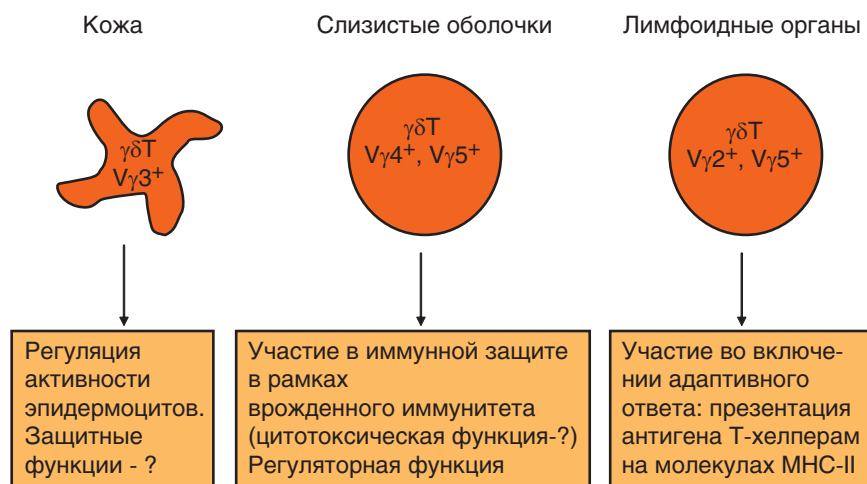
Давно отмечено, что В-лимфоциты, являясь типичными лимфоидными клетками и участвуя в процессах, обеспечивающих адаптивную иммунную защиту, обладают свойствами, характерными в большей степени для миелоидных клеток. Наиболее известный пример — принадлежность В-лимфоцитов к АПК. В-лимфоциты (как и другие лимфоидные клетки) экспрессируют TLR (у человека — TLR-7, TLR-9, TLR-10; у мышей также TLR-4).

Это обуславливает способность В-клеток не только пролиферировать, но и дифференцироваться (поликлонально) в ответ на действие CpG-содержащей ДНК, а В-клеток мышей — также в ответ на ЛПС. Антигеннезависимую дифференцировку В-клеток вызывает действие ряда цитокинов — IL-10, IL-21 при обязательном сочетании с передачей через молекулу CD40 сигналов от Т-лимфоцитов. Вероятно, антигеннезависимая стимуляция В-клеток вносит вклад, возможно решающий, в индукцию образования при иммунном ответе антигеннеспецифических антител, доля которых может превышать долю специфических антител.

#### 3.6.4.3. Проявления активности $\gamma\delta$ T- и CD8 $\alpha\alpha^+$ Т-клеток

Рассматривая структуру популяции периферических Т-лимфоцитов, уже отмечалось, что при низком содержании  $\gamma\delta$ T-клеток в крови и вторичных лимфоидных органах, в барьерных тканях (особенно в слизистых оболочках) они присутствуют в достаточно большом количестве, составляя у человека 20–30%, а у мышей — до 60–70% от числа внутриэпителиальных лимфоцитов. В настоящее время существует очень мало данных об участии этих клеток в иммунной защите (рис. 3.128).

Существует мало сведений об особенностях антигенраспознающей способности  $\gamma\delta$ T-клеток. С точностью установлена единственная группа лигандов  $\gamma\delta$ TCR — молекулы T10 и T22 — продукты неклассических генов МНС. Эти молекулы, независимо от содержащегося в их составе антигенного пептида, распознает 0,2–2%  $\gamma\delta$ T-клеток. Пока трудно представить, при каких обстоятельствах происходит это распознавание и какую роль оно играет в иммунных процессах. Полагают, что *in vivo*  $\gamma\delta$ T-клетки распознают фосфопротеины микроорганизмов, содержащие пирофосфаты; *in vitro* установлено, что к наиболее сильным лигандам  $\gamma\delta$ TCR относится пирофосфат HMB-PP.



**Рис. 3.128.** Субпопуляции  $\gamma\delta$ T-клеток, их локализация и функциональная активность. В изображениях  $\gamma\delta$ T-клеток отмечены преобладающие семейства  $V\gamma$ -сегментов, используемых при построении зрелых  $V\gamma$ -генов. Полиморфность  $\gamma\delta$ T-клетки слева соответствует дендритным  $\gamma\delta$ T-клеткам, присутствующим в эпидермисе мышей

Поскольку  $\gamma\delta$ T-клетки лишены корецепторов CD4 и CD8, они распознают антигены, не связанные с МНС, и в активации этих клеток не участвуют костимулирующие молекулы. В то же время сами  $\gamma\delta$ T-клетки способны встраивать антигенные пептиды в собственные молекулы МНС и выступать в качестве АПК, сравнимых по эффективности с дендритными клетками. Считают, что для выполнения этой функции они могут мигрировать из слизистых оболочек в лимфатические узлы. Точные данные о реальной значимости этой функции  $\gamma\delta$ T-клеток неизвестны. Поскольку на поверхности  $\gamma\delta$ T-клеток присутствуют TLR, постулируется способность этих клеток распознавать PAMP.

Об участии  $\gamma\delta$ T-клеток в реакциях протективного иммунитета известно чрезвычайно мало. Есть сведения об их способности оказывать прямое цитотоксическое действие на патогены без предварительной сенсibilизации. Такой эффект выявлен в отношении микобактерий и токсоплазм. В связи с этим  $\gamma\delta$ T-клеткам отводят роль не столько в адаптивном иммунном ответе, сколько в первой линии защиты от патогенов. В то же время  $\gamma\delta$ T-клетки, мигрирующие в лимфатические узлы в качестве АПК, способны проникать в зародышевые центры и выступать в качестве хелперных Т-клеток, поддерживающих развитие антителопродуцентов. Таким образом, нельзя отрицать их вклада в развитие антигенспецифического иммунного ответа. Показана способность  $\gamma\delta$ T-клеток убивать опухолевые клетки, что свидетельствует об их возможной причастности к противоопухолевой защите.

Существуют данные о выполнении  $\gamma\delta$ T-клетками функции естественных регуляторных Т-клеток, предотвращающих чрезмерные проявления пролиферации и секреторной активности лимфоцитов в барьерных тканях. Они подавляют секрецию  $IFN\gamma$  активированными Т-лимфоцитами, ослабляют пролиферацию и миграцию преимущественно  $CD8^+$  Т-клеток (преобладающий класс эффекторных Т-клеток в слизистых оболочках). Эти свойства они проявляют как на месте (в барьерных тканях), так и в лимфатических узлах.

Еще одна важная функция  $\gamma\delta$ T-клеток, которая четко установлена — поддержание жизнеспособности и функциональной активности эпителиальных клеток слизистых оболочек и участие в репарации эпителия за счет секреции ростовых факторов KGF-1, KGF-2 (*Keratinocyte growth factors*) и IRF-1 (*Insulin-related factor 1*).

В слизистых оболочках в значительном количестве присутствуют Т-клетки, экспрессирующие гомодимерную форму молекулы  $CD8\alpha\alpha$ . У мышей эти клетки могут иметь TCR состава как  $\alpha\beta$ , так и  $\gamma\delta$  (в соотношении 1:2). У человека все  $CD8\alpha\alpha^+$  Т-клетки относятся к  $\gamma\delta$ T-клеткам. Очевидно, что им принадлежит важная защитная функция в этом важнейшем отделе барьерных тканей. Они содержат в своей цитоплазме цитолитические гранулы и экспрессируют гены перфорина и гранзима В. Все это свидетельствует об их способности осуществлять цитотоксическую функцию в отношении инфицированных клеток, а возможно, и патогенов. Кроме того, эти клетки вносят вклад в развитие воспалительной реакции, секретируя провоспалительные цитокины. Как и  $\gamma\delta$ T-клетки,  $CD8\alpha\alpha^+$  Т-клетки совмещают эффекторную функцию с регуляторной, реализуемой преимущественно путем секреции супрессорных цитокинов, особенно трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF $\beta$ ).

#### 3.6.4.4. Иммунологические функции NKT-клеток

Еще одна «неклассическая» разновидность Т-лимфоцитов, которые реализуют свою иммунологическую активность преимущественно вне рамок канонического иммунного ответа, — NKT-клетки.

Условие активации NKT-клетки — распознавание лиганда через TCR. В качестве модельного лиганда *in vitro* обычно используют  $\alpha$ GalCer. Инвариантные NKT-клетки человека и мышей могут быть активированы также лизосомальным гликосфинголипидом — изоглоботригексозилцерамидом (iGb3), который считают физиологическим эндогенным активатором NKT-клеток. Экзогенным активатором NKT-клеток может служить  $\alpha$ -глюкуронилцерамид клеточной стенки грамотрицательной бактерии, а также  $\alpha$ -галактозилцерамид спирохеты *Borrelia burgdorferi* (возбудителя болезни Лайма) и ряд других гликолипидов. К активаторам NKT-клеток относят сульфатиды — галактолипиды миелиновой оболочки аксонов центральной нервной системы. NKT-клетки человека реагируют с синтетическим нелипидным веществом — фенилпентаметилдигидробензофурансульфонатом. NK-рецептор NKT-клеток (у человека — NKR-P1 — CD161, а также активирующий рецептор NKG2D) не имеет ингибиторного домена; он ассоциирован со стимулирующим адаптором Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ .

Лиганд презентуется NKT-лимфоцитам дендритными клетками. Установлено 2 механизма активации NKT-клеток. Первый состоит в презентации дендритной клеткой экзогенного (микробного) антигена без дополнительного действия цитокинов. При реализации второго механизма презентация эндогенного лизосомального гликосфинголипида сочетается с действием IL-12, секретируемого дендритными клетками. Следствием активации в первом случае является синтез NKT-клетками (в основном CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) Th1- (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) и Th2- (IL-4, IL-13) цитокинов, во втором случае — активация цитотоксической активности и секреция только IFN $\gamma$  (в этой форме ответа в большей степени участвуют CD4<sup>+</sup> NKT-клетки). В обоих случаях на NKT-клетках экспрессируется костимулирующая молекула CD40, через которую они активируют дендритные клетки к синтезу IL-12. Цитотоксичность NKT-клеток реализуется через перфорин/гранзимовый или FasL-опосредованный механизмы и распространяется на клетки-мишени, несущие антиген, распознаваемый TCR (т.е. в этом отношении NKT-клетки ближе к Т-лимфоцитам чем к NK-клеткам). Продуцировать цитокины, в частности IFN $\gamma$ , NKT-клетки начинают значительно раньше других Т-лимфоцитов. Мишени этих цитокинов — NK-клетки и Т-лимфоциты (как хелперные, так и цитотоксические). NKT-клетки служат важнейшим источником цитокинов, определяющих направление дифференцировки Т-хелперов.

Реакция NKT-клеток — важная составная часть ранней фазы врожденного иммунного ответа. Установлена их роль в развитии защитных иммунных реакций против ряда патогенов. Показано участие NKT-клеток в развитии реакции на грамотрицательные бактерии вплоть до патогенетической роли в развитии септического шока. При формировании гранулемы NKT-клетки раньше других клеток включаются в построение защитного вала. Предполагают участие NKT-клеток в противовирусной и противоопухолевой защите. Полагают, что NKT-клетки участвуют в развитии

аутоиммунных и хронических воспалительных процессов, при которых происходит их активация продуктами нарушенного липидного метаболизма. Во всех этих случаях вклад NKT-клеток в иммунные процессы связан с ранней выработкой ими  $\text{IFN}\gamma$  и других цитокинов, а также с проявлением цитотоксичности.

Как и в случае  $\gamma\delta$ T-клеток, хорошо обоснована регуляторная функция NKT-клеток. Они участвуют в формировании пероральной толерантности. В физиологических условиях эти клетки участвуют в ограничении иммунного ответа на антигены полезных микроорганизмов и пищи. Сдерживающее и толерогенное действие NKT-клеток реализуется через образование супрессорных цитокинов IL-10 и  $\text{TGF}\beta$  под влиянием незрелых дендритных клеток. Кроме того, активированные NKT-клетки синтезируют много IL-2, стимулирующего пролиферацию естественных регуляторных T-клеток. Эти клетки, в свою очередь, регулируют активность NKT-лимфоцитов, ослабляя чрезмерную выработку ими  $\text{IFN}\gamma$ .

### **3.6.5. Иммунные процессы в слизистых оболочках (мукозальный иммунный ответ)**

Слизистые оболочки — основная зона контакта организма с экзогенными антигенами. Структура лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками, рассмотрена выше (см раздел 3.4.2.3). Основными путями поступления чужеродного материала во внутреннюю среду организма через слизистые оболочки являются: активный транспорт через M-клетки, захват молекул отростками дендритных клеток, проникающими в просвет органа, попадание микроорганизмов через поврежденные участки слизистой оболочки и активное проникновение с участием факторов инвазивности (в случае патогенов). При любом пути поступления антигенного материала через слизистую оболочку он захватывается АПК, прежде всего дендритными. Эти клетки преимущественно и определяют характер реакции иммунной системы на макромолекулы, поступающие в организм через тканевые барьеры.

#### **3.6.5.1. Локальные процессы в слизистых оболочках при внедрении патогенов**

Решающим в судьбе чужеродных веществ, попавших в организм, является наличие или отсутствие в их составе РАР. Если в проникающих через слизистый барьер молекулах РАР отсутствуют, то сигнал о проникновении патогена не индуцируется. Дендритные клетки захватывают такой материал, но при этом не активируются. Они приобретают толерогенный фенотип и способствуют формированию неответственности на эти молекулы (подробнее об этом см. раздел 4.3.2.2). Когда через слизистые оболочки поступают патогены или свободные РАР-содержащие молекулы, они распознаются клетками врожденного иммунитета, прежде всего макрофагами, что служит сигналом для развития воспаления. На этом фоне происходит активация дендритных клеток, а затем их миграция из барьерных тканей в региональные лимфатические узлы. Этот процесс был рассмотрен в контексте запуска иммунного ответа (см. раздел 3.5.1.1).

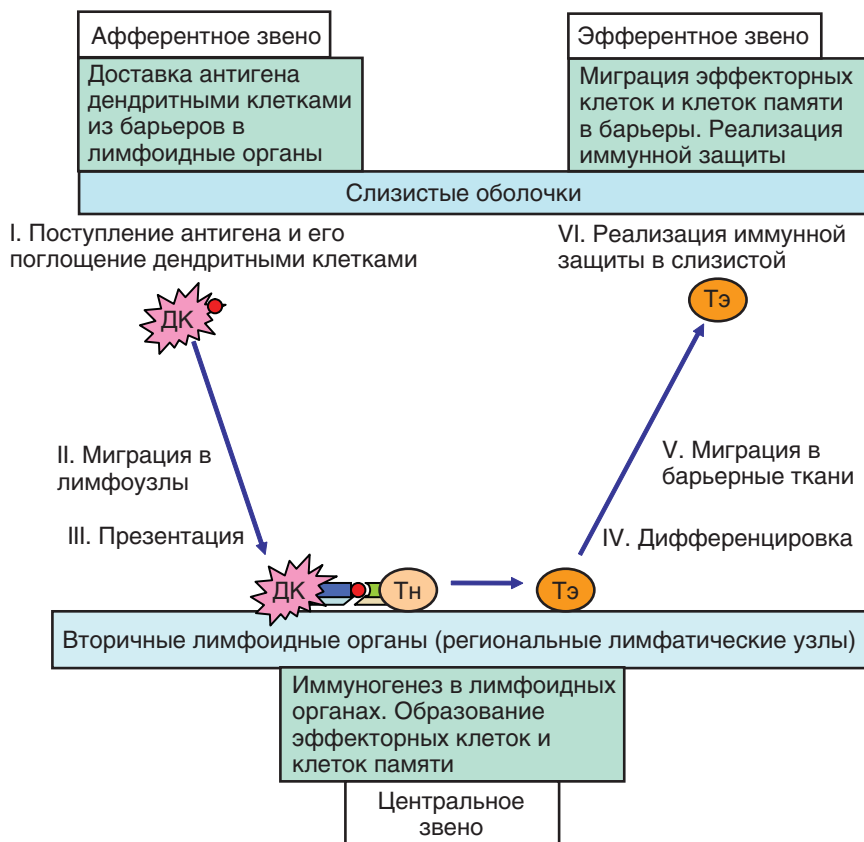
В реализации первой линии защиты в слизистых оболочках решающая роль принадлежит клеткам врожденного иммунитета, прежде всего

воспалительным макрофагам. В то же время определенный, возможно существенный, вклад в нее вносят «неклассические» лимфоидные клетки. В1-лимфоциты могут секретировать естественные антитела независимо от поступления патогенов. Значительная часть этих антител направлена против распространенных эпитопов патогенных микроорганизмов. Антитела, взаимодействуя с клетками бактерий, связывают комплемент, что облегчает фагоцитоз патогенов и может вызвать комплементзависимый лизис. Свою защитную функцию проявляют также субпопуляции Т-лимфоцитов, характерные для слизистых оболочек —  $\gamma\delta$ Т-клетки и  $CD8\alpha\alpha^+$  Т-клетки, однако их роль изучена недостаточно (см. раздел 3.6.4.3). Оба типа этих клеток, а также естественные регуляторные Т-клетки и НКТ-лимфоциты, наряду с резидентными макрофагами, обладают регуляторной активностью, направленной на сдерживание слишком интенсивного воспаления, которое могло бы привести к деструкции тканей и разрушению барьеров. Когда факторам первой линии защиты не удастся локализовать и устранить агрессию, включаются механизмы адаптивного иммунитета (иммунного ответа).

#### 3.6.5.2. Афферентное и центральное звенья мукозального иммунного ответа

В лимфоидной ткани, связанной со слизистыми оболочками, выделяют структуры и клетки, обеспечивающие афферентное (индуктивное), центральное и эфферентное (эффекторное) звенья иммунного ответа (рис. 3.129). Афферентное звено включает клетки и структуры, ответственные за распознавание антигена и восприятие сигнала чужеродности. В условиях первичного иммунного ответа это исключительно дендритные клетки, поглощающие антиген и доставляющие его в региональные лимфатические узлы. При вторичном иммунном ответе эту роль выполняют любые АПК. Центральное звено представлено фолликулсодержащими структурами слизистой оболочки, в которых происходит предварительная обработка антигенного сигнала, и региональными лимфатическими узлами, в которых эта обработка осуществляется в полном объеме и где образуются эфферентные клетки и клетки памяти. Эфферентное (эффекторное) звено мукозального иммунного ответа представлено диффузно распределенными лимфоидными клетками, включающими все исполнительные субпопуляции клеток — цитотоксические и хелперные Т-лимфоциты, антигенпродуцирующие клетки (плазмочиты), армированные макрофаги. Цитотоксические Т-лимфоциты локализуются в эпителиальном слое слизистой оболочки, а остальные эфферентные клетки — в *lamina propria*.

При поступлении антигена через М-клетки он оказывается в субэпителиальном кармане, под которым локализуются дендритные клетки (см. рис. 3.72). Они захватывают антиген и получают активационный сигнал от патогена (через TLR) и цитокинов, вырабатываемых макрофагами. В результате дендритные клетки поступают в эфферентную лимфу слизистых оболочек и доставляются в лимфатические узлы (см. раздел 3.5.1.1). При первичном иммунном ответе на антигены, поступившие из лимфоидных тканей, ассоциированных со слизистыми оболочками, в лимфатических узлах реализуются те же события, что и при ответе на антигены, поступившие из других отделов организма. В Т-зонах лимфатических узлов дендритные клетки презентуют Т-лимфоцитам антигенный пептид в



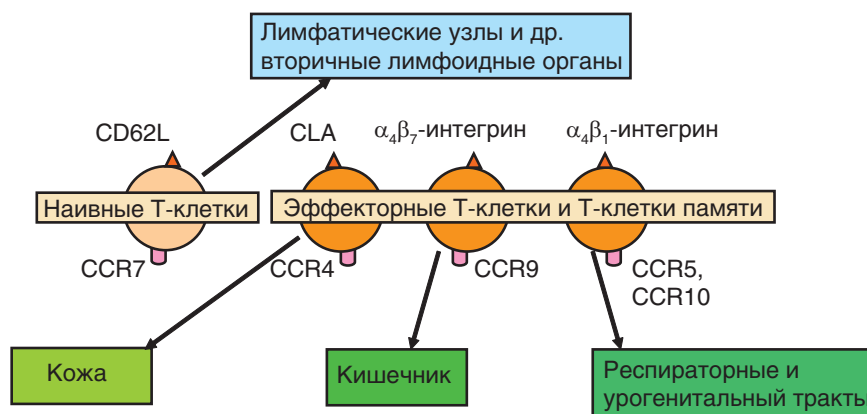
**Рис. 3.129.** Этапы развития первичного мукозального иммунного ответа. Роль миграции клеток

составе молекул МНС-II. В результате запускается пролиферация и дифференцировка Т-клеток. В конечном счете в лимфатических узлах  $CD4^+$  Т-клетки дифференцируются в хелперы типов Th1- и Th2-, а  $CD8^+$  Т-клетки — в цитотоксические Т-лимфоциты. Аналогично происходит дифференцировка В-лимфоцитов в плазматические клетки — продуценты антител.

До сих пор не выяснен вопрос о взаимосвязи центральных событий мукозального иммуногенеза, осуществляемых в лимфатических узлах и местных лимфоидных структурах (в частности, в пейеровых бляшках), служащих более или менее полными аналогами лимфатических узлов. Очевидно, что часть событий по обработке антигенного сигнала происходит в локальных лимфоидных образованиях. Однако для формирования полноценного иммунного ответа требуется участие региональных лимфатических узлов.

### 3.6.5.3. Роль миграции клеток в мукозальном иммунитете

Роль направленной миграции лимфоцитов в функционировании мукозального иммунитета особенно велика. Все разновидности эффекторных Т-клеток, сформировавшихся в региональном лимфатическом узле, покидают



**Рис. 3.130.** Зависимость путей миграции наивных и эффекторных Т-клеток от экспрессии молекул адгезии и хемокиновых рецепторов. Символы над рядом клеток — молекулы адгезии; под ним — хемокиновые рецепторы

его с эфферентной лимфой и в составе лимфы грудного протока поступают в общий кровоток. Дальнейшее распределение эффекторных Т-клеток определяется экспрессией ими молекул адгезии и хемокиновых рецепторов (рис. 3.130). Эти клетки способны мигрировать предпочтительно в лимфоидные ткани, ассоциированные со слизистыми оболочками, преимущественно в отделы, из которых происходят индуцировавшие их дендритные клетки.

Активированные Т-клетки попадают в эпителиальный пласт и *lamina propria* через плоский эпителий сосудов. Функцию «проводников» этих клеток через сосудистую стенку в эпителиальный слой слизистых оболочек выполняют интегрины  $\beta_1$  (VLA-4 —  $\alpha_4\beta_1$ ) и  $\beta_7$  ( $\alpha_E\beta_7$  и  $\alpha_4\beta_7$ ) (табл. 3.31). При этом интегрины  $\alpha_4\beta_4$  и  $\alpha_E\beta_7$  обеспечивают поступление лимфоцитов в любые слизистые оболочки, тогда как интегрин  $\alpha_4\beta_7$  в определенной степени специфичен для Т-клеток, мигрирующих в тонкий кишечник. Такая избирательная миграция связана с распределением рецепторов упомянутых интегринов. Если рецепторы для интегринов  $\alpha_1\beta_4$  (молекула VCAM-1) и  $\alpha_E\beta_4$  (Е-селектин) содержатся на эндотелиальных клетках сосудов всех типов слизистых оболочек, то рецептор для интегрин  $\alpha_4\beta_7$  (MadCAM) присутствует преимущественно в сосудах кишечника (на клетках как высокого, так и плоского эндотелия). Интегрин  $\alpha_E\beta_7$  взаимодействует также с Е-кадхерином эпителиальных клеток кишечника, что способствует удержанию мигрировавших Т-клеток в эпителии.

**Таблица 3.31.** Молекулы адгезии и хемокины, ответственные за миграцию лимфоцитов в лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками

Клетки	Молекулы адгезии*	Хемокины**
Наивные Т-клетки	CD62L — PNA <sub>d</sub> , GlyCAM; LFA-1 — ICAM-1	CCR7 — CCL19, CCL21
Наивные В-клетки	CD62L — PNA <sub>d</sub> , GlyCAM; LFA-1 — ICAM-1	CXCR5 — CXCL13

Окончание табл. 3.31

Клетки	Молекулы адгезии*	Хемокины**
Эффекторные Т-клетки и эффекторные Т-клетки памяти	LFA-1 — ICAM-1; VLA-4 — VCAM-1; $\alpha_E\beta_7$ -интегрин — Е-кадгерин, $\alpha 4\beta 7$ -интегрины — MadCAM1	CCR5 — CCL5; CCR10 — CCL28. При воспалении: CCR2 — CCL2 CCR3 — CCL9, CCL10, CCL11
IgA <sup>+</sup> В-клетки памяти	LFA-1 — ICAM-1; VLA-4 — VCAM-1	CCR10 — CCL28

\* В каждой паре слева — молекулы поверхности лимфоцитов, справа — молекулы поверхности эндотелиальных/эпителиальных клеток.

\*\* В каждой паре слева — рецептор, экспрессируемый лимфоцитами, справа — хемокин, секретируемый стромальными клетками

Набор хемокинов, определяющий направление миграции эффекторных лимфоцитов, отличается от такового для наивных клеток. Для миграции лимфоцитов в слизистую оболочку тонкого кишечника необходима экспрессия на них рецептора CCR9, распознающего хемокин CCL25 (TECK). Для миграции в слизистые оболочки респираторного и урогенитального трактов такого однозначного «проводника» не выявлено, но установлена значимость нескольких хемокинов и их рецепторов. Важную роль в привлечении Т-клеток в эпителий слизистых оболочек, включая слизистые дыхательных путей, играет хемокин CCL5 (RANTES), спонтанно вырабатываемый стромальными клетками легких и распознаваемый рецептором CCR5 поверхности эффекторных лимфоцитов и Т-клеток. Другая пара молекул (хемокин и его рецептор), которая участвует в привлечении эффекторных лимфоцитов и клеток памяти в слизистые оболочки — CCL28 (MEC) и CCR10. Есть также данные о роли хемокинов CCL11 (эотаксина), CCL17 (TARC), CCL1 (I-309) и распознающих их рецепторов CCR3, CCR4 и CCR8 в привлечении эффекторных CD4<sup>+</sup>Т-клеток в слизистые оболочки. Миграция лимфоцитов в слизистые оболочки усиливается при воспалительной реакции, когда происходит активация эндотелия сосудов мукозальной лимфоидной ткани. При этом усиливается экспрессия на клетках эндотелия молекул адгезии ICAM-1, VCAM-1 (рецепторы интегринов), MadCAM и Р-селектина. Одновременно происходит усиление выработки хемокинов, в частности CCL5 (RANTES) и CCL2 (MCP-1). Эти молекулы привлекают лимфоциты, несущие рецепторы CCR5 и CCR2. Два типа хоминга лимфоцитов обуславливают существование двух автономных кругов рециркуляции, пересекающихся в брыжеечных лимфатических узлах.

Внутриэпителиальные лимфоциты не способны возвращаться в рециркуляцию. Они заканчивают свой жизненный цикл в результате апоптоза внутри слизистой или в просвете органа, куда они способны мигрировать. Для слизистой оболочки бронхов показано, что базеоапикальная миграция Т-клеток обусловлена взаимодействием молекулы LFA-1 поверхности лимфоцита с молекулой ICAM-1 окружающих клеток. Важную роль в миграции

играют также  $\beta_1$ -интегрин VLA-4 и компоненты межклеточного матрикса, служащие его рецепторами. Направление движения определяется градиентом хемокина CCL5 (RANTES).

Именно рециркуляция лимфоцитов с характерными для них механизмами хоминга и хемотаксиса обеспечивает целостность единой системы мукозального иммунитета и эффективность ее работы при иммунном ответе. В основе способности эффекторных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти «находить» отдел слизистых оболочек, в котором произошел захват антигена дендритными клетками, лежит механизм импринтинга. Этот процесс обусловлен особенностями дендритных клеток, «запечатленными» при захвате антигена в разных участках лимфоидных тканей слизистых оболочек. Определяющая роль в формировании импринтинга четко показана для дендритных клеток пейеровых бляшек. При презентации антигена Т-клеткам они индуцируют экспрессию на формирующихся затем эффекторных Т-лимфоцитах и Т-клетках памяти молекул адгезии и хемокиновых рецепторов, обеспечивающих их миграцию в соответствующие участки барьерных тканей. Достаточно четко (хотя и не абсолютно) детерминирована миграция клеток в кишечный отдел мукозальной лимфоидной ткани. В то же время механизм импринтинга не дифференцирует респираторный и урогенитальный тракты. Так, поступление антигена через слизистые оболочки бронхов инициирует образование эффекторных лимфоцитов и клеток памяти, мигрирующих в равной степени в респираторный и урогенитальный тракты и существенно слабее — в кишечник и кожу. Лимфоциты, активированные дендритными клетками кишечника, интенсивно мигрируют в кишечник, несколько слабее — в другие отделы лимфоидных тканей слизистых оболочек и практически не мигрируют в кожу. Показано, что при захвате антигена в дендритных клетках образуется ретиноевая кислота. Она определяет экспрессию на Т-лимфоцитах, активированных этими дендритными клетками,  $\alpha_4\beta_7$ -интегрина и хемокинового рецептора CCR9, направляющих их миграцию в кишечник.

В принципе аналогичным способом обеспечивается «прицельность» миграции в слизистые оболочки эффекторных В-клеток — предшественников антителопродукторов и В-клеток памяти. Уже упоминалось о высоком проценте  $\text{IgA}^+$  В-клеток памяти в мукозальной лимфоидной ткани. Тропность  $\text{IgA}^+$  В-клеток к слизистым оболочкам обусловлена присутствием на них рецепторов CCR10 и CCR9, распознающих хемокины CCL28 и CCL25 соответственно. Эти хемокины вырабатываются стромальными клетками лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками. Выработка CCL28 неодинакова в различных отделах мукозальных лимфоидных тканей и коррелирует со степенью бактериальной контаминации. Она высока в кишечном и носоглоточном отделах и существенно ниже в лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой бронхов, что определяет различное содержание в них  $\text{IgA}^+$  В-клеток. Среди молекул адгезии основную роль в миграции  $\text{IgA}^+$  В-клеток играют интегрин  $\alpha_4\beta_1$  и его рецептор VCAM-1. Однако преобладание  $\text{IgA}^+$  В-клеток среди антителопродукторов обеспечивается также локальной дифференцировкой В-клеток в  $\text{IgA}$ -продукторы в лимфоидных тканях слизистых оболочек.

Таким образом, благодаря тонко скоординированному процессу избирательной миграции эффекторных лимфоцитов и клеток памяти достигается адекватность доставки эффекторных клеток в места проникновения патогена, индуцировавшего иммунный процесс. Не всегда эффекторные клетки мигрируют в места запуска иммунного процесса. Они могут попадать в другие участки лимфоидных тканей, ассоциированных со слизистыми оболочками, особенно воспаленные. Благодаря этим «преднамеренным ошибкам» достигается морфофункциональное единство мукозальной лимфоидной ткани.

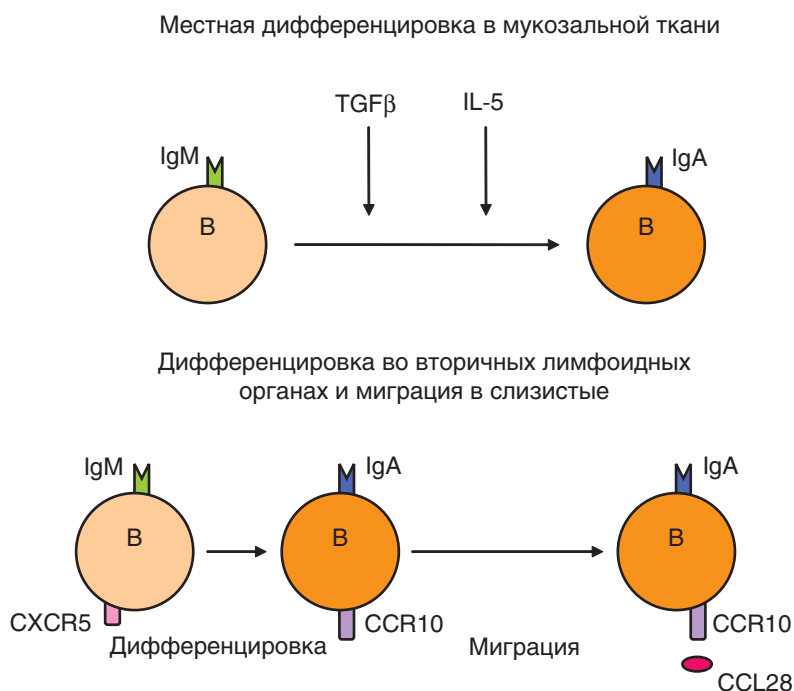
#### 3.6.5.4. Эффекторные механизмы мукозального иммунитета

Поступившие из кровотока  $CD4^+$  Т-клетки задерживаются в подслизистом слое и мигрируют из него в *lamina propria* и (в небольшом количестве) в эпителиальный слой.  $CD8^+$  Т-клетки, напротив, мигрируют преимущественно в эпителиальный слой слизистых оболочек и пополняют пул внутриэпителиальных лимфоцитов.

Свойства клеток, мигрирующих в лимфоидные ткани, ассоциированные со слизистыми оболочками, могут изменяться под влиянием микроокружения последних. Это происходит уже в процессе трансмиграции через эндотелий сосудов. Дополнительный эффект оказывает взаимодействие с местными АПК. Наконец, на мигрирующие клетки сильно влияют гуморальные факторы микроокружения, прежде всего цитокины. Так, при миграции в слизистые оболочки (особенно в респираторном тракте) Т-хелперы предпочтительно дифференцируются в хелперы Th2-типа. Даже уже сформировавшиеся Th1-хелперы могут перестраивать свою дифференцировочную программу и превращаться в Th2-клетки. Этому способствует прежде всего наличие в микроокружении IL-4 — основного фактора, определяющего дифференцировку Th2-клеток, секретируемого тучными клетками *laminae propriae*. Имеет значение также высокая экспрессия на АПК слизистых оболочек дыхательных путей костимулирующей молекулы ICOS, запускающей в Т-клетках сигнальный путь, который поддерживает дифференцировку в Th2-лимфоциты.

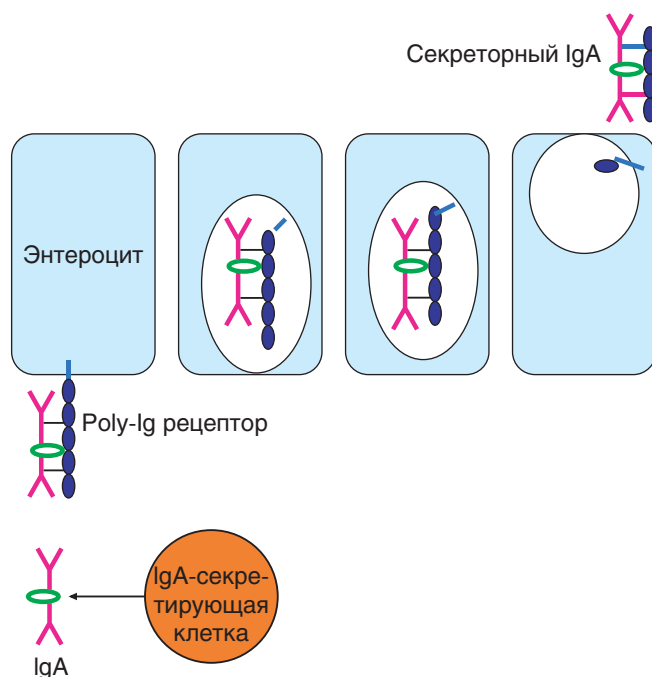
Главный продукт гуморального иммунного ответа на начальных этапах его развития (4–7-е сутки) — IgM-антитела, поступающие в системный кровоток и не играющие основной роли в защите слизистых оболочек. Однако уже в ходе первичного иммунного ответа происходит переключение изотипов иммуноглобулинов. В микроокружении слизистых оболочек мигрирующие сюда и образовавшиеся местно плазматические клетки переключают изотип секретируемых антител на IgA. Пик IgA-ответа в слизистых оболочках дыхательных путей приходится на 7–10-е сутки иммунного ответа. Среди секретируемых IgA-антител преобладают молекулы изотипа IgA1 (рис. 3.131). Избирательное переключение изотипа антител на IgA характерно для участков слизистых оболочек, заселенных микроорганизмами (так, в миндалинах и в кишечнике человека на долю IgA-образующих клеток приходится до 90% антителопродуцентов). В свободных от микрофлоры слизистых оболочках (например, нижних дыхательных путей) преобладают IgG-продуценты.

Важнейший эффекторный фактор мукозальных лимфоидных тканей — секреторные IgA, формируемые из обычных димерных молекул IgA при



**Рис. 3.131.** Продуценты IgA-антител в слизистых оболочках. IgA образуется в мукозальном отделе иммунной системы как местно (под влиянием локальных факторов), так и во вторичных лимфоидных органах, откуда они мигрируют в слизистые оболочки

транспорте через эпителиальный слой слизистых оболочек (рис. 3.132). На базальной поверхности эпителиальных клеток слизистых оболочек присутствуют так называемые полимерные иммуноглобулиновые рецепторы (pIgR), способные взаимодействовать с димерными молекулами IgA и в меньшей степени — с пентамерами IgM. После связывания образовавшийся комплекс интернализуется эпителиальной клеткой и транспортируется в составе везикулы от базального к апикальному концу клетки. В процессе транспортировки происходит отщепление большей части рецептора, которая в виде секреторного компонента (SC, молекулярная масса 60 кДа) становится составной частью молекулы секреторного IgA (sIgA). При достижении апикальной поверхности клетки содержимое везикулы, включая sIgA, выбрасывается в просвет органа. Присутствие SC-цепи в составе sIgA придает молекуле устойчивость к действию протеаз, присутствующих в среде (особенно в пищеварительном тракте). IgA не являются ни опсонизирующим фактором, ни активатором комплемента. Их защитная функция проявляется иначе: связываясь с микроорганизмами-мишенями, IgA-антитела ослабляет их подвижность, предотвращают адгезию на эпителиальных клетках и, как следствие, — проникновение в обход М-клеток. С другой стороны, образование комплекса sIgA с антигенами возбудителей облегчает поглощение последних М-клетками.



**Рис. 3.132.** Механизм формирования секреторного IgA. IgA, секретируемый мукозальными плазматическими клетками, взаимодействует с поли-Ig-рецептором; комплекс интернализуется и транспортируется в апикальную часть клетки. После протеолиза значительная часть поли-Ig-рецептора отделяется от мембраны и в форме секреторного компонента входит в состав секреторного IgA, который поступает в просвет кишечника (или других полых органов) по механизму экзоцитоза

Клеточные механизмы адаптивного иммунитета вносят в иммунную защиту слизистых оболочек существенный вклад. В первую очередь это относится к цитотоксическим Т-лимфоцитам, играющим основную роль в противовирусной защите слизистых оболочек, особенно в воздухоносных путях.  $CD8^+$  Т-клетки эпителия и собственной пластины убивают инфицированные вирусом клетки, обеспечивая тем самым защиту от вируса гриппа и других респираторных вирусов. Th1-клетки усиливают воспалительный ответ макрофагов: они стимулируют фагоцитарную и бактерицидную активность преимущественно через выработку  $IFN\gamma$ , что обеспечивает защиту от патогенов, локализующихся во внутриклеточных гранулах.

Как и при осуществлении защиты первой линии, при реализации иммунного ответа в слизистых оболочках большую роль играют регуляторные клетки, которые сдерживают иммунные процессы, предотвращая их деструктивные проявления и развитие аутоагрессии. Пул этих клеток пополняется индуцибельными (адаптивными) регуляторными Т-клетками, к которым относят регуляторные Т-клетки 1-го типа (Tr1), продуцирующие IL-10, и Th3, секретирующие TGF $\beta$ . Таким образом, в защите барьерных тканей от «иммунного повреждения» участвуют регуляторные механизмы как врожденного, так и адаптивного иммунитета.

### 3.6.5.5. Развитие мукозального иммунного ответа при повторном контакте с патогеном

При развитии мукозального иммунного ответа формируются клетки памяти, избирательно мигрирующие в барьерные ткани (особенно в те, в которых они образовались).  $CD8^+$  Т-клетки памяти локализуются в эпителиальном слое;  $CD4^+$  Т- и В-клетки памяти — преимущественно в подслизистом слое, а также в структурированных лимфоидных образованиях. В большинстве отделов лимфоидных тканей слизистых оболочек преобладают В-клетки памяти, экспрессирующие мембранный рецептор IgA-изотипа, но в бронхолегочном отделе — IgG-изотипа. При иммунном ответе Т-клетки памяти могут попадать в орган, например, при инфицировании респираторными вирусами.

При повторном поступлении в организм патогена через слизистые оболочки он взаимодействует с иммунной системой, обогащенной клетками памяти. Как известно, презентация антигена Т-клеткам памяти значительно облегчена и не требует вовлечения всех механизмов, необходимых для его презентации наивным Т-клеткам. Именно поэтому антиген Т-клеткам памяти могут презентировать не только дендритные клетки, но и макрофаги, В-лимфоциты и другие клетки, возможно, даже эпителиальные. Таким образом, региональный лимфатический узел — не единственное и даже не основное место, где может происходить запуск вторичного иммунного ответа. Особое значение при этом приобретают события, происходящие в «кармане» М-клеток, где соседствуют Т- и В-клетки памяти. В-лимфоциты памяти выступают в этой ситуации в качестве АПК. За этим следует активация Т-клеток памяти и их дифференцировка в эффекторные лимфоциты. При вторичном, как и при первичном иммунном ответе, дифференцировка  $CD4^+$  Т-клеток осуществляется главным образом в направлении Th2-лимфоцитов, что способствует преимущественному развитию гуморального иммунного ответа. Активированные *in situ* В-клетки памяти также могут получать помощь от Th2-клеток непосредственно в структурах мукозальных лимфоидных тканей с преобладающим образованием IgA-продуцентов. Таким образом, вторичный иммунный ответ в слизистых оболочках может реализоваться «местными» клетками без значительной их миграции извне и его интенсивность существенно выше, чем первичного.

### 3.6.6. Контроль и регуляция иммунного ответа

Защитная роль иммунного ответа не вызывает сомнений. Однако организм платит за это немалую цену, поскольку при иммунном ответе происходят значительные морфофункциональные перестройки, расходуются пластические и энергетические ресурсы. Для осуществления иммунного ответа требуется интенсивная пролиферация лимфоцитов, что сопряжено с риском развития лимфопролиферативных заболеваний. При особоинтенсивном иммунном ответе реализация эффекторных функций сопряжена с повреждением нормальных тканей, как это часто происходит при иммунном воспалении. Особые проблемы возникают с устранением морфологических изменений лимфоидных органов, вызываемых иммунным ответом. Таким образом, настолько важный для организма процесс, как иммунный ответ, требует надежного контроля и регуляции, которые с одной стороны,

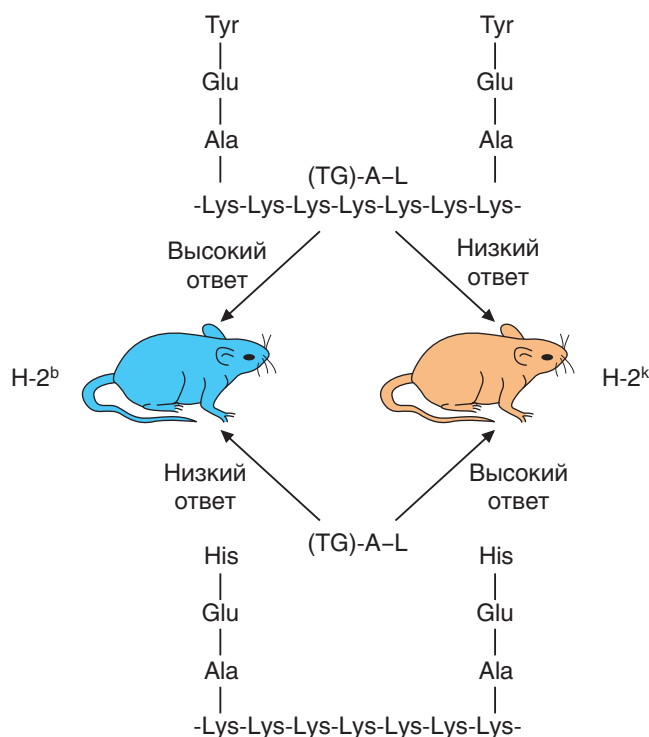
должны обеспечить его эффективность, а с другой — ограничить его в безопасных для организма рамках. Контроль иммунного ответа осуществляется на конституционально-генетическом уровне, а его детальная «доводка» происходит с помощью механизмов эндокринной и нервной регуляции. Однако наиболее важна ауторегуляция иммунных процессов, реализуемая с участием факторов самой иммунной системы.

### 3.6.6.1. Генетический контроль иммунного ответа

С помощью технологии отключения (нокаута) генов показано, что для реализации иммунного ответа необходимо функционирование большого числа генов. О том же свидетельствуют данные оценки экспрессии генов при активации клеток иммунной системы — в этом процессе участвуют сотни генов. Генетический контроль в более узком смысле подразумевает возможность варьирования выраженности различных звеньев иммунного ответа в зависимости от аллельных форм тех или иных генов. Наибольшее внимание уделяют двум направлениям изучения генетического контроля иммунных процессов — анализу генетических основ контроля иммунного ответа безотносительно к его специфичности и в зависимости от специфичности вызывающих его антигенов.

Исследования в первом направлении крайне немногочисленны. В этом русле проведены работы по выведению линий мышей с высоким и низким уровнем отвечаемости на антигены (линии *Biozzi*). Они были получены путем инбридинга мышей с высоким или низким уровнем гуморального иммунного ответа на эритроциты барана. Такой отбор привел к созданию линий с различной конституцией иммунной системы, причем оппозитный уровень иммунного ответа наблюдали при иммунизации не только эритроцитами барана, но и многими другими антигенами, включая тимуснезависимые (например, бактериальные эндотоксины). В формировании этих альтернативных типов иммунореактивности оказалось вовлечено более 10 генов, в том числе С-гены иммуноглобулинов и некоторые гены, контролирующие активность макрофагов. У мышей этих линий с уровнем антителообразования коррелирует концентрация сывороточных IgM и IgG, степень ее нарастания при иммунном ответе и интенсивность пролиферативного ответа В-лимфоцитов на стимуляцию митогенами и антигенами. В то же время не найдено соответствия уровня гуморального иммунного ответа мышей этих линий и различных характеристик Т-лимфоцитов. В отношении макрофагов были получены неожиданные данные: высокому уровню иммунного ответа соответствовала способность макрофагов подавлять размножение фагоцитированных листерий, но в то же время — низкая способность презентировать антигены Т-хелперам. Высокая резистентность к инфицированию сальмонеллами и листериями сочеталась с низким уровнем антителообразования. Вероятно, в данном случае проявляется оппозитный характер Th1- и Th2-зависимых форм иммунного ответа.

Значительно полнее разработана вторая линия исследований — изучение генетической детерминации уровня иммунного ответа на конкретные антигенные эпитопы. Главные результаты в этой области получены при изучении ответа мышей и морских свинок различных линий на синтетические пептиды с известной структурой эпитопов. Примером



**Рис. 3.133.** Уровень гуморального иммунного ответа на синтетические пептиды детерминирован генами *MHC* (у мышей — *H-2*). Структурно сходные пептиды индуцируют гуморальный иммунный ответ при оппозитном по направленности контроле со стороны молекул *MHC-II*

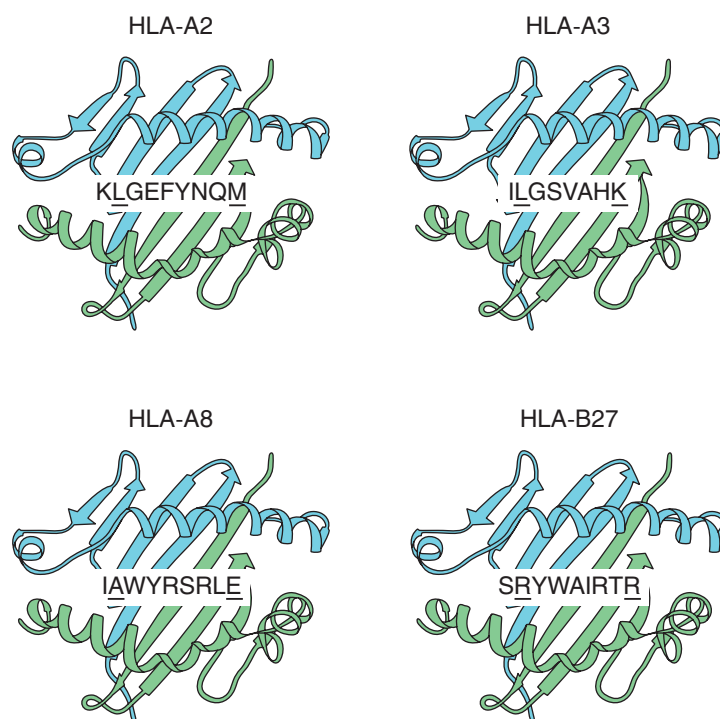
таких результатов могут служить данные о линейных различиях уровня ответа на два синтетических полипептида — (TG)–A–L и (HG) – A – L (см. раздел 3.2.1.3). Оказалось, что генетический контроль иммунного ответа индивидуален для каждого антигена. Контрастным характером ответа отличаются мыши линий C57BL/6 (*H-2<sup>b</sup>*) и CBA (*H-2<sup>k</sup>*): первые сильно отвечают на (TG)–A–L и слабо — на (HG)–A–L, вторые (CBA) — наоборот (рис. 3.133). Уровень иммунного ответа на названные антигены контролирует один ген, первоначально обозначенный как *Ir-1* (*Immune response 1*). Аллель, детерминирующий высокий уровень ответа, является доминантным. Ген *Ir-1* оказался сцепленным с генетическим комплексом *MHC*, точнее локализуется в области генов *MHC* класса II. Позже была установлена идентичность гена *Ir-1* генам *H-2I* у мышей. Это подтверждают данные о том, что мутация, затрагивающая экзон гена *H-2I-A*, кодирующий аминокислотную последовательность в вариабельной области молекулы I-A, приводит к смене высокой отвечаемости на низкую.

Дальнейший анализ показал, что действие гена реализуется на уровне АПК, экспрессирующих молекулы *MHC-II*. Его механизм состоит в различной способности антигенных пептидов (Т-эпитопов) встраивать-

ся в антигенсвязывающую щель в молекуле МНС-II. Хорошее встраивание соответствует высокому уровню отвечаемости, плохое встраивание — низкому. Таким образом, среди многочисленных событий, составляющих иммунный ответ, ключевым для детерминации его количественных показателей является этап презентации антигенного эпитопа Т-хелперу. Эффективность презентации зависит от степени соответствия между конфигурациями иммунодоминантного эпитопа и антигенсвязывающего желобка молекулы МНС-II, свойственной реагирующему организму. Так, у мышей C57BL/6 этот желобок в составе молекулы H-2<sup>b</sup> имеет конфигурацию, в которую хорошо встраивается эпитоп молекулы (TG)—A—L и плохо встраивается эпитоп молекулы (HG)—A—L. Соответствующая полость в составе молекулы H-2<sup>k</sup> мышей СВА имеет большее сродство к (HG)—A—L, чем к (TG)—A—L. Понятен и доминантный характер высокого уровня отвечаемости: для успешной презентации антигена достаточно экспрессии одного подходящего типа молекул МНС-II и на эффективность связывания им антигенного пептида не оказывает влияния аллельная молекула МНС-II, плохо связывающая пептид.

*Ir-1/МНС-II* — основной, но не единственный локус, определяющий уровень иммунного ответа. Описаны локализованные в других участках *МНС* гены, определяющие уровень ответа (практически всегда — через влияние на презентацию антигена). К генам иммунного ответа относят гены, контролирующие процессинг антигенов, например *LMP* и *TAP* (оба они также расположены в регионе II комплекса *МНС*). Гены группы *LMP* кодируют компоненты протеасом, в которых происходит расщепление белков на пептиды, встраивающиеся в молекулы МНС-I, а гены группы *TAP* — компоненты транспортной системы, перемещающей эти пептиды из цитозоля в эндоплазматический ретикулум. Регуляция уровня иммунного ответа этими генами обусловлена сродством их продуктов к соответствующим белкам или пептидам и, следовательно, полнотой выполнения ими функций (расщепления, транспорта) и в конечном счете эффективностью доставки пептидов к молекулам МНС-I. Сродство пептидов к антигенсвязывающей щели молекулы МНС-I также служит одним из факторов генетической детерминации уровня ответа, в частности против вирусов (рис. 3.134).

У человека связь генетического контроля иммунного ответа с генами *МНС* класса II (*HLA-DR*, *HLA-DQ*, *HLA-DP*) четко проявляется при аутоиммунных заболеваниях, развитие которых (т.е. развитие иммунного ответа на аутоантигены) четко контролируют названные гены (подробнее см. раздел 4.4.1.2). На этой связи основана проблема «HLA и иммунозависимые болезни». У людей с определенным генотипом величины относительного риска развития аутоиммунных заболеваний (отношение частоты развития заболевания у носителей данного аллеля и у лиц, не имеющих его) бывают повышены (равны 10–20). В отдельных случаях они значительно выше, достигая 208 при анкилозирующем спондилартрите (связь с аллелем HLA-B27 у ориентов). Доказательством реальности этой связи являются результаты переноса (трансфекции) мышам человеческого гена B27, который приводит к развитию у этих мышей патологии, сходной с анкилозирующим спондилартритом. Проявление эффекта гена (пенетрантность) зависит от ряда обстоятельств, в том числе генетического фона: у людей различных



**Рис. 3.134.** Сродство пептидов вируса гриппа к аллельным вариантам молекул главного комплекса гистосовместимости I класса (МНС-I). В разные аллельные варианты молекулы МНС-I встраиваются различные пептиды белка NP вируса гриппа, распознаваемые  $CD8^+$  Т-клетками, что определяет специфичность иммунного ответа

этнических групп величина относительного риска развития заболевания при наличии аллеля *B27* варьирует. Молекулярная основа подобных ассоциаций понятна — она также сводится к сродству пептидных эпитопов аутоантигенов с антигенсвязывающей полостью молекулы HLA (в рассмотренном случае — I класса).

Очевидно, что МНС-зависимый генетический контроль уровня иммунного ответа распространяется также на регуляцию устойчивости к инфекциям. Предпочтительная презентация на конкретных аллельных продуктах МНС пептидных фрагментов возбудителей инфекционных заболеваний служит предпосылкой отрицательной связи данного заболевания с наличием соответствующего аллеля. Так, пептиды вируса гриппа с наибольшим сродством встраиваются в молекулы HLA-B27 и HLA-A2, в результате чего носители названных аллелей и особенно гаплотипа A2B27 оказываются устойчивыми к гриппу. В то же время преимущественное встраивание в молекулы HLA-B8 и HLA-DR3 аутоантигенных пептидов из белков щитовидной и поджелудочной желез обуславливает наличие положительной корреляции заболеваемости базедовой болезнью, тиреоидитом Хашимото и ювенильным сахарным диабетом с наличием этих аллелей.

Показана роль в контроле уровня иммунного ответа локуса *IGH*, детерминирующего не только структуру константных доменов иммуноглобулинов, но и некоторые перекрестно-реагирующие идиотипы, связанные с синтезом антител определенной специфичности. С этим генетическим локусом связан контроль уровня гуморального ответа на  $\alpha(1-3)$ -декстран, а также IgE-ответа на некоторые аллергены. В случаях МНС-сцепленного контроля он не всегда реализуется через гены МНС: так, предрасположенность к аутоиммунному синдрому новозеландских мышей линии BW1 реализуется через ген *TNF*.

Генетическая детерминация иммунного ответа не ограничивается контролем его уровня. Генетические факторы определяют также качественные показатели иммунного ответа, в частности, преобладание Th1- и Th2-зависимых процессов. Впервые это было четко показано на линейных мышах. У мышей линии BALB/c преобладают Th2-зависимые процессы. У них максимально выражен гуморальный иммунный ответ. Мыши линии C57BL/6 склонны развивать иммунный ответ клеточного типа с преобладанием хелперов Th1-типа. Гены, контролирующие Th1/Th2-направленность иммунного ответа, не сцеплены с МНС. Детально изучена генетика аллергического (Th2-зависимого) ответа (атопии). Установлено, что наибольшее число генов атопии у человека локализовано в хромосомах 5 и 6 (в хромосоме 5 расположен кластер цитокиновых генов, в том числе генов *IL4*, *IL5*, *IL3*, *IL13*, *IL9*, *GMCSF* и т.д., а в хромосоме 6 — комплекс МНС, контролирующий уровень иммунного ответа). Среди генов, отвечающих за предрасположенность к аллергии, выявлены гены, кодирующие цитокины, способствующие развитию аллергии немедленного типа (*IL-4*, *IL-5*, *IL-13*), гены транскрипционных факторов Th2-клеток (*STAT6*, *GATA-3*) и ряд других.

### 3.6.6.2. Эндокринный и нервный контроль иммунного ответа

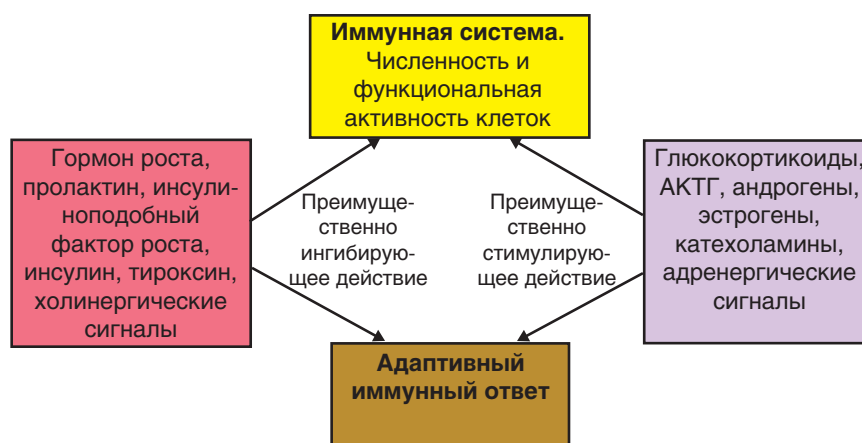
Иммунная система при всей своей автономности находится под контролем эндокринных и нервных воздействий (табл. 3.32, рис. 3.135). Влияние гормонов и медиаторов вегетативной нервной системы реализуется через их взаимодействие со специфическими рецепторами клеток иммунной системы. Эти факторы могут влиять на иммунную систему также через клетки стромы лимфоидных органов. Известны десятки рецепторов клеток иммунной системы для гормонов и нейроэндокринных факторов.

Таблица 3.32. Факторы нейроэндокринной регуляции

Группа факторов	Нейроэндокринные факторы	Действие
Факторы, стимулирующие иммунные процессы	Гормон роста (соматотропный гормон)	Усиливает пролиферацию Т-клеток, синтез гормонов тимуса
	Инсулин	Усиливает пролиферацию клеток
	Тироксин	Усиливает пролиферацию и дифференцировку лимфоцитов
	Пролактин	Стимулирует выработку гормонов тимуса
	Прогестерон	Стимулирует выработку гормонов тимуса

Окончание табл. 3.32

Группа факторов	Нейроэндокринные факторы	Действие
Факторы, угнетающие иммунные процессы	$\alpha$ -Эндорфин	Усиливает гуморальный иммунный ответ
	Холинергические нервные стимулы	Усиливают пролиферацию лимфоцитов, особенно тимоцитов
	Глюкокортикоиды	Индукцируют апоптоз и эмиграцию незрелых тимоцитов, подавляют пролиферацию зрелых лимфоцитов, усиливают дифференцировку Т-клеток, их миграцию в костный мозг, снижают секрецию цитокинов, гормонов тимуса
	Адренокортикотропный гормон	Усиливая секрецию глюкокортикоидов и действуя непосредственно, снижают содержание лимфоцитов в циркуляции и их функциональную активность
	Катехоламины (особенно норадреналин) и адренергические нервные стимулы	Подавляют пролиферацию и усиливают дифференцировку лимфоцитов (особенно $CD4^+$ Т-клеток), угнетают их миграцию в лимфатические узлы. Действуют через $\beta$ -адренергические рецепторы
	Андрогены	Снижают число лимфоцитов и их реакцию на антигены, способствуют возрастной инволюции тимуса
	Эстрогены	То же, но их действие на лимфоциты слабее, чем у андрогенов. Подавляют активность регуляторных Т-клеток
	$\beta$ -Эндорфин	Подавляют гуморальный, усиливают клеточный иммунный ответ



**Рис. 3.135.** Действие гормонов и вегетативных нервных стимулов на адаптивную иммунную систему. Гормоны и нейромедиаторы объединены в две группы с преимущественно стимулирующим и ингибирующим действием на численность иммунных клеток и функцию иммунной системы

При всей противоречивости данных об эндокринной и нервной регуляции иммунных процессов при несколько схематизированном подходе удастся выявить достаточно четкие закономерности. Нервные и эндокринные факторы можно отнести к двум альтернативным группам с преобладанием ингибирующего или стимулирующего действия на систему иммунитета. К первой группе относят глюкокортикоиды (кортизол и его аналоги), АКТГ, адреналин, половые гормоны (андрогены, эстрогены, гестагены), а также адренергические (симпатические) медиаторы; ко второй — гормон роста, тироксин, инсулин и ряд других факторов.

Больше всего данных накоплено об эффектах гормонов коры надпочечников — глюкокортикоидах. Эти гормоны широко известны как противовоспалительные факторы. Под их противовоспалительным действием понимают и ингибирующее действие на факторы врожденного иммунитета, включая макрофаги и другие миелоидные клетки. В физиологических концентрациях эти гормоны подавляют пролиферацию лимфоцитов, но, по-видимому, способствуют их дифференцировке, а в фармакологических дозах вызывают апоптотическую гибель лимфоцитов и их перераспределение в организме, в частности, усиливая эмиграцию тимоцитов из коры тимуса в костный мозг. При иммунном ответе гормоны коры надпочечников подавляют активацию лимфоцитов, блокируют межклеточные взаимодействия, ослабляют секрецию IL-2 и других цитокинов. О существовании постоянного «давления» этих гормонов на иммунную систему свидетельствует эффект адреналэктомии — увеличение массы лимфоидных органов, особенно тимуса, и усиление различных форм иммунного ответа.

Особое значение имеет способность глюкокортикоидов вызывать апоптоз покоящихся лимфоцитов. Лимфоциты различаются по чувствительности к этому эффекту кортизола, образуя ряд с убывающей чувствительностью: кортикальные тимоциты > В-центрбласты > прочие В-лимфоциты > зрелые Т-лимфоциты. Стадии развития лимфоцитов, для которых характерна повышенная чувствительность к индукции апоптоза глюкокортикоидами, соответствует периодам селекции — при формировании антигенраспознающего репертуара Т-клеток в тимусе (см. раздел 3.3.2.3) и отборе клонов В-лимфоцитов с наибольшим сродством к антигену после гипермутагенеза (см. раздел 3.5.2.2). Периоды высокой кортизончувствительности соответствуют низкому уровню экспрессии антиапоптотических факторов Bcl-2 и Bcl-X<sub>L</sub>. Верхний предел физиологических колебаний уровня кортизола в крови составляет около 1 мкмоль/л. При такой концентрации этот гормон может вызвать апоптоз лимфоцитов на чувствительной стадии их развития (при селекции). Внутри тимуса источником глюкокортикоидов могут быть эпителиальные клетки, продуцирующие прегненолон, который может локально метаболизироваться до гидрокортизона.

Эффект, аналогичный действию глюкокортикоидов, выявляют при стрессе, сопровождаемом гиперкортицизмом, а также при введении препаратов глюкокортикоидов с лечебной целью. Хронический стресс приводит к снижению устойчивости к инфекционным агентам, включая вирусы. С уровнем глюкокортикоидов коррелируют восприимчивость к заражению вирусом Сендай и к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита.

Эффект АКТГ сходен с действием глюкокортикоидов и обусловлен как усилением секреции этих гормонов, так и его собственным иммуносупрессивным действием. Динамика синтеза АКТГ определяется суточными колебаниями экспрессии гена проопиомеланокортина, кодирующего этот гормон наряду с другими пептидными гормонами. С ней обратно коррелируют суточные колебания численности лимфоцитов в кровотоке мышей. Их содержание максимально в полночь, когда экспрессия гена проопиомеланокортина достигает самых низких величин, и минимальна в полдень, когда этот ген экспрессируется с наибольшей интенсивностью, что обуславливает высокую продукцию АКТГ.

Половые стероиды действуют аналогично, т.е. снижают число лимфоцитов и их активность, но слабее, чем глюкокортикоиды. Кроме того, половые стероиды в большей степени влияют на эпителиальные клетки тимуса. Андрогены и эстрогены в значительной степени обуславливают возрастную инволюцию тимуса. Их влияние на строю тимуса в начале периода полового созревания рассматривают как отправную точку инволюции этого органа. Кастрация приводит к некоторому повышению числа лимфоидных клеток в тимусе и периферических органах иммунной системы. Андрогены оказывают более сильное подавляющее действие на иммунную систему, чем эстрогены. Это выражается в большей массе лимфоидных органов и более высокой иммунной активности у женщин по сравнению с мужчинами. Однако эстрогены сильнее подавляют активность регуляторных Т-клеток, что служит одной из причин большей вероятности развития аутоиммунных заболеваний у женщин.

Тироксин усиливает как пролиферацию, так и дифференцировку лимфоцитов. Не вызывает сомнений стимулирующая роль соматотропного гормона и инсулина в становлении иммунной системы и в развитии иммунного ответа. Нередко соматотропный гормон относят к цитокинам, поскольку его рецептор принадлежит к семейству цитокиновых рецепторов. Этот гормон может оказывать прямое митогенное действие на Т-лимфоциты. К факторам роста лимфоцитов относят также инсулин и инсулиноподобный фактор роста.

Нейропептидам принадлежит важная роль в регуляции как развития клеток иммунной системы, так и реализации иммунных процессов. На лимфоцитах есть также допаминовые рецепторы и рецепторы для эндорфинов.  $\alpha$ -Эндорфины и  $\beta$ -эндорфины обладают структурным сходством (вторые представляют N-концевую часть первых). Однако они оказывают противоположное действие на гуморальный ответ мышей:  $\alpha$ -эндорфин усиливает, а  $\beta$ -эндорфин подавляет его, в то же время усиливая Т-клеточный ответ (возможно, эти противоположные эффекты реализуются через действие на дифференцировку Th1- и Th2-клеток). Нейропептиды VIP (вазоактивный пептид) и субстанция Р участвуют в регуляции и реализации аллергических процессов — VIP расслабляет гладкую мускулатуру и служит антагонистом гистамина, а субстанция Р вызывает сокращение гладких мышц.

Важное значение для нормального функционирования иммунной системы имеет уровень секреции гормонов эпителиальными клетками тимуса. Эти клетки вырабатывают широкий спектр пептидных факторов (нейропептиды и пептидные гормоны) — окситоцин, вазопрессин, соматостатин,

гормон роста, АКТГ, инсулин и инсулиноподобные ростовые факторы (IGF-1, IGF-2). Особое место среди них занимают так называемые гормоны тимуса, которые также принадлежат к нейропептидам. К ним относят тимозины (прежде всего  $\alpha 1$ -тимозин), тимопоэтины и Zn-связывающий нонапептид тимулин. Как уже отмечалось (см. раздел 3.4.1.2), лишь последний вырабатывается только в тимусе. Ослабление выработки гормонов тимуса приводит к снижению способности Т-лимфоцитов секретировать IL-2 и отвечать пролиферацией на активирующие стимулы. Возрастное снижение продукции гормонов тимуса — одно из наиболее очевидных проявлений старения тимуса и вероятная причина ослабления с возрастом иммунной защиты.

Секреция гормонов тимуса находится под контролем нетимусных гормонов — глюкокортикоиды, андрогены и эстрогены подавляют ее, а пролактин, соматотропный гормон и прогестерон — усиливают. Существенное влияние на выработку этих гормонов оказывают цитокины, в частности, вырабатываемые в тимусе. IL-1 и IFN $\alpha$  усиливают продукцию тимулина.

В вегетативной нервной системе четко выявляется альтернативный характер адренергических и холинергических влияний на иммунную систему. Более тесно с иммунной системой связан симпатический отдел вегетативной нервной системы. Симпатическая иннервация тимуса осуществляется в основном через субкапсулярный отдел, а в периферических лимфоидных органах — через тимусзависимые зоны. Нервные окончания расположены близко к лимфоцитам (на расстоянии, сравнимом с таковым между нервным окончанием и мышечными или эндотелиальными клетками). Лимфоциты имеют  $\beta_2$ -адренергические рецепторы и воспринимают сигналы соответствующих медиаторов (в первую очередь норадреналина и нейроксина). Эти факторы оказывают преимущественно ингибирующее действие — подавляют пролиферацию лимфоцитов, но в то же время усиливают их дифференцировку. Хирургическая денервация селезенки и фармакологическая симпатэктомия усиливают миграцию лимфоцитов в селезенку и несколько ослабляют их миграцию в лимфатические узлы, снижают иммунный ответ. Ацетилхолин и холинергические стимулы поддерживают пролиферацию лимфоцитов. Холинергические влияния особенно четко проявляются в тимусе, где они способствуют размножению и эмиграции тимоцитов.

Общеизвестна роль вегетативной нервной системы в проявлении аллергии. Преобладающее влияние парасимпатического отдела способствует проявлению бронхоспазма при бронхиальной астме. Значительную часть медикаментозных препаратов, направленных на его купирование, представляют  $\beta_2$ -адреномиметики или антагонисты мускариновых холинергических рецепторов.

Высшие отделы нервной системы также влияют на состояние иммунной системы. Показана возможность условнорефлекторной стимуляции или угнетения иммунного ответа, а также контроля активности НК-клеток. Данные о возможности условнорефлекторной индукции специфического иммунного ответа не достоверны.

Иммунная система интегрирована в комплекс регуляторных систем. Нередко говорят о нейроиммуноэндокринной регуляции. Иммунная система способна влиять на состояние эндокринной и нервной систем, главным образом посредством цитокинов. Так, IL-1 усиливает выработку глюкокор-

тикоидов, что выявляют при воспалении и иммунном ответе. Этот процесс можно рассматривать как проявление отрицательной обратной связи. IL-1 и TNF $\alpha$  участвуют в межсистемных взаимодействиях, влияя на процессы, происходящие в эндокринной и нервной системах. Гормоны тимуса также воздействуют на активность этих систем. Так, тимопоэтин усиливает продукцию глюкокортикоидов; тимэктомия приводит к снижению активности щитовидной и половых желез. Это дало основание ряду исследователей говорить о существовании гипоталамо—гипофизарно—тимусно—гонадной оси.

Антитела в составе иммунных комплексов влияют на секреторные клетки гипофиза, экспрессирующие Fc $\gamma$ -рецепторы. На активность эндокринных желез оказывают влияние как естественные аутоантитела к гормонам, так и антитела к их идиотипу. Антиидиотипические антитела, воспроизводящие конфигурацию активного центра гормона, могут взаимодействовать с рецепторами для этих гормонов и тем самым воспроизводить их биологические эффекты.

### 3.6.6.3. Регуляция иммунного ответа

Рассмотренные выше контрольные факторы являются внешними по отношению к иммунной системе. Они определяют готовность организма к иммунному ответу, устанавливают его предельные возможности и преобладающую направленность. Иммунорегуляторные факторы порождаются также внутри иммунной системы, как правило, в ходе иммунного ответа. Обычно они клоносpezifичны и направлены на ограничение, сдерживание иммунных процессов.

Важную роль в определении длительности и интенсивности иммунного ответа играет антиген. Его присутствие в организме обуславливает непрерывное вовлечение в иммунный процесс клонов лимфоцитов. После элиминации антигена рекрутирование лимфоцитов прекращается, что служит основной причиной прекращения иммунного ответа. Однако в завершении иммунного процесса важную роль играют активные механизмы, проявление которых заложено в программу развития иммунного ответа. Эти процессы при полном удалении из организма возбудителя и его антигенов значительно ускоряют завершение иммунного ответа и возвращение к исходному состоянию иммунной системы. Включение сдерживающих механизмов, не сопряженное с полной элиминацией антигена, во многом определяет особенности хронических инфекционных и аутоиммунных процессов.

#### *Внутриклеточные механизмы иммуносупрессии. Супрессорные иммунорецепторы*

Выше неоднократно упоминалось о супрессорном мотиве ITIM, который служит альтернативой активационному мотиву ITAM и предназначен для передачи в клетку ингибирующих сигналов. Последовательность аминокислот ITIM можно представить в виде формулы: I/V/L/S-X-Y-XX-L, где Y — остатки тирозина, X — любые остатки, а I, V, L, S — остатки гидрофобных аминокислот (изолейцина, валина, лейцина, серина).

Наиболее важное свойство ITIM — способность привлекать (рекрутировать) тирозинфосфатазы SHP1, SHP2, SHIP и т.д., через которые и реализуется ингибирующее действие ITIM. Передача активационных сигналов

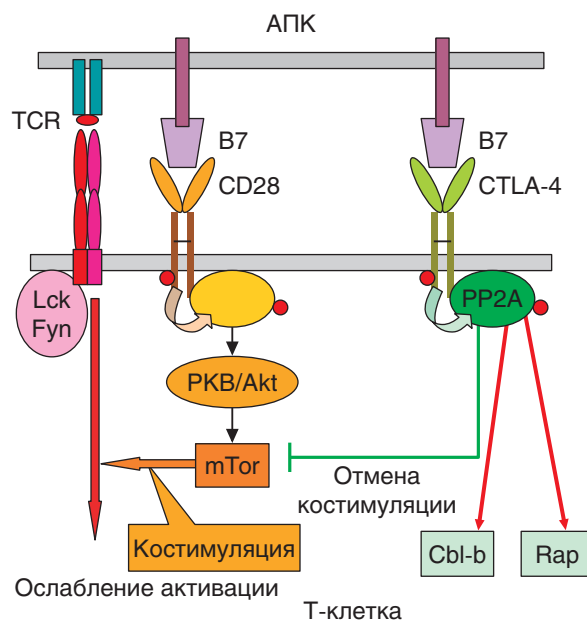
осуществляется с помощью протеинкиназ. Эти ферменты фосфорилируют белки, что приводит к их активации. Фосфатазы, напротив, дефосфорилируют белки и тем самым прерывают передачу активационного сигнала. В связи с этим рецепторы, цитоплазматическая часть которых содержит последовательности ITIM, являются супрессорными. К наиболее известным ITIM-содержащим ингибиторным рецепторам относят FcγRIIB (см. далее), ингибирующие рецепторы NK-клеток (NKG2, KIR) и ряд других мембранных молекул.

Наиболее изученный и важный из супрессорных рецепторов Т-клеток — рецептор CTLA-4 (CD152). Это структурный аналог главной костимулирующей молекулы Т-лимфоцитов CD28. Его молекулярная масса составляет 41–43 кДа. Как и CD28, CD152 представляет гомодимер, скрепленный дисульфидной связью. Каждый мономер содержит 1 внеклеточный домен из суперсемейства иммуноглобулинов (тип V). Подобно CD28, CTLA-4 взаимодействует с костимулирующими молекулами CD80 и CD86 АПК, но имеет к ним значительно более высокое сродство, чем CD28. В покое CTLA-4 локализован в цитоплазме, а при активации перемещается на мембрану. Это происходит в поздний период активации Т-клетки, когда она уже получила стимулирующие сигналы, и активация реализовалась. Обычно CTLA-4 экспрессируется на заключительном этапе существования иммунного синапса, «разборке» которого эта молекула способствует.

Цитоплазматическая часть молекулы CTLA-4 не имеет последовательности ITIM, однако в ней содержатся 2 остатка тирозина в позициях 165 и 182. Из них для передачи супрессорных сигналов наиболее важен остаток 165, поскольку с ним взаимодействуют некоторые ферменты — липидная киназа PI<sub>3</sub>K, и две фосфатазы — SHP2 и PP2A (для проявления супрессорного эффекта особенно важна последняя), а также адапторные белки AP-1 и AP-2, участвующие в перемещении молекулы CTLA в цитоплазму и обратно (рис. 3.136). Супрессорное действие CTLA-4 объясняют конкуренцией с CD28 за связывание молекул CD80/CD86. В результате передача в клетку активирующих сигналов прекращается, и в нее поступают ингибирующие сигналы. В реализацию супрессорного эффекта сигналов, поступающих через CTLA-4, вносят вклад и другие механизмы:

- повышение порога стимуляции выработки цитокинов;
- подавление экспрессии транскрипционных факторов (NFκB, NF-AT и AP-1);
- активация 2,3 иоксигеназы индоламина (ингибирует активность лимфоцитов в результате истощения пула триптофана);
- усиление подвижности Т-клеток и модуляция состава рафтов (укорачивает срок существования иммунного синапса);
- индукция выработки супрессорного цитокина TGFβ и дифференцировка регуляторных Т-клеток.

Известны единичные активационные эффекты CTLA-4 (например, активация киназы JNK), которые могут проявиться только при особых условиях связывания CTLA-4. В целом же появление на поверхности Т-клетки CTLA-4 и связывание этой молекулы с лигандами (B7 — CD80/CD86) приводит к ослаблению или прекращению активации Т-клетки вследствие действия внутриклеточных фосфатаз PP2A и SHP2. Эти фосфатазы прерывают



**Рис. 3.136.** Пути передачи внутриклеточных супрессорных сигналов. В зависимости от того, взаимодействует молекула B7 с CD28 или CTLA-4, в клетку поступает костимулирующий или ингибирующий сигнал

поступление в клетку активационного сигнала, дефосфорилируя сигнальные белки.

Среди мембранных молекул — гомологов костимулирующей молекулы CD28 — существует еще по крайней мере 2 рецептора, передающие в Т-клетки ингибирующий сигнал. Это PD-1 (*Programmed death-1*) и BTLA (*B- and T-lymphocyte attenuator*). В отличие от CTLA-4, эти рецепторы содержат в своей цитоплазматической части последовательность ITIM. Передача супрессорных сигналов происходит благодаря привлечению к этим мотивам фосфатаз SHP1 и SHP2.

#### **Изотипическая регуляция гуморального иммунного ответа и супрессорные Fc-рецепторы**

Один из основных механизмов регуляции гуморального иммунного ответа основан на изменении баланса в организме антигена и антител. Накапливающиеся антитела связывают антиген, что приводит к образованию иммунных комплексов. В состав иммунных комплексов входят антитела различных классов, причем в начальном периоде ответа преобладают иммунные комплексы, содержащие IgM-антитела, а в более позднем периоде — IgG-содержащие комплексы. В зависимости от избытка антигена или антител состав комплексов бывает различным (см. раздел 3.2.1.4). В начальный период преобладает антиген, и Fc-участки антител могут быть экранированы молекулами антигена. При этом эпитопы антигена доступны для лимфоцитов, а иммуногенность антигена в составе иммунного комплекса повышается. Таким образом, «ранние» иммунные комплексы

способствуют дальнейшему развитию иммунного ответа. В более поздний период в иммунном комплексе преобладают антитела, и их Fc-участок экспонирован на поверхности комплекса.

Таким образом, в позднем периоде иммунного ответа создаются условия, благоприятные для распознавания иммунных комплексов, содержащих IgG-антитела. Распознавание осуществляют Fc-рецепторы как фагоцитов (что важно для поглощения чужеродных клеток, опсонизированных антителами), так и В-лимфоцитов. Последнее имеет прямое отношение к регуляции иммунитета, поскольку на их поверхности присутствуют рецепторы типа FcγRIIB, имеющие в цитоплазматической части последовательность ITIM.

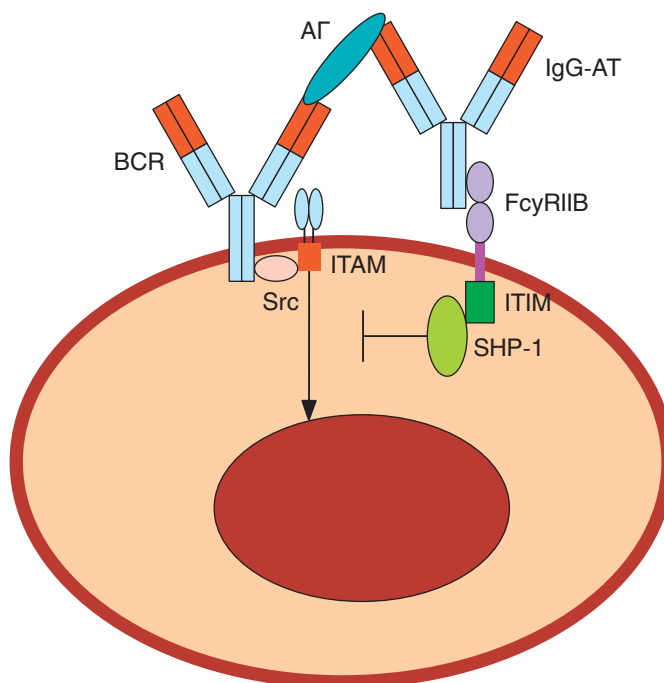
Введение IgG-антител мышам за 1–2 сут до их иммунизации антигеном, к которому эти антитела специфичны, приводит к ослаблению гуморального иммунного ответа. При этом угнетается формирование клеток, продуцирующих антитела (как IgG, так и IgM). На секрецию антител уже сформировавшимися плазматическими клетками IgG-антитела не влияют. Наоборот, систематическое удаление антител в ходе иммунного ответа вызывает рост числа антителообразующих клеток и усиление секреции антител. Fab- и F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты антител и содержащие их иммунные комплексы, а также IgG-антитела иной специфичности ингибирующим действием не обладают. Таким образом, ингибирующее действие свободных IgG-антител и их комплексов с антигеном на выработку антител зависит от присутствия в их молекулах Fc-участка, а также от специфичности их активного центра, которая должна соответствовать специфичности подавляемых антител.

Анализ механизмов подавления IgG-антителами образования антител В-лимфоцитами показал, что для его реализации необходимо формирование комплексов с молекулами антигена. Необходимо, чтобы при связывании иммунного комплекса произошло перекрестное сшивание Fc-рецептора и рецептора BCR за счет взаимодействия с Fc-частью молекулы антитела и эпитопом в составе антигена соответственно. Связывание с BCR обеспечивает специфичность действия иммунного комплекса на клон В-лимфоцитов, вовлеченный в иммунный ответ, а связывание с Fc-рецептором — реализацию ингибирующего эффекта. Формирование В-клеток памяти, а также активность специфических Т-хелперов при этом не изменяется.

Этот тип подавления гуморального иммунного ответа реализуется через Fc-рецепторы определенного типа — FcγRIIB, локализованные на В-лимфоцитах и содержащие в своей цитоплазматической части последовательность ITIM. Вовлечение в реакцию BCR обеспечивает активацию связанных с рецептором Src-тирозинкиназ Lck, Fyn, Lyn и Blk, которые осуществляют фосфорилирование остатка тирозина. Это, в свою очередь, необходимо для рекрутирования фосфатаз SHP1, SHP2, SHIP, которые осуществляют дефосфорилирование белков (в том числе сигнальных) и прерывают передачу активационных сигналов (рис. 3.137).

### ***Идиотипическая регуляция иммунного ответа***

*Идиотип* — это характеристика антител, обусловленная уникальной структурой активного центра, выявляемой с помощью антител к идиотопу — эпитопу, структурно связанному с активным центром антитела (см. раздел 3.1.1.3). Различают индивидуальные и перекрестно реагирующие идио-



**Рис. 3.137.** Изотипическая регуляция образования антител, реализуемая через FcγRII. Антиген, связавшийся с В-клеточным рецептором, одновременно формирует комплекс с растворимыми IgG-антителами. Комплекс распознается FcγRII-рецептором, передающим в В-клетку супрессорный сигнал

типы. Индивидуальные идиотипы уникальны и могут рассматриваться как маркеры определенной специфичности антител у конкретных индивидов. Перекрестнореагирующие идиотипы характерны для антител к распространенным антигенам. Такие антитела образуются в разных, но генетически родственных организмах. При близком структурном совпадении идиотопа с активным центром антител антигенсвязывающий участок антиидиотипических антител может выступать в качестве «суррогатного» антигена, или «внутреннего образа антигена».

В соответствии с концепцией идиотипической сети, сформулированной Н. Йерне (*N. Jerne*), в организме существует равновесие между идиотипами (в том числе антителами к чужеродным антигенам) и антиидиотипами (в том числе этими антигенами). Поступление экзогенного антигена (антиидиотопа) вызывает сдвиг этого равновесия, восстанавливаемого синтезом антител (идиотопа, антител 1-го порядка). На пике иммунного ответа равновесие вновь нарушается, но уже в противоположном направлении — вследствие накопления избыточных количеств антител. Система восстанавливает равновесие, синтезируя антиидиотипические антитела (антитела 2-го порядка). Ситуация повторяется пока равновесие не стабилизируется. При близком соответствии эпитопов антигена и антиидиотопа реакцией на избыток антител 2-го порядка будет образование не новых антител (3-го

порядка), а антител 1-го порядка. Динамика системы при этом ограничивается взаимодействием двух составляющих — антигена/антиидиотипа и антитела/идиотипа.

В действительности структура идиотипа практически никогда точно не совпадает со структурой активного центра антитела. Поэтому в описанной схеме структура антител очередного уровня все меньше отражает структуру эпитопов и активных центров исходной пары реагирующих молекул; колебания их соотношений затухают. Тем не менее, описанная схема в определенной степени соответствует реальности (удается выявить образование антиидиотипических и даже анти-антиидиотипических антител) и находит отражение в механизмах регуляции иммунного ответа.

Роль перекрестно реагирующих идиотипов в регуляции иммунного ответа состоит в ограничении выработки несущих идиотоп антител антиидиотипическими антителами (в данном случае срабатывает FcR-зависимый механизм подавления антителообразования). Так, введение мышам линии C57BL/6, иммунизированным фосфорилхолином, антител к идиотипу T15 вызывает значительное снижение гуморального ответа на фосфорилхолин за счет подавления образования T15<sup>+</sup>-антител. Роль частных (индивидуальных) идиотипов, маркирующих продукты отдельных клонов В-клеток, в регуляции образования антител состоит в ограничении вклада этого клона в иммунный ответ. Это проявляется сменой доминирующих клонов антителопродуцентов, которую удается зарегистрировать экспериментально.

### *Супрессорные цитокины*

Широко известно взаимно ингибирующее действие цитокинов, вырабатываемых Т-хелперами одного типа, на образование цитокинов Т-хелперами другого типа (например, Th1-цитокины подавляют образование Th2-цитокинов; и Th1- и Th2-цитокины ингибируют синтез Th17-цитокинов). Понятие «супрессорный цитокин» относят к более ограниченной группе цитокинов, для которых характерно преобладание ингибирующих эффектов над стимулирующими. Наиболее известны 2 таких цитокина — TGFβ и IL-10. Оба эти цитокина вносят существенный вклад в ограничение иммунного ответа, причем их эффект не является клоноспецифическим.

**IL-10** описан как ингибитор активности Th1-клеток. Его молекулярная масса составляет 35–40 кДа. Он является прототипом семейства цитокинов, в которое входят IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26. У мышей IL-10 вырабатывают Th2-клетки (у человека — также Th1-клетки), некоторые типы регуляторных Т-клеток, цитотоксические Т-лимфоциты, моноциты/макрофаги, дендритные и тучные клетки, В1-лимфоциты. Разнообразные гомологи IL-10, частично воспроизводящие его функции, вырабатываются вирусами. Рецепторы IL-10 — димеры, образованные полипептидными цепями α и β, с которыми связаны цитоплазматические тирозинкиназы (соответственно, Jak1 и Tyk2). В передаче сигнала принимают участие транскрипционные факторы STAT1, STAT3, а в моноцитах — также STAT5.

Основной эффект IL-10 — противовоспалительный. Он реализуется через подавление активности макрофагов и Т-лимфоцитов (особенно Th1 и Th17) — прежде всего синтеза этими клетками провоспалительных цитокинов. Будучи антагонистом IFNγ, IL-10 подавляет экспрессию молекул

МНС-II, а также пролиферацию активированных Т-лимфоцитов, развитие воспалительной формы иммунного ответа и гиперчувствительности замедленного типа. В то же время в тимусе он выступает в качестве кофактора IL-7 и IL-2 в поддержании пролиферации тимоцитов. IL-10 способствует развитию гуморального иммунного ответа; он служит синергистом IL-4 при действии на В-клетки, защищая их от апоптоза, усиливая их пролиферацию, дифференцировку в антителообразующие клетки, синтез ими IgM и IgA. Этот цитокин участвует также в антипаразитарной защите.

Таким образом, IL-10 выступает в роли Th2-цитокина, способствуя реализации гуморальных иммунных реакций и выступая в качестве супрессорного цитокина в отношении воспалительных процессов и адаптивных иммунных реакций клеточного типа. Представители семейства IL-10 при структурном сходстве существенно различаются по функциям. IL-24 представляет особый интерес в связи со способностью избирательно вызывать апоптоз опухолевых клеток.

**Трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF $\beta$ )** описан в 1981 г. в составе группы ростовых факторов. Свое название он получил в связи со способностью индуцировать «трансформированный» фенотип у нормальных клеток, растущих в культуре (потеря контактного торможения, отделение от субстрата, реорганизация цитоскелета). Он представляет собой гомодимер (молекулярная масса — 25 кДа). Продуцентами TGF $\beta$  служит огромное число клеток, включая стромальные, эпителиальные клетки, макрофаги, регуляторные Т-лимфоциты, многие разновидности опухолевых клеток. Он секретируется в неактивной форме: требуется протеолитическое расщепление молекулы, чтобы она приобрела способность взаимодействовать с высокоаффинными рецепторами. Последние содержат 2 цепи. Связывание цитокина приводит к активации киназной активности внутриклеточного домена цепи TGF $\beta$ RII, вследствие чего происходят олигомеризация и фосфорилирование цепей I и II и активация транскрипционных факторов Smad2 и Smad3, а также запуск Smad-независимых путей активации клетки.

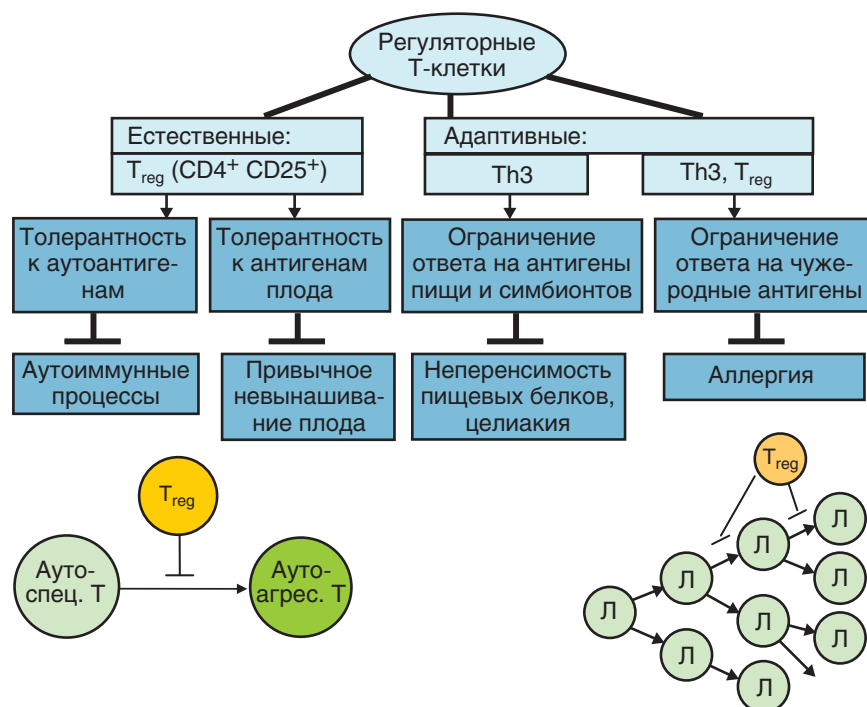
Мишенями фактора служат также очень многие виды клеток, экспрессирующие высокоаффинный рецептор TGF $\beta$ . При действии TGF $\beta$  на иммунную систему преобладают ингибирующие эффекты. Он подавляет синтез воспалительных цитокинов, ответ Т-лимфоцитов на ростовые цитокины, дифференцировку цитотоксических Т-лимфоцитов, активность естественных киллеров. В то же время TGF $\beta$  способствует развитию незрелых моноцитов, мобилизации нейтрофилов и моноцитов в очаг воспаления. Он усиливает синтез белков межклеточного матрикса, ускоряет заживление ран, оказывает анаболический эффект. TGF $\beta$  способствует переключению синтеза антител на изотип IgA и усиливает синтез этого иммуноглобулина на посттранскрипционном уровне, тем самым способствуя защите слизистых оболочек. TGF $\beta$  — фактор, необходимый для развития провоспалительных Th17-клеток и супрессорных естественных регуляторных Т-клеток. Являясь продуктом естественных и адаптивных регуляторных Т-клеток, он отвечает за реализацию многих их эффектов. Выключение гена TGF $\beta$  обуславливает развитие генерализованной воспалительной патологии с гиперплазией лимфоидной ткани в кишечнике в сочетании с системными аутоиммунными процессами.

Таким образом,  $TGF\beta$  — важный супрессорный цитокин, подавляющий преимущественно воспалительные процессы и связанные с ними формы Т-клеточного иммунного ответа. Он служит важным регулятором системы иммунитета, предотвращающим аутоиммунные процессы. В то же время  $TGF\beta$  способствует развитию воспалительных клеток и реализации начальных этапов воспалительного процесса, а также регенерации тканей.

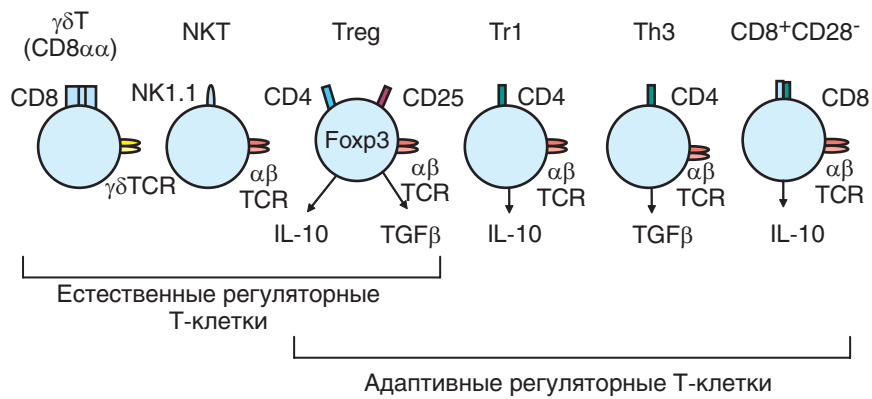
#### 3.6.6.4. Регуляторные Т-клетки

В начале 70-х годов прошлого столетия был описан феномен супрессии иммунного ответа, опосредованной Т-клетками. Вначале в качестве супрессоров рассматривались  $CD8^+$  Т-клетки, однако вскоре накопилось много вопросов (относительно маркеров, развития, получения стабильных клонов супрессорных  $CD8^+$  Т-клеток и др.), которые не удалось разрешить. К концу 80-х годов представление о супрессорной функции  $CD8^+$  Т-клеток было отвергнуто. Во второй половине 90-х годов было описано сразу несколько субпопуляций Т-лимфоцитов, обладающих супрессорной активностью. На этот раз вновь обнаруженные супрессоры были обозначены как регуляторные Т-клетки.

Регуляторные Т-клетки разделяют на естественные и адаптивные (рис. 3.138, 3.139). Естественные регуляторные Т-клетки развиваются в про-



**Рис. 3.138.** Функциональная роль разновидностей регуляторных Т-клеток. Схемы внизу отражают способность регуляторных Т-клеток ограничивать аутоиммунные реакции Т-клеток (естественные регуляторные Т-лимфоциты) и сдерживать экспансию клонов Т-клеток, вовлеченных в иммунный ответ (адаптивные регуляторные Т-лимфоциты)



**Рис. 3.139.** Разновидности естественных и адаптивных регуляторных Т-клеток. Представленные варианты регуляторных Т-клеток относят к естественными или адаптивным (индуцированным). FOXP3<sup>+</sup> регуляторные Т-клетки рассматривают одновременно как естественные и адаптивные — в зависимости от механизма их образования

цессе нормального созревания Т-лимфоцитов в тимусе независимо от действия антигенов. Эта субпопуляция регуляторных Т-лимфоцитов охарактеризована выше (см. раздел 3.3.2.5). Адаптивные регуляторные Т-клетки развиваются при иммунном ответе (табл. 3.33). Роль этих клеток несколько различается; если основная функция естественных регуляторных Т-лимфоцитов состоит в предотвращении аутоиммунных процессов, то адаптивные регуляторные Т-клетки главным образом ограничивают иммунный ответ на заключительных этапах его развития. Ниже представлены данные об адаптивных регуляторных Т-клетках. Помимо недостаточно полно охарактеризованных Th3- и Tr1-клеток к ним относят адаптивный вариант CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> регуляторных Т-лимфоцитов.

**Таблица 3.33.** Естественные и адаптивные регуляторные Т-клетки

Тип регуляторных клеток	Разновидности регуляторных Т-клеток	Происхождение	Экспрессия маркеров	Продукты	Механизм действия	Функции
Естественные регуляторные Т-клетки	Регуляторные Т-клетки	Дифференцировка в тимусе (γδТ — также вне его)	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> GITR <sup>+</sup> ; FOXP3 <sup>+</sup>	TGFβ, IL-10	Контактный механизм	Предотвращение аутоагрессии
	γδТ		CD3 <sup>+</sup> TCRγδ <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	Нет данных	Нет данных	
	NKT		CD4 <sup>+</sup> NK1.1 <sup>+</sup> NKG2 <sup>+</sup> NKG2D <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	IFNγ, IL-4, IL-13	Нет данных	

Окончание табл. 3.33

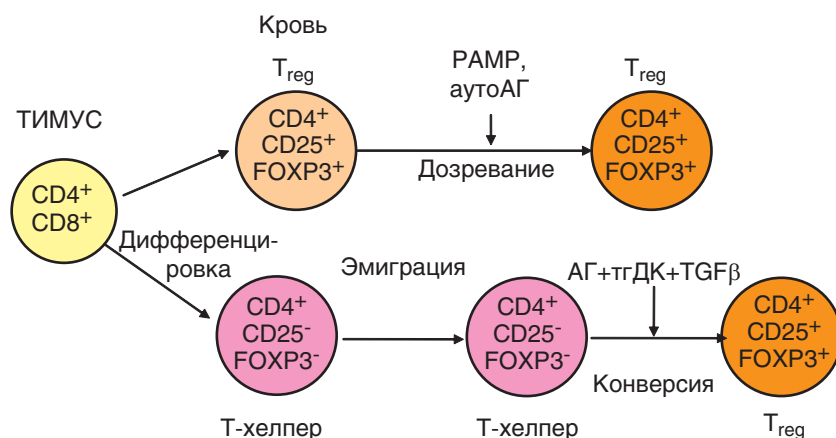
Тип регуляторных клеток	Разновидности регуляторных Т-клеток	Происхождение	Экспрессия маркеров	Продукты	Механизм действия	Функции
Адаптивные регуляторные Т-клетки	Индукированные регуляторные Т-клетки	Индукцируются в ходе иммунного ответа	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> GITR <sup>+</sup> ; FOXP3 <sup>+</sup>	TGFβ, IL-10	Контактный механизм через супрессорные цитокины	Ограничение иммунного ответа (предотвращение иммунного повреждения)
	Th3		CD3 <sup>-</sup> TCRαβ <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+/-</sup>	TGFβ, IL-10	Через супрессорные цитокины	
	Tr1		CD3 <sup>-</sup> TCRαβ <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ; FOXP3	IL-10	Через супрессорные цитокины	
	CD8 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup>		CD3 <sup>-</sup> TCRαβ <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	IL-10	?	

**Адаптивный вариант FOXP3<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток (T<sub>reg</sub>)**

Основная функция естественных регуляторных Т-клеток, свойства и развитие которых охарактеризованы выше (см. раздел 3.3.2.5), состоит в предотвращении аутоагрессии путем ингибирования активности аутоспецифических клонов Т-лимфоцитов. Однако регуляторным Т-клеткам принадлежит важная роль также в сдерживании и ограничении нормального иммунного ответа на чужеродные антигены.

Показана возможность развития естественных регуляторных Т-клеток на периферии иммунной системы из CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Т-клеток (рис. 3.140). Это может происходить независимо от иммунного ответа, например, в ходе гомеостатической пролиферации. Так, через 6 нед после переноса CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> клеток сингенным тимэктомированным мышам среди донорских лимфоцитов выявляется до 5–12% CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> клеток, обладающих супрессорной активностью. Однако наиболее закономерным и изученным является превращение CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> Т-клеток в Foxp3<sup>+</sup> Т-клетки при иммунном ответе. Этот процесс называют конверсией. Для его осуществления необходимо участие толерогенных (незрелых или обработанных IL-10 или TGFβ) дендритных клеток, несущих костимулирующие молекулы. Действуя на сами CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты, TGFβ способствует развитию как адаптивных регуляторных Foxp3<sup>+</sup> клеток, так и Th17-клеток. В этом случае выбор направления дифференцировки определяется дополнительными цитокиновыми стимулами: если TGFβ действует совместно с IL-2, развиваются регуляторные Т-клетки, тогда как совместно с IL-6 TGFβ индуцирует развитие Th17-клеток, причем IL-6 выступает как ингибитор развития адаптивных регуляторных Т-клеток.

Для реализации супрессорного эффекта *in vitro* необходима активация регуляторных Т-клеток, что обычно достигается передачей сигнала через



**Рис. 3.140.** Дозревание и конверсия  $FOXP3^+$  регуляторных Т-клеток на периферии. Наряду с «каноническим» путем дифференцировки регуляторных Т-клеток в тимусе (верхний ряд) показана возможность развития этих клеток на периферии по механизму конверсии (нижний ряд). АутоАГ — аутоантигены; тГДК—толерантные дендритные клетки

TCR с участием толерогенных дендритных клеток при условии одновременного действия IL-2. Мутации генов, кодирующих цепи рецептора для IL-2, или нейтрализация IL-2 антителами приводят к дефициту регуляторных Т-клеток и, как следствие, развитию аутоиммунных процессов и усиленной пролиферации лимфоцитов. Активированные регуляторные Т-клетки сами по себе анергичны: *in vitro* они слабо пролиферируют (даже в ответ на действие IL-2) и слабо секретируют цитокины (в значительных количествах — только IL-10 и TGFβ).

Главные клетки-мишени регуляторных Т-клеток —  $CD4^+CD25^-$  и  $CD8^+$  Т-клетки, отвечающие на аутоантигены, т.е. эффекторные аутореактивные Т-лимфоциты. В Т-зонах лимфоидных органов регуляторные Т-клетки напрямую контактируют с Т-лимфоцитами обоих субклассов, а также с дендритными клетками. Хотя стимуляция регуляторных Т-клеток антиген-специфична, для реализации их супрессорного эффекта не требуется совпадения их специфичности со специфичностью Т-клеток-мишеней. Важно только, чтобы антигены презентировались эффекторным и регуляторным Т-клеткам одними и теми же дендритными клетками. Для осуществления супрессорного эффекта нужен прямой контакт регуляторных Т-лимфоцитов с клетками-мишенями. Блокада молекулы CTLA-4 регуляторных Т-клеток отменяет их супрессорный эффект. Супрессорные цитокины IL-10 и TGFβ тоже вносят вклад в реализацию действия этих клеток. Однако этот вклад не является решающим и может быть выключен без нарушения супрессии.

Изменение активности регуляторных Т-клеток может привести к развитию патологии у человека и животных. Повышение численности и активности этих клеток чревато ослаблением резистентности к инфекционным и онкологическим заболеваниям, а уменьшение содержания этих клеток и их гипофункция приводят к повышению риска развития аутоиммунной патологии и невынашивания плода (см. раздел 4.7.1.4).

*Другие адаптивные регуляторные Т-клетки*

Описано несколько популяций адаптивных регуляторных Т-клеток — Th3, Tr1, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>. Все они недостаточно четко охарактеризованы. Th3-клетки представляют разновидность Т-хелперов, индуцируемую при иммунном ответе. Эти клетки секретируют исключительно или преимущественно TGFβ, который и играет роль их основного эффекторного фактора. Tr1-клетки описаны в барьерных тканях, как клетки, секретирующие IL-10 и вовлеченные в формирование неответственности на антигены пищи и симбиотических микроорганизмов. Допускают возможность выработки этими клетками TGFβ, а также их родство или идентичность с Th3-клетками. Так же мало известно о регуляторных субпопуляциях CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Одна из них лишена костимулирующей молекулы CD28 и уже по этой причине функционирование этих клеток в качестве Т-киллеров вызывает сомнения. Однако и их супрессорная роль недостаточно обоснована. То же касается CD8<sup>+</sup> Т-клеток, секретирующих IL-10, принадлежность которых к субпопуляции CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Т-клеток не выяснена.

**РЕЗЮМЕ**

Адаптивный (приобретенный) иммунитет возникает в эволюции поздно — у примитивных хордовых. Главные особенности этой формы иммунитета — распознавание индивидуальных чужеродных молекул (независимо от их связи с патогенностью) и направленность реакций против этих конкретных молекул — антигенов. Эту реакцию обозначают как иммунный ответ. Иммунный ответ формируется в результате превращения клеток-предшественников в эффекторные клетки. Роль исполнительных клеток адаптивного иммунитета играют лимфоциты двух основных типов — Т (развиваются в тимусе) и В (развиваются в костном мозгу). В связи с тем, что число потенциальных антигенов составляет несколько миллионов, распознающие их рецепторы формируются в ходе дифференцировки Т- и В-лимфоцитов путем перестройки и рекомбинации нескольких десятков сегментов зародышевых генов, из которых и формируется необходимое число варибельных генов, кодирующих антигенраспознающие рецепторы. В каждой клетке формируется уникальный по структуре рецепторный ген. Потомки каждой клетки образуют клоны, реагирующие на соответствующий антиген. После селекции для удаления ненужных и аутоспецифических клонов лимфоциты поступают в периферические отделы иммунной системы, где постоянно перемещаются между лимфоидными органами через кровь и лимфу. В-лимфоциты распознают свободные молекулы антигена, а Т-клетки — их фрагменты, встроенные в молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС).

Антигены, поступающие в организм в составе патогенов (обычно через барьерные ткани), захватываются дендритными клетками. Одновременно они получают стимулирующий сигнал через рецепторы врожденного иммунитета. Дендритные клетки встраивают антигенные эпитопы в мембранные молекулы МНС. Эти клетки мигрируют в реги-

ональные лимфатические узлы, где контактируют с Т-лимфоцитами, экспрессирующими TCR, который распознает соответствующий антигенный эпитоп. Моментом включения иммунного ответа является презентация антигена, состоящая в распознавании Т-клеткой антигена, презентируемого дендритной клеткой. Т-клетка активируется и пролиферирует (чтобы увеличить число клеток в реагирующем клоне). Затем происходит дифференцировка Т-лимфоцитов на несколько разновидностей хелперных Т-клеток (т.е. клеток-помощников), способствующих реализации разных форм иммунного ответа. При этом различные исполнительные клетки (В-лимфоциты, разновидности Т-клеток) тоже распознают антиген, а затем получают дополнительный стимул (через межклеточные контакты или цитокины) от Т-хелперов.

Ответ на внеклеточные патогены реализуется с помощью антител, секретируемых потомками В-лимфоцитов — плазматическими клетками. Антитела представляют собой растворимые антигенраспознающие рецепторы В-лимфоцитов. Они связываются с антигенами, непосредственно блокируя их и нейтрализуя их активность, или привлекают к патогену факторы врожденного иммунитета — комплемент или фагоциты (обычно макрофаги), которые вызывают гибель и расщепление микроорганизма. Разрушение внутриклеточных патогенов, находящихся в гранулах фагоцитирующих клеток и устойчивых к их бактерицидным факторам, происходит благодаря усилению бактерицидной активности фагоцитов под влиянием Т-хелперов и выделяемых ими цитокинов (IFN $\gamma$  и другие). Против вирусов и внутриклеточных патогенов, обитающих в цитозоле клеток, направлена активность цитотоксических Т-лимфоцитов, действующих подобно естественным киллерам, но специфично в отношении антигенов. Цитотоксические Т-лимфоциты убивают инфицированные клетки.

По мере выполнения иммунным ответом задачи по удалению патогена включаются механизмы его ограничения — гуморальные и клеточные (регуляторные Т-клетки).

В ходе иммунного ответа на первое поступление антигена развиваются клетки памяти Т- и В-типов, которые обуславливают значительное ускорение развития и повышение эффективности иммунного ответа при повторном поступлении того же антигена. Основной фактор усиления вторичного ответа по сравнению с первичным — существенное облегчение процесса презентации антигена: презентацию может осуществить любая клетка, обладающая свойствами АПК, в любом месте организма. Формирование иммунологической памяти к антигенам возбудителей — основа протективного иммунитета.

Адаптивный иммунитет неотделим от врожденного — он не может быть запущен без предварительной стимуляции через рецепторы врожденного иммунитета. С другой стороны, используя основные эффекторные механизмы врожденного иммунитета, адаптивный иммунитет придает им высокую избирательность и значительно повышает эффективность.

## Глава 4

### Иммунитет в защите и повреждении организма. Патология иммунитета

#### 4.1. ЗАЩИТНЫЕ ФУНКЦИИ ИММУНИТЕТА

Главное назначение иммунитета и эволюционное оправдание его возникновения — защита организма от биологической агрессии, осуществляемой в двух основных формах — внешней (инфекции) и внутренней (опухоли).

##### 4.1.1. Противоинфекционный иммунитет

Защита от инфекций — основное предназначение иммунитета. Первоначально иммунитет определяли как устойчивость к инфекционным заболеваниям. С разработки методов вакцинации, т.е. создания искусственного иммунитета началось развитие иммунологии, причем не только в донаучной, эмпирической форме, но и в форме самостоятельной науки. До сих пор усилия исследователей в области прикладной иммунологии направлены в первую очередь на разработку и совершенствование методов иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных заболеваний.

##### 4.1.1.1. Инфекционные агенты как иммуногены. Запуск противоинфекционного иммунитета

Основы фундаментальной иммунологии создавались на базе экспериментальных исследований с использованием модельных систем, которые не всегда можно отождествить с естественными процессами, происходящими при инфицировании организмов. Поэтому имеет смысл соотнести все общие закономерности иммунитета с их конкретными проявлениями при инфекционных заболеваниях. Начать следует с событий, связанных с запуском реакций иммунитета при инфекционных процессах.

##### *Пути поступления и распространения в организме инфекционных агентов*

Пути проникновения инфекционных агентов определяют не только локализацию патологического процесса, но и особенности иммунной защиты. В подавляющем большинстве случаев инфекционные агенты попадают в организм через слизистые оболочки в трех основных трактах — дыхательном, пищеварительном и урогенитальном. В связи с этим наиболее ранние иммунологические события при инфекционных процессах связаны с иммунной системой слизистых оболочек (см. 3.4.2.3). На ранних этапах инфекции реакцию слизистых оболочек опосредует вовлечение клеток и гуморальных факторов врожденного иммунитета.

Дальнейшие процессы могут ограничиться органами, в которые проник инфекционный агент, особенно когда последний обладает тропностью к клеткам определенных типов, что особенно характерно для

внутриклеточных патогенов. Однако чаще инфекционный фактор имеет склонность к распространению лимфогенным или гематогенным путями. Лимфогенным путем он попадает в региональные лимфатические узлы, которые становятся очередной (после места проникновения) площадкой для реализации иммунной защиты. В лимфатических узлах к факторам врожденного иммунитета подключаются клетки и гуморальные факторы адаптивного иммунитета, инициируемого на этом этапе процесса. Преодоление данного барьера приводит к генерализации инфекционного заболевания, а вслед за этим — к распространению иммунных процессов на системный уровень, что не всегда приводит к адекватному результату и граничит с состоянием патологии, обусловленной повреждающим действием не только инфекционных агентов, но и самих факторов иммунитета.

***Значение для иммунных процессов локализации инфекционных агентов вне или внутри клетки***

Как было показано выше (см. раздел 3.6), в зависимости от локализации патогена адекватными (т.е. эффективными) являются различные механизмы иммунной защиты (табл. 4.1). Внеклеточные патогены могут быть нейтрализованы антителами, с помощью которых к ним могут быть привлечены эффекторный факторы врожденного иммунитета. Патогены, локализующиеся в гранулах, могут быть уничтожены факторами врожденного иммунитета (бактерицидные компоненты фагоцитов), стимулированными Т-лимфоцитами и их цитокинами. Патогены, интегрированные в геном или локализованные в цитозоле, уничтожаются вместе с инфицированной клеткой цитотоксическими лимфоцитами — естественными (NK) или адаптивными (Т). Наконец, особые (пока недостаточно полно охарактеризованные) способы защиты адресованы внеклеточным патогенам, локализующимся на поверхности слизистых оболочек.

**Таблица 4.1.** Локализация патогенов и эффективные пути иммунной защиты

Локализация патогенов	Примеры	Антигенпрезентирующие клетки	Т-хелперы, ключевые цитокины	Эффекторные механизмы и факторы
Внеклеточная (внутри организма)	Все патогены (бактерии, вирусы, грибы, простейшие) проходят фазу внеклеточного существования; для многих это основное место обитания	Макрофаги, В-клетки, дендритные клетки	Th2 (IL-4)	Фагоцитоз, антитела, комплемент
Внеклеточная (на поверхности слизистых оболочек)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , гельминты	В-клетки, тучные и дендритные клетки	Th2 (IL-5, IL-4)	Антитела классов IgE, IgA, тучные клетки, эозинофилы, макрофаги

Окончание табл. 4.1

Локализация патогенов	Примеры	Антигенпрезентирующие клетки	Т-хелперы, ключевые цитокины	Эффекторны механизмы и факторы
Внутриклеточная (в ядре, цитозоле)	Вирусы, хламидии, риккетсии, листерии, простейшие	Дендритные клетки	Th1 (IL-2)	Цитотоксические Т-лимфоциты, NK-клетки
Внутриклеточная (в гранулах)	Микобактерии, лейшмании, легионеллы, трипаносомы, криптококки, гистоплазмы, <i>Yersinia pestis</i>	Дендритные клетки, макрофаги	Th1 (IL-12, IFN $\gamma$ )	Макрофаги, CD4 <sup>+</sup> Т-клетки

Яркое проявление адаптации системы иммунитета к взаимодействию с патогенным окружением — осуществление адекватного выбора пути ответа уже на этапе распознавания антигена. Этот выбор осуществляют клетки инициаторы иммунного ответа — дендритная клетка и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцит. Дендритная клетка выбирает различные пути презентации антигена (в составе молекул МНС I или II класса), что диктуется вне- или внутриклеточной локализацией возбудителя. Кроме того, дендритная клетка генерирует различные сигналы в зависимости от химической природы и физико-химических характеристик его «опознавательных» молекул. CD4<sup>+</sup> Т-клетка, в зависимости от сигналов, поступающих через TCR и костимулирующие молекулы от дендритной клетки, делает выбор между несколькими альтернативными вариантами дифференцировки Т-хелперов, которые обеспечивают развитие адекватной формы ответа. Механизмы, с участием которых реализуется влияние патогенов на выбор иммунными путями иммунного ответа, пока неясны. Полное и точное знание таких механизмов необходимо для создания вакцинных препаратов, которые включали бы «правильное направление» ответа и обладали в связи с этим максимальной протективной эффективностью. Ошибки при выборе пути дифференцировки чреваты неблагоприятным исходом заболевания. Классический пример — зависимость успешности иммунной защиты мышей разных линий при инфицировании лейшманиями от избираемого пути дифференцировки Т-хелперов (см. раздел 3.5.3.1). В этом примере выбор адекватной формы иммунного ответа определяется генетическими особенностями организма хозяина.

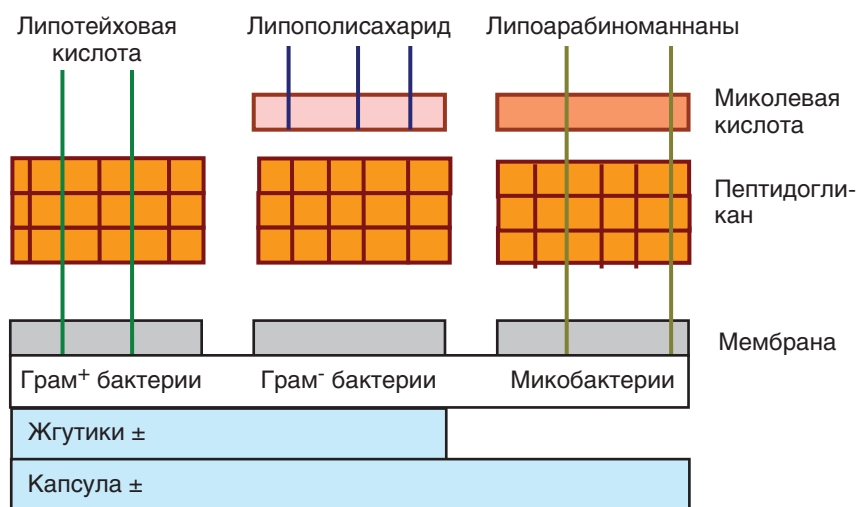
Аналогичные, хотя и менее четкие примеры могут быть найдены в патологии человека. Так, установлено, что характер течения лепры зависит от генетически детерминированного выбора Th1- или Th2-зависимого пути иммунной защиты от микобактерий. Адекватный механизм защиты от *M. leprae* — развитие Th1-зависимого клеточного иммунного ответа воспалительного типа. При выборе этой формы иммунного ответа развивается туберкулоидная форма проказы — относительно мягко текущая и поддающаяся медикаментозному контролю. При развитии альтернативной формы защиты — Th2-зависимого гуморального иммунного ответа — развивается лепроматозная форма проказы — тяжелое неизлечимое заболевание.

***Поверхностные структуры микроорганизмов и их взаимодействие с рецепторами клеток иммунной системы***

Антигены микроорганизмов изучены достаточно полно. Их описание содержится в курсах микробиологии. Мы остановимся только на некоторых особенностях этих антигенов, важных для развития противоинфекционной иммунной защиты.

Антигенная структура бактерий определяется главным образом особенностями строения их клеточной стенки. Структура клеточных стенок различных бактерий представлена на рис. 4.1. Основу клеточной стенки всех микроорганизмов составляют пептидогликаны, в состав которых входят остатки мураминовой кислоты и пептидные компоненты. У грамположительных бактерий мурамилпептиды являются поверхностными структурами. На поверхности грамотрицательных бактерий поверх мурамилпептидов локализуется липидный бислой, в составе которого присутствуют ЛПС, играющие роль эндотоксинов. Основа ЛПС — полисахарид, соединенный с короткими группами липида А, обуславливающего токсичность ЛПС. С ним связано также большинство проявлений биологической активности ЛПС. Поверхность микобактерий имеет дополнительные компоненты в виде гликолипидов, миколовой кислоты, липоарабиноманнана и т.д. Своими особенностями отличаются структуры поверхностей грибов, простейших, риккетсий и других микроорганизмов, выступающих в качестве патогенов.

Главная особенность, характерная для многих молекул поверхности патогенных микроорганизмов, — способность взаимодействовать с мембранными структурами клеток иммунной системы, относимыми к группе патогенраспознающих рецепторов, в первую очередь — с мембранными структурами TLR. То есть поверхностные молекулы патогенов выступают в качестве



**Рис. 4.1.** Структура клеточной стенки бактерий различных групп. Отражено слоистое строение клеточной стенки бактерий, различное у грамположительных, грамотрицательных бактерий и микобактерий (модифицировано по А. Ройту)

«образов патогенности» — РАР. Таким образом, химические особенности поверхности патогенов определяют реакцию на них клеток врожденного иммунитета (в первую очередь миелоидных клеток, участвующих в запуске воспалительной реакции и обладающих фагоцитарной активностью — нейтрофилов, моноцитов, макрофагов). К той же группе относят дендритные клетки, которые не только вносят прямой вклад во врожденный иммунитет, но и отвечают за включение адаптивного иммунитета. Свойствами РАР обладают и некоторые молекулы, расположенные в более глубоких слоях клеточной стенки (в частности, пептидогликаны, которые экспонированы на поверхности только грамположительных бактерий). Однако рецепторы к таким РАР локализованы не на поверхности клеток иммунной системы, а внутриклеточно. Так, внутриклеточные NOD-рецепторы распознают пептидогликаны, а TLR-9, локализующиеся в цитоплазматических гранулах, — CpG-последовательности бактериальной ДНК.

Классические клетки адаптивного иммунитета, лимфоциты, особенно в активированном состоянии, также несут TLR и некоторые другие патогенраспознающие рецепторы. Однако характер их реакции на РАР изучен плохо. Возможность ответа лимфоцитов на РАР указывает на относительность разделения иммунитета на врожденный и адаптивный. Во всяком случае, клетки адаптивного иммунитета сохраняют многие свойства клеток врожденного иммунитета, в частности, способность распознавать РАР и реагировать на них.

Позже в эволюции на первый план выходит распознавание рецепторами лимфоидных клеток чужеродных молекул микроорганизмов в качестве антигенов. При этом значительная часть микробных антигенов относится к категории тимуснезависимых, т.е. не требует обязательного участия Т-клеток для запуска и «усовершенствования» гуморального иммунного ответа. Одни Т-независимые антигены (например, ЛПС) являются митогенами для В-клеток, т.е. относятся к ТН-антигенам I рода. Другие (например, бактериальные полисахариды) обеспечивают активацию В-клетки через кластеризацию BCR, т.е. относятся к ТН-антигенам II рода. В обоих случаях отсутствие участия Т-клеток в формировании ответа ограничивает его возможности — среди антител преобладают молекулы класса IgM, сродство которых к антигенным эпитопам невелико; вторичный ответ отсутствует или выражен слабо. Однако у Т-независимого ответа есть и преимущество — он развивается намного быстрее Т-зависимого. Поэтому он приемлем как реакция (пусть не очень совершенная), обеспечивающая защиту в период до формирования сильного Т-зависимого адаптивного иммунного ответа. Напомним также, что гуморальный иммунный ответ актуален преимущественно для внеклеточных патогенов, а также для защиты от экзотоксинов. Однако подавляющее большинство патогенов имеет внеклеточную фазу существования, во время которой они доступны для воздействия антител. О природе антигенов и эпитопов, индуцирующих Т-клеточный иммунный ответ, известно меньше. Существенно, что распознавание образов патогенности TLR является фактором, благоприятствующим активации Th1-лимфоцитов и развитию клеточного иммунного ответа.

Антигенная структура вирусов схематично изображена на рис. 4.2. Вирусы состоят из нуклеокапсида, в котором расположен нуклеопротеид, включающий одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты, связанных с

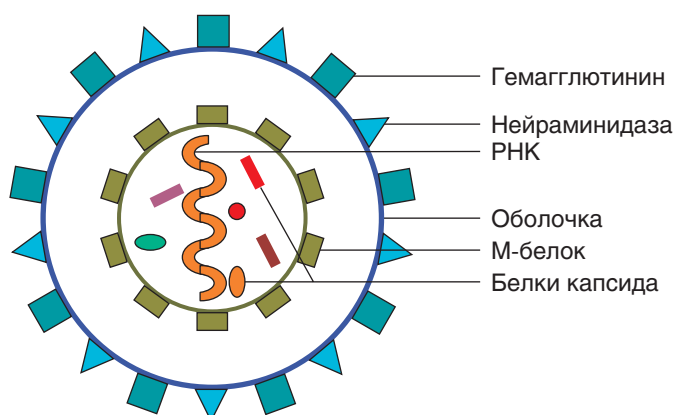


Рис. 4.2. Схема строения вируса гриппа

несколькими белками-ферментами, контролирующими процессы репликации (обратной транскриптазой и др.), а также другие белки (интегразы, полимеразы и др.). Нуклеокапсид имеет оболочку, в состав которой входит белок М. Иногда оболочку капсида «усиливают» липиды. Оболочка вируса содержит повторяющиеся белковые комплексы, предназначенные, с одной стороны, для защиты нуклеоида от действия нуклеаз, а с другой — для взаимодействия вируса с клетками организма-хозяина.

Запуск иммунных процессов, связанных с активацией врожденного иммунитета, зависит главным образом от распознавания вирусных нуклеиновых кислот (в случае ретровирусов — двуспиральной РНК) патогенраспознающими рецепторами, локализованными не на поверхности, а в цитоплазматических гранулах клеток врожденного иммунитета (TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9). Оболочка вирусов содержит белки, распознаваемые в большей степени В-клетками и продуцируемыми ими антителами. В вирусе гриппа это гемагглютинин и нейраминидаза. Серотип вируса, определяющий специфичность образуемых антител, выражают формулой, содержащей обозначения типа этих молекул (например, H2N5).

Таким образом, патогены содержат ряд веществ, распознаваемых рецепторами врожденного и адаптивного иммунитета и обуславливающих мобилизацию механизмов естественного иммунитета, активацию лимфоцитов и их подготовку к участию в адаптивном иммунном ответе.

Важное свойство антигенных молекул патогенов состоит в их вариабельности (табл. 4.2), формируемой за счет мутационного процесса, расширяющего приспособительные возможности микроорганизмов (в том числе способность избегать негативного влияния факторов иммунной защиты в организме хозяина). Особенно высокий полиморфизм характерен для вирусов. Вариабельность некоторых их антигенов (гемагглютинин вируса гриппа, антигены оболочки ВИЧ) делает практически невозможным формирование защитного иммунитета и очень затрудняет предупреждение заболеваний с помощью вакцинации. Существует корреляция изменчивости антигенов и их роли в создании протективного иммунитета. Так, в случае гриппа оба эти свойства максимально выражены у поверхностного

белка гемагглютинаина; существенно слабее — у другого поверхностного белка — нейраминидазы и отсутствуют у стабильного матриксного белка М. Вариабельность такого рода проявляется в изменении антигенного спектра вируса гриппа от эпидемии к эпидемии. Анализ типов гемагглютининов и нейраминидазы у вирусов, вызывавших эпидемии гриппа на протяжении 100 лет, показал, что эти типы постоянно изменяются: для гемагглютинаина от одной эпидемии к следующей, для нейраминидазы — через 2–3 эпидемии. При этом спустя некоторое время (3–5 эпидемий) может наблюдаться возвращение ранее уже зарегистрированного серотипа.

**Таблица 4.2.** Типы вариабельности микроорганизмов и противоинфекционный иммунитет

Тип вариабельности	Результат вариабельности	Последствия для иммунной защиты	Примеры
Мутационный процесс внутри вида	Различные серологические варианты (типы, субтипы)	К каждому варианту формируется специфический механизм защиты	Серотипы стрептококков, микроорганизмов кишечной группы и т.д.
Антигенный дрейф (следствие серии точечных мутаций)	Постоянно накапливающиеся изменения протективных антигенов	Сформировавшийся протективный механизм срабатывает только частично; он не распространяется на конечные продукты изменчивости	Изменчивость вируса гриппа по гемагглютину
Антигенный сдвиг (следствие обмена генетическим материалом между различными линиями микроорганизмов)	Скачкообразно проявляющиеся изменения специфичности протективных антигенов	Сформировавшийся протективный иммунитет не распространяется на измененные варианты	Изменчивость вируса гриппа по гемагглютину
Смена вариантспецифических антигенов	Поочередная экспрессия продуктов различных генов вариантспецифической серии	В ходе заболевания патоген повторно выходит из-под контроля формирующихся иммунных механизмов, что определяет его ремиттирующее течение	Сонная болезнь, вызываемая <i>Trypanosoma brucei</i>

Антигенные свойства микробных антигенов могут изменяться даже в течение одной эпидемии, что приводит к развитию повторных заболеваний. Известно 2 основных механизма подобной изменчивости — дрейф (*drift*) и сдвиг (*shift*). Первый механизм — результат точечных мутаций в генах, коди-

рующих антиген, а второй — следствие обмена участков хромосомы между вирусами в организме промежуточного хозяина.

Еще один вариант изменчивости антигенной структуры патогенов представляют ситуации, когда специфичность антигена возбудителя изменяется в конкретном инфицированном макроорганизме. Это приводит к активации заболевания после его временного ослабления, а при повторяемости подобных изменений — к ремитирующему течению болезни. Такие явления могут возникать вследствие мутаций соответствующих генов возбудителя или смены генов, кодирующих антиген. Последняя ситуация характерна для трипаномы, вызывающей сонную болезнь (*Trypanosoma brucei*). Трипаномы имеют около 1000 генов (10% генома), кодирующих маркерный антиген — вариантспецифический гликопротеин. В течение заболевания происходит поочередная индукция разных генов этой группы по мере накопления антител к гликопротеину предшествующего типа.

#### ***Факторы патогенов, модифицирующие активность иммунной системы хозяина***

Эволюция патогенов происходит параллельно и в прямой связи с эволюцией высших животных, служащих для них хозяевами. При этом микроорганизмы эволюционируют быстрее и лучше приспосабливаются к хозяину, в том числе к особенностям его иммунной системы. В связи с этим у бактерий и вирусов сформировалось множество механизмов, позволяющих блокировать или ослаблять действие иммунной системы или обходить ее эффекторные механизмы. Если РАР и антигены возбудителей непосредственно запускают соответственно врожденную и адаптивную ветви иммунитета, направленные на защиту от патогенов, то другие их макромолекулы модулируют протективные реакции иммунитета, ослабляя их эффективность или полностью блокируя их. Рассмотрим некоторые группы иммуномодулирующих факторов патогенов.

#### ***Суперантигены и В-клеточные митогены***

Поликлональный ответ лимфоцитов нельзя рассматривать как адаптивную реакцию, поскольку специфичность образующихся факторов (антител или эффекторных клеток) не связана с распознаванием патогенов и их продуктов. Фактически эта реакция не специфична. Этим обусловлена непродуктивность поликлонального ответа Т-лимфоцитов на суперантигены (см. раздел 3.2.2.4). Напомним, что в нее вовлечена большая группа клонов Т-клеток (до 20–30%), содержащих в рецепторе ТСR  $\beta$ -цепи определенных семейств, обладающих сродством к суперантигену, взаимодействующему с боковой поверхностью молекулы МНС. Свойствами суперантигенов обладают многие бактериальные экзотоксины. Помимо поликлональной пролиферации суперантигены вызывают массивный выброс цитокинов активированными Т-клетками. Этот процесс тоже нельзя рассматривать как адекватную форму ответа на патоген. Он может вызвать патологические последствия. Наконец, такая реакция завершается массовым апоптозом Т-клеток, активированных суперантигеном. Это обуславливает потерю Т-клеток при некоторых инфекционных заболеваниях, в том числе вирусных, и может послужить причиной временной иммуносупрессии.

Микроорганизмы часто экспрессируют молекулы, митогенные для В-лимфоцитов. Обычно в низких дозах они выступают в качестве ТН-1-антигенов. Отрицательный эффект подобной реакции состоит в непроизводительных затратах энергии и пластического материала, вовлечении большого числа В-клеток в реакцию, лишенную протективного эффекта, а при ТН-1-ответе — в развитии неадекватного гуморального иммунного ответа, ограниченного вовлечением IgM-антител с низким сродством к антигенам и характеризующегося отсутствием иммунологической памяти.

Нужно отметить, что некоторые молекулы патогенов сочетают в себе свойства РАР, антигенов и митогенов. Наиболее яркий пример — ЛПС. Он взаимодействует с патогенраспознающим рецептором TLR-4/CD14 и активирует клетки врожденного иммунитета, а также через активацию АПК и экспрессию на них костимулирующих молекул, содействует развитию адаптивного иммунного ответа. В высоких дозах ЛПС выступает в качестве митогена, препятствующего нормальному развитию гуморального иммунного ответа, а в малых дозах — как ТН-1-антиген, распознаваемый BCR и запускающий специфический гуморальный ответ, хотя и в малопродуктивной форме.

#### **Факторы, взаимодействующие с иммуноглобулинами**

Некоторые микроорганизмы синтезируют белки, способные взаимодействовать с доменами Fc-конца тяжелой цепи, т.е. обладающие активностью Fc-рецепторов. Из них лучше других изучен белок А клеточной стенки *Staphylococcus aureus* (наиболее богат им штамм Cowan), широко используемый для выделения иммуноглобулинов и с другими исследовательскими целями. Белок А взаимодействует с участками доменов C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3. Он конкурирует с Fcγ-рецепторами за связывание с IgG. По-видимому, основная роль белка А «с точки зрения» стафилококка состоит в ослаблении эффекта опсонизации бактерий IgG-антителами, вследствие конкуренции этих молекул с Fcγ-рецепторами. Кроме белка А известны другие белки, конкурирующие с иммуноглобулинами (белок G и др.).

#### **Факторы, взаимодействующие с цитокинами**

Большая группа факторов, продуцируемых патогенами, особенно вирусами, реализует свое модифицирующее действие на иммунный ответ через взаимодействие с цитокинами или воспроизведение их эффектов. Фактор, синтезируемый вирусом саркомы Шоупа, продуцирует растворимый фактор, связывающий TNFα и препятствующий его взаимодействию с рецепторами и, следовательно, развитию воспалительной реакции. Вирус осповакцины вырабатывает ингибитор сериновой протеазы ICA, необходимой, с одной стороны, для образования зрелой формы IL-1β, с другой — для реализации апоптоза. Вирус Эпштейна–Барр секретирует белок — продукт гена *DCRF1*, гомологичный IL-10 и воспроизводящий его эффекты, в частности, подавление секреции некоторых цитокинов и дифференцировки Th1-клеток, а также ориентацию иммунного ответа на гуморальный путь в ущерб клеточноопосредованному, играющему основную роль в защите от вирусов.

***Факторы, связывающие компоненты комплемента***

Вирус простого герпеса связывает C3b, а вирус корьей оспы — C4b, тем самым вмешиваясь в работу системы комплемента, нарушая пути его активации (преимущественно — классический путь).

***Факторы, влияющие на фагоцитоз***

Патогены вырабатывают ингибиторы фагоцитоза, служащие наиболее мощным механизмом антибактериальной защиты. К ингибиторам этой группы относят прежде всего компоненты капсулы микроорганизмов (например, гиалуроновую кислоту грамположительных бактерий, белки шипов нейссерий или фимбрий стрептококков). Микобактерии, напротив, экспрессируют на поверхности белок, связывающий фибронектин, выступающий в качестве опсонина (поскольку распознается  $\beta_1$ -интегринами поверхности фагоцитов). С другой стороны, микобактерии содержат внутриклеточные факторы, препятствующие слиянию фагосом с лизосомами, что необходимо для разрушения и переваривания содержимого фагосом. Таким образом микобактерия, благодаря опсонизации фибронектином «уходит» из опасной межклеточной зоны во внутриклеточное пространство фагоцитов, в котором она сохраняет жизнеспособность и размножается. Только образование оксида азота под действием  $IFN\gamma$  способно преодолеть эти защитные механизмы и вызвать гибель микобактерий.

***Факторы, подавляющие экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости***

Аденовирусы содержат факторы, подавляющие экспрессию молекул МНС-I, вирус кори — молекул МНС-II, цитомегаловирус подавляет экспрессию и тех, и других молекул. В результате происходит ослабление экспрессии антигенных пептидов вирусного происхождения и снижение эффективности презентации антигена Т-клеткам —  $CD8^+$  (при подавлении экспрессии МНС-I) и  $CD4^+$  (при ослаблении экспрессии МНС-II). Особенно существенно ослабление экспрессии МНС-I. Оно имеет и обратную сторону, поскольку создает возможность проявления защитной активности НК-клеток. Некоторые вирусы обладают механизмами, подавляющими захват и обработку гликолипидов и их встраивание в молекулы CD1d. С другой стороны, вирусы могут способствовать усилению экспрессии неpolиморфных молекул HLA-E. Так, цитомегаловирус экспрессирует молекулу, структурно сходную с HLA-E, способную ингибировать активность НК-клеток.

***Факторы, влияющие на экспрессию стрессорных белков***

Вирусы индуцируют стрессорные белки, распознаваемые естественными киллерами и активирующие эти клетки. С другой стороны, вирусы могут препятствовать экспрессии этих белков. Так, цитомегаловирус индуцирует синтез белка UL16, связывающего факторы активации НК-клеток — молекулы MIC и ULBP, что препятствует реализации защитной функции НК-клеток.

Список факторов патогенов, модулирующих защитные иммунные реакции хозяина, может быть значительно расширен. Наличие этих факторов свидетельствует о двустороннем характере взаимодействия патогенов и организма хозяина в процессе иммунного ответа на инфекции.

***Защитный характер иммунного ответа при инфекционных заболеваниях***

Иммунный ответ на инфекционные агенты, как и любой иммунный ответ, складывается из двух основных этапов:

- начального периода, когда реализуется первая линия иммунной защиты и «строится» адаптивный иммунный ответ (индуктивная фаза иммунного ответа);
- эффекторная фаза адаптивного иммунного ответа.

В результате достигается состояние, которое обозначают термином «иммунитет» в узком значении этого слова, подразумевающим состояние реализованной защиты, устойчивости организма к данному инфекционному агенту. Это состояние тоже складывается из двух периодов в зависимости от механизмов обеспечения резистентности:

- период устойчивости, обусловленной присутствием эффекторных факторов защиты, сформировавшихся во время иммунного ответа и сохранивших свою активность;
- период иммунологической памяти, гарантирующей более эффективную защиту при повторном проникновении инфекционного агента, по сравнению с первичной инфекцией.

Из сказанного следует, что при наличии функционально полноценной иммунной системы организм никогда не оказывается без средств защиты от внешней агрессии. Иммунная защита только меняет свои механизмы, что сопровождается ростом специфичности (прицельности) защиты и повышением ее интенсивности. Только в период индуктивной фазы иммунного ответа иммунная защита основывается исключительно на использовании факторов врожденного иммунитета. В последующем происходит подключение факторов адаптивного иммунитета, а период иммунологической памяти полностью основан на механизмах адаптивного иммунитета.

***Реализация первой линии защиты и индукция иммунного ответа***

Сразу после проникновения во внутреннюю среду организма патогены испытывают воздействие факторов иммунной защиты. Сначала действуют механизмы врожденного иммунитета, а также промежуточное звено иммунной системы — «неклассические» субпопуляции лимфоцитов. Распознавание чужеродных молекул (PAMP) — первое событие в запуске иммунного ответа. Следствие этого распознавания, осуществляемого с участием патогенраспознающих рецепторов, в первую очередь мембранных TLR, — активация клеток врожденного иммунитета. В результате активации экспрессируются гены цитокинов и секретируются провоспалительные цитокины, обеспечивающие привлечение в очаг инфицирования лейкоцитов — нейтрофилов, а затем моноцитов и других клеток крови.

Активация местных и пришлых клеток обеспечивает реализацию главной защитной реакции первой линии защиты — фагоцитоза. При фагоцитозе возможно распознавание дополнительных PAMP, не локализованных на поверхности клетки (например, пептидогликанов бактерий, CpG-последовательностей их ДНК и др.), что служит еще одним стимулом к активации клеток. Поглощение патогенов фагоцитами облегчается опсонизацией. В первые дни реакции на микроорганизмы в качестве опсонизирующих факторов выступают белки острой фазы — пентраксины (их образование

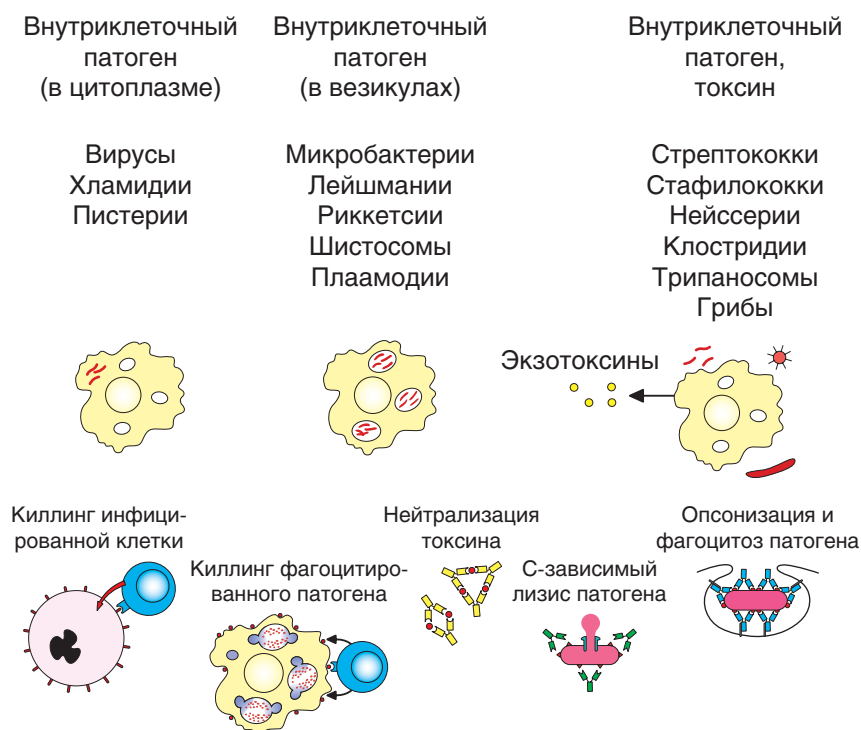
гепатоцитами стимулируют цитокины), а также компоненты комплемента. Первоначально комплемент активируется преимущественно по альтернативному пути. Другой стимул к его активации — естественные IgM-антитела, спонтанно синтезируемые B1-клетками. Уже в этот период вырабатываются некоторые цитокины, стимулирующие фагоцитарную активность: NKT-клетки секретируют  $IFN\gamma$  в самый ранний период реакции на патогены. Плазмоцитоидные дендритные клетки реагируют на распознавание PAMP секрецией  $IFN\alpha$ . Определенный вклад в защиту от патогенов на этом этапе вносят  $\gamma\delta$ T-клетки, однако этот вклад пока точно не расшифрован. К перечисленному следует добавить активность неспецифических бактерицидных факторов (например, дефензинов), вырабатываемых не только миелоидными, но и эпителиальными клетками. Способность эпителиальных и эндотелиальных клеток, активируемых провоспалительными цитокинами, воспроизводить многие эффекты макрофагов делает их дополнительными эффекторными клетками врожденного иммунитета, роль которых особенно велика в период острой фазы реакции на патоген.

Все вышесказанное в большей степени отражает реакцию на внедрение бактерий, грибов, простейших и других относительно крупных одноклеточных патогенов. Инфицирование вирусами, хотя и вызывает воспалительный ответ, протекает с более умеренным вовлечением фагоцитов и других факторов врожденного иммунитета. Тем не менее, фагоцитоз инфицированных клеток чрезвычайно важен, поскольку основные молекулы вирусов, несущие PAMP, распознаются внутриклеточными TLR. Одно из ранних проявлений реакции иммунной системы на вирусы — запуск выработки интерферонов I типа (особенно  $IFN\alpha$  и  $IFN\beta$ ), обладающих противовирусным действием. Основным источником интерферонов — плазмоцитоидные дендритные клетки, дополнительный источник — макрофаги и другие клетки врожденного иммунитета. Главными эффекторами противовирусного иммунитета на этом этапе служат естественные киллеры, активируемые при распознавании стрессорных молекул инфицированных клеток и дополнительно стимулируемые цитокинами, которые секретируют NKT-клетки.

Защитная роль этих процессов очень велика, о чем можно судить по тяжелым последствиям нокаута генов, отвечающих за реализацию функций упомянутых выше клеток врожденного иммунитета. При этом выявляют значительное утяжеление течения инфекционных процессов в первую неделю их развития. Это вполне соответствует представлению о том, что в этот период названные клетки и гуморальные факторы являются единственными защитными механизмами иммунной системы, способными к мобилизации практически немедленно после попадания в организм патогенов.

В этот же период интенсивно происходят процессы, обеспечивающие подготовку следующего этапа иммунной защиты — реализуется индуктивная фаза адаптивного иммунного ответа. В качестве ее инициатора выступают клетки врожденного иммунитета — миелоидные дендритные клетки. Захватив материал, содержащий молекулы патогенов, они транспортируют его в региональные лимфатические узлы, где презентуют T-лимфоцитам —  $CD4^+$  и  $CD8^+$ . Первые служат основными «организаторами» иммунного ответа. В отличие от клеток врожденного иммунитета, вовлекаемых в иммунный ответ тотально, клетки адаптивного иммунитета

(лимфоциты) вступают в него в составе единичных клонов, активация которых осуществляется на основе специфичности их антигенраспознающих рецепторов. Клетки этих клонов активируются, выделяют аутокринный ростовой фактор IL-2. Их численность многократно возрастает, и они дифференцируются в различные разновидности хелперных Т-клеток, которые помогают вовлечению в иммунный процесс остальных лимфоцитов.  $CD8^+$  Т-клетки, получившие стимулирующий сигнал от дендритных клеток и дополнительный стимул от Th1-хелперов, дифференцируются в цитотоксические Т-лимфоциты. Те же Th1-клетки способны оказать помощь макрофагам, существенно усиливая их активность. Наконец, под влиянием антигена активируются клоны В-лимфоцитов. Проходя несколько этапов дифференцировки и отбора при участии Th2-лимфоцитов или особых фолликулярных Т-хелперов, они развиваются в антителопродуцирующие клетки. Так формируется полный набор клеток, участвующих в адаптивном (антигенспецифическом) иммунном ответе. Спектр клеток, вовлекаемых в иммунный ответ, и формирующиеся эффекторные механизмы в очень большой степени определяются локализацией патогена — внутри или вне клеток (рис. 4.3).



**Рис. 4.3.** Локализация патогена определяет тип иммунной защиты. В зависимости от локализации патогена, его эпитопы презентуются в составе молекул МНС-I или МНС-II, что предопределяет дальнейшее вовлечение клеток иммунной системы в иммунный ответ и тип эффекторных реакций, как правило, адекватный для защиты от данного конкретного патогена

Фазу формирования адаптивного ответа обозначают как индуктивную. В это период эффекторная активность факторов адаптивного иммунитета только начинает проявляться (как уже отмечалось, защиту в этот период обеспечивают исключительно факторы врожденного иммунитета).

### *Эффекторная фаза иммунного ответа*

Переход к эффекторной фазе происходит постепенно. Временная граница, отделяющая ее от первой фазы, примерно соответствует концу первой — началу второй недели после инфицирования. В эффекторную фазу иммунного ответа механизмы иммунной защиты состоят из реакций врожденного иммунитета, усиленных факторами адаптивного иммунитета. Собственные эффекторные механизмы адаптивного иммунитета немногочисленны и их вклад в защиту относительно невелик. Он сводится к нейтрализации антителами бактериальных экзотоксинов и прямой блокаде патогенов — подавлению их подвижности и способности преодолевать тканевые барьеры.

Фагоцитоз остается основным механизмом разрушения патогенов бактериальной, грибковой и паразитарной природы. Однако это «форсированный» фагоцитоз, поскольку большинство эффекторных факторов иммунного ответа направлено на его усиление. Так, основная роль Th1-зависимой воспалительной формы иммунного ответа состоит в стимуляции активности макрофагов с помощью костимулирующих сигналов, подаваемых Th1-клетками, и действия  $IFN\gamma$ , секретируемого Т-хелперами. Одна из основных функций антител, секретируемых плазматическими клетками, также состоит в усилении фагоцитоза путем опсонизации патогенов. Для этого необходимо переключение синтеза антител с IgM на IgG. Другое проявление активности антител — активация комплемента, что приводит к опсонизации фагоцитов (C3b-компонентом комплемента) и прямому цитолизу. Эффективность защиты, опосредованной антителами, непрерывно повышается с увеличением сродства антител к антигену, происходящим на протяжении этой фазы иммунного ответа. В качестве главных эффекторов при удалении внутриклеточных патогенов на этом этапе выступают цитотоксические Т-лимфоциты, обладающие, в отличие от естественных киллеров, специфичностью в отношении антигенов вирусов и других внутриклеточных патогенов.

В результате действия факторов адаптивного иммунитета, основанных на усилении механизмов врожденного иммунитета, как правило, происходит разрушение и элиминация патогенов и их продуктов. Однако при преодолении патогенами иммунных барьеров (как местных, так и связанных с лимфатическими узлами) происходит переход иммунных процессов на системный уровень. Этому сопутствует миграция эффекторных Т-клеток в новые места проникновения патогенов. Миграционный аспект адаптивного иммунного ответа особенно важен при инфекционном поражении барьерных тканей и нелимфоидных органов, куда должны мигрировать эффекторные клетки. При поражении слизистых оболочек особое место в защите приобретает гуморальный иммунный ответ с образованием антител класса IgA. Эти антитела в секреторной форме могут проявлять свою активность за пределами внутренней среды организма — в просвете пищеварительного и других трактов. Эта форма защиты может оказаться ведущей при инвазиях гельминтами.

Успешная реализация иммунной защиты приводит к элиминации патогенов. При этом вовлечение в иммунный ответ новых клонов лимфоцитов прекращается. Этому способствует подключение активных механизмов иммунорегуляции: Fc-зависимого подавления гуморального иммунного ответа и проявлению активности регуляторных Т-клеток (как естественных, так и адаптивных), ограничивающих все виды активности лимфоцитов.

Роль сдерживающих факторов весьма велика, поскольку чрезмерное проявление морфогенетических процессов и выделение деструктивных факторов может повредить нормальные ткани. Такие проявления несбалансированной гиперчувствительности возможны при развитии инфекционных заболеваний, возбудители которых с трудом поддаются элиминации (например, туберкулеза). Отрицательные последствия может вызвать также морфогенетическая реакция на персистирующую инфекцию — формирование гранулемы. Однако оно выполняет и защитную функцию, изолируя инфекционный агент, который не удается удалить из организма. Иммунная защита от вирусов также сопряжена с риском повреждения инфицированных органов, например печени. Это «иммунное повреждение», как правило, обусловлено избыточной выработкой цитокинов, выходом в межклеточное пространство содержимого клеток, погибающих по механизму некроза, реакцией иммунной системы на экспрессируемые клетками стрессорные белки и алармины (молекулы, сигнализирующие о повреждении тканей). Еще один вариант патологии, непосредственно связанной с иммунной защитой от инфекций — аутоиммунные процессы, обусловленные перекрестными реакциями лимфоцитов и антител, направленных против патогена, с собственными тканями организма.

При благоприятном течении иммунологических процессов данный этап реакции иммунной системы на инфицирование завершается разрушением и элиминацией патогена и его продуктов. В конце этого периода организм содержит многочисленные эффекторные клетки клонов, специфичных к антигенам возбудителя.

#### 4.1.1.2. Проявления иммунной защиты против основных групп патогенов

##### *Защита против внеклеточных бактерий*

- Независимо от пути поступления в организм, бактерии распознаются TLR макрофагов, тучных, эпителиальных и других клеток. Это приводит к активации этих клеток, секреции провоспалительных цитокинов и формированию воспалительной реакции, сопровождающейся миграцией из сосудов в очаг лейкоцитов, в первую очередь — нейтрофилов.
- Нейтрофилы, а затем макрофаги и другие клетки фагоцитируют и разрушают значительную часть бактерий. При ограниченном количестве патогена иммунная защита успешно реализуется с помощью реакций врожденного иммунитета.
- Независимо от успешности фагоцитоза бактерий в первую линию защиты вовлекаются NKT-клетки (секретируют IFN $\gamma$ ),  $\gamma\delta$ T-клетки (участвуют в бактериолизе с помощью невыясненных механизмов) и др.
- Важнейший фактор ранней защиты против внеклеточных патогенов — естественные антитела, пресинтезированные B1-клетками. Значительная часть этих антител специфична к распространенным

антигенам бактерий — фосфорилхолину, липоплисахариду, пептидогликанам и др. Большинство естественных антител принадлежит к IgM-классу. Связывание этих антител с бактериями обуславливает активацию комплемента по классическому пути, что обеспечивает опсонизацию бактерий (т.е. способствует их фагоцитозу), а иногда (например, в случае нейссерий) вызывает лизис бактерий.

- Внеклеточные микроорганизмы становятся объектом действия других гуморальных факторов врожденного иммунитета — пентраксинов (опсонизируют бактерии и активируют комплемент), дефензинов, секретируемых эпителиальными клетками и фагоцитами. Активация комплемента на их поверхности происходит не только по классическому, но и по альтернативному пути. Можно предполагать, что резервов врожденного иммунитета достаточно для отражения большинства атак внеклеточных бактерий.
- Независимо от эффективности защитной функции врожденного иммунитета при инфицировании бактериями происходит запуск механизмов адаптивного иммунитета. Дендритные клетки захватывают бактерии и их продукты (экзотоксины и др.) и доставляют их в региональный лимфатический узел, где происходит презентация антигенного пептида CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам.
- При ответе на внеклеточные патогены активируются преимущественно Th2-клетки, хотя Th1- и Th17-клетки тоже образуются (последние необходимы для мобилизации нейтрофилов, а Th1-клетки — для обеспечения IFN $\gamma$ -зависимой составляющей гуморального иммунного ответа).
- В очагах поражения и лимфатических узлах В-лимфоциты распознают антигены бактерий, обрабатывают их и презентуют преобразованным специфическим Th2-клеткам. В-клетки получают от Т-хелперов сигнал через костимулирующую молекулу CD40. IL-4, секретируемый Th2-клетками, обеспечивает пролиферацию клона активированных В-лимфоцитов.
- В лимфоидных фолликулах при ключевом участии фолликулярных дендритных клеток происходит морфогенетический процесс, приводящий к формированию зародышевых центров. В них мигрирует большинство стимулированных В-лимфоцитов, а также фолликулярные CXCR5<sup>+</sup> Т-хелперы.
- В зародышевых центрах в процессе пролиферации происходит переключение изотипов BCR и повышение его сродства к антигену благодаря запуску гипермутационного процесса в В-клетках и отбору клонов по сродству к антигену, представленному в составе иммунных комплексов на фолликулярных дендритных клетках.
- В-клетки мигрируют в апикальную зону зародышевых центров, где происходит дифференцировка плазматических (антителообразующих) клеток. Затем плазматические клетки мигрируют в красную пульпу селезенки, мозговые шнуры лимфоузлов и (преимущественно) в костный мозг, где они секретируют антитела. Антитела главным образом класса IgA секретируются также в мукозальном отделе иммунной системы.
- Антитела взаимодействуют с антигенами на поверхности внеклеточных патогенов. Антитела, направленные против жгутиковых антигенов, обездвиживают клетку. IgA-антитела, связывающиеся с бактериями в

просвете кишечника, препятствуют их проникновению через кишечную стенку. Взаимодействуя с токсинами, антитела обычно вызывают их инактивацию. Таким образом, антитела сами по себе могут осуществлять защиту от внеклеточных бактерий и их токсинов.

- Защитный эффект антител реализуется также с участием фагоцитов-макрофагов (эффект опосредования) или комплемента, активируемого по классическому пути (эффекты опсонизации и лизиса).

Таким образом, защита от внеклеточных бактерий и других патогенов реализуется с участием факторов врожденного иммунитета (преимущественно путем фагоцитоза) и гуморальных факторов адаптивного иммунитета — антител, действующих самостоятельно или усиливающих защитные эффекты врожденного иммунитета.

### *Защита от внутриклеточных бактерий*

Этот вариант антибактериальной иммунной защиты рассмотрим на примере иммунной защиты против *Micobacterium tuberculosis*.

- Микобактерии туберкулеза проникают в организм человека через слизистые оболочки. Обычный путь заражения — воздушно-капельный. Развитие заболевания происходит не у всех больных (25–40%), чему способствует разная степень подавления у них клеточного иммунитета.
- Данные об участии факторов первой линии в защите от микобактерий ограничены. Есть сведения об участии в ранних эффекторных реакциях на микобактерии  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов.
- Микобактерии взаимодействуют с макрофагами (при легочном пути заражения — альвеолярными). Содержащиеся в составе клеточной стенки микроорганизмов гликолипиды и липотейхоевая кислота воздействуют на рецептор TLR-2, а ЛПС — на TLR-4. В то же время фактор вирулентности микобактерий липоарабиноманнан (LAM) взаимодействует с концевыми остатками маннозы с формированием комплекса LAM–Man, который посредством фосфатаз подавляет внутриклеточную передачу сигнала, в том числе от TLR.
- Макрофаги фагоцитируют микобактерии, но фагоцитоз оказывается незавершенным, т.е. микобактерии сохраняют жизнеспособность. Причины этого разнообразны. Под влиянием различных сигналов или их дефицита не происходит нормального созревания фагосом и экспрессии факторов (например, EEA1), обуславливающих их слияние с лизосомами. Вследствие нарушения экспрессии V-АТФазы (см. раздел 2.3.5.3) отсутствует закисление содержимого фагосомы (рН 6,0–6,3 вместо 5,0 при нормальном развитии фагоцитоза). В эндосомах не активируются катепсин D и кислые гидролазы. Микобактерии препятствуют кальциевому ответу клетки — повышению концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле. Фактор LAM–Man блокирует активацию липидной киназы PI<sub>3</sub>K. Нарушаются и другие сигнальные пути — в MAP-каскаде страдают ветви, приводящие к образованию факторов ERK1/2 и p38. Таким образом, под влиянием микобактерий нарушается слияние фагосом с лизосомами, развиваются множественные дефекты формирования бактерицидных факторов, блокируются сигнальные пути, приводящие к активации макрофагов.

- Благодаря индукции антиапоптотического фактора Bcl-2 удлиняется срок жизни инфицированных макрофагов, которые превращаются из бактерицидных клеток в резервуары инфекционного агента. Упоминавшиеся выше источники активационных сигналов, не способные вызвать бактериолиз фагоцитированных микроорганизмов, служат при этом источником активации макрофагов. Проявления этой активации носят неадекватный характер и обуславливают нарушения структуры и функций пораженных органов, т.е. служат причиной иммунного повреждения по механизму гиперчувствительности замедленного типа.
- При невозможности развития эффективного Th1-ответа (обычно в результате клеточного иммунодефицита или неадекватной ориентации иммунного ответа на образование Th2-клеток) формируется гранулема (см. раздел 3.6.1.2), назначение которой состоит в ограничении распространения инфекции. В то же время туберкулезная гранулема — одно из проявлений «иммунного повреждения».
- В то же время эндоцитоз микобактерий и их фрагментов дендритными клетками с их последующим транспортом в лимфатические узлы позволяет индуцировать адаптивный иммунный ответ. Эпитопы микобактериальных антигенов презентуются в составе молекул МНС-II CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам. Способность микобактерий активировать дендритные клетки, в том числе через TLR-2 и TLR-4, обуславливает формирование DC1-клеток и секрецию ими IL-12, что предопределяет дифференцировку специфических Th1-лимфоцитов.
- Th1-лимфоциты, специфичные к антигенам микобактерий, взаимодействуют с инфицированными макрофагами, распознавая эпитопы микобактериальных антигенов, презентуемые на молекулах МНС-II. Этому сопутствует взаимодействие костимулирующих молекул — макрофагальной молекулы CD40 и ее лиганда CD154, экспрессируемого Т-лимфоцитом. Это вызывает генерацию активирующего сигнала, направленного в макрофаг. Th1-лимфоциты, реактивируемые через TCR и костимулирующую молекулу CD28, начинают секретировать комплекс цитокинов, в том числе IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ .
- IFN $\gamma$  (самостоятельно и особенно эффективно в сочетании с TNF $\alpha$ ) вызывает экспрессию в макрофагах индуцибельной NO-синтазы, катализирующей образование оксида азота (NO). Взаимодействие оксида азота с супероксидрадикалом приводит к формированию пероксинитрита. Названные факторы способны вызвать гибель микобактерий, персистирующих в фагосомах макрофагов. Это является ключевым событием в осуществлении иммунной защиты организма от микобактерий.
- В ходе иммунного ответа на микобактерии антитела образуются, однако гуморальный ответ при туберкулезной инфекции выражен слабо и лишен протективного значения.
- В ходе туберкулезной инфекции или при вакцинации БЦЖ (вакцинный штамм на основе *Mycobacterium bovis*) формируется иммунологическая память. Однако ее уровень, как правило, невысок.

Описанную схему реакции иммунной системы на микобактериальную инфекцию можно экстраполировать на случаи инфицирования другими

внутриклеточными патогенами, хотя конкретные механизмы развития иммунологических дефектов при разных инфекциях, как правило, различны.

### *Иммунная защита против вирусов*

Для проникновения в клетки вирусы используют в качестве рецепторов их мембранные молекулы. Разные вирусы распознают различные молекулы: вирус Эпштейна–Барр — рецептор для комплемента (CR2) CD21, ВИЧ — CD4 (корцепторы — CXCR4 и CCR5), вирус кори — CD150 и CD46 и т.д.

Инфицирование клетки происходит в несколько этапов:

- присоединение вируса к клетке с помощью рецепторов;
- слияние оболочки вируса с клеточной мембраной, в результате чего содержимое вирусной частицы проникает в клетку;
- транскрипцию вирусной нуклеиновой кислоты (прямую и обратную);
- интеграцию в геном с участием специализированного фермента интегразы.

После этого с вирусной ДНК транслируется информация и происходит синтез вирусных белков. Эти белки поступают в цитозоль. Часть из них расщепляется в протеосомах. Образованные при этом пептидные фрагменты транспортируются в эндоплазматический ретикулум и встраиваются в молекулы МНС-I. В составе этого комплекса они выносятся на мембрану, где их распознают CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты. При экспрессии всех вирусных белков происходит сборка вирусной частицы и ее отпочковывание от клетки. Выход вирусных частиц может происходить также вследствие реализации цитопатогенного эффекта — разрушения клетки вирусом. При экспрессии вирусных белков на поверхности клетки (во время проникновения в клетку или выхода из нее) их могут распознавать антитела.

Иммунная защита против вирусов состоит из нескольких этапов.

- Инфицированные клетки гибнут вследствие цитопатогенного действия вируса. Их фрагменты поглощаются макрофагами и дендритными клетками (первые поглощают как корпускулярные фрагменты, так и растворимые компоненты, вторые — преимущественно растворимые молекулы).
- Вирусные компоненты, ДНК, одно- и двуспиральная РНК распознаются TLR внутри фаголизосом и сигнализируют о появлении чужеродных агентов — носителей PAMP. Индуцируемые при этом внутриклеточные сигналы приводят к реализации двух главных эффектов — активации (через транскрипционный фактор NF-κB) генов провоспалительных факторов и индукции синтеза интерферонов типа I (α и β).
- Провоспалительные сигналы реализуются особенно интенсивно в макрофагах. Они активируются и инициируют развитие локального воспаления, сопровождающегося секрецией провоспалительных цитокинов.
- Интерфероны типа I наиболее интенсивно синтезируют плазматоцитоподобные дендритные клетки, в меньшей степени — макрофаги. Интерфероны типа I служат факторами противовирусной защиты, вызывая деградацию вирусной РНК и препятствуя репликации вирусов (**защитный фактор I**).
- На поверхности инфицированной клетки экспрессируются стрессорные белки (MICA, MICB, ULBP), сигнализирующие о нарушении физиоло-

гического состояния клетки. Эти белки распознаются активационными молекулами NKG2D. Экспрессирующие эти молекулы NKT-клетки отвечают на распознавание стрессорных белков синтезом  $IFN\gamma$ .

- Через тот же рецептор сигнал о клеточном стрессе воспринимают NK-клетки. При условии, если вирусная инфекция привела к утрате экспрессии молекул МНС класса I, эти клетки активируются. Дополнительным стимулом для NK-клеток служит  $IFN\gamma$ , выделяемый NKT-лимфоцитами. Активированные NK-клетки осуществляют цитоллиз клеток-мишеней, выступая в качестве фактора противовирусной защиты, функционирующего в рамках врожденного иммунитета (**защитный фактор 2**).
- Растворимые компоненты погибших инфицированных клеток, поглощенные миелоидными дендритными клетками путем эндоцитоза, подвергаются процессингу. Пептидные фрагменты белков, в том числе вирусных, встраиваются в состав молекул МНС-I и МНС-II и транспортируются на поверхность дендритной клетки.
- Это позволяет дендритным клеткам презентировать вирусные молекулы клеткам специфических клонов  $CD4^+$  Т-лимфоцитов, распознающих (через TCR) вирусный пептид в составе молекул МНС-II, а также клонам  $CD8^+$  Т-клеток, распознающих вирусный пептид в составе молекул МНС-I. Презентация вирусных антигенов служит пусковым механизмом адаптивного иммунного ответа на эти патогены. При первичном проникновении вируса в организм этот процесс проходит в региональном узле.
- $CD4^+$  Т-клетки, распознавшие антиген, активируются и дифференцируются в Th1- и Th2-клетки. Th1-клетки секретируют цитокины — IL-2 и  $IFN\gamma$ . IL-2 участвует в поддержании пролиферации активированных  $CD8^+$  Т-клеток (см. ниже), а  $IFN\gamma$  активирует естественные киллеры и макрофаги, тем самым усиливая лизис инфицированных клеток и развитие иммунного воспаления. Th2-клетки способствуют развитию гуморального иммунного ответа (см. ниже), стимулируя В-клетки при прямом контакте и с помощью вырабатываемых цитокинов — IL-4 и др. Таким образом, эти лимфоциты выполняют роль хелперных клеток.
- Активированные  $CD8^+$  Т-клетки пролиферируют под влиянием IL-2. Этот цитокин они секретируют сами или получают от Th1-клеток. Пролиферация позволяет увеличить численность клеток в специфических реагирующих клонах до эффективного уровня. Параллельно происходит дифференцировка этих клеток в цитотоксические Т-лимфоциты.
- На поверхности инфицированных клеток пептидные фрагменты вирусных белков появляются в составе молекул МНС-I. Эти пептиды распознаются цитотоксическими Т-лимфоцитами, что приводит к лизису инфицированных клеток. Таким образом, защитный эффект киллеров воспроизводится в антигенспецифическом варианте и при сохранении экспрессии клетками молекул МНС-I (**защитный фактор 3**).
- Свободные вирусные антигены (в составе внеклеточных вирусов или детрита лизированных клеток-мишеней) распознаются рецепторами (BCR) В-лимфоцитов. Под влиянием стимулов со стороны Th2-клеток и секретируемых ими цитокинов В-клетки пролиферируют и дифферен-

цируются в плазматические (антителообразующие) клетки, секретирующие антивирусные антитела.

- Антитела распознают вирусные частицы, находящиеся вне клеток. Связывание нейтрализующих антител с поверхностью свободного вируса предотвращает инфицирование клеток и, возможно, способствует их элиминации макрофагами (**защитный фактор 4**).
- В ходе иммунного ответа формируются Т- и В-клетки памяти, специфичные к вирусным антигенам.
- При повторном инфицировании тем же вирусом активируются клетки памяти, что облегчает запуск адаптивного иммунного ответа (он может происходить на месте внедрения вируса). При этом усиливается формирование специфических Т-киллеров, секреция противовирусных антител и в определенной степени стимулируются активность НК-клеток (через усиление секреции  $IFN\gamma$ ). В результате существенно повышается эффективность большинства факторов противовирусной защиты. Во многих случаях это обеспечивает создание протективного иммунитета — устойчивости к повторному инфицированию вирусом.

Таким образом, иммунная защита против вирусов формируется при участии многих механизмов врожденного и адаптивного иммунитета и реализуется с помощью 4 основных факторов — интерферона типа I, естественных и иммунных киллеров, нейтрализующих антител. Вовлечение адаптивного иммунитета обеспечивает формирование клеток памяти, которые служат основой резистентности к повторному инфицированию вирусами.

#### ***Иммунная защита от простейших***

Антипротозойную защиту можно рассмотреть на примере малярии — наиболее распространенного и одного из самых тяжелых протозойных инфекционных заболеваний. Своеобразие иммунитета при малярии обусловлено особенностями жизненного цикла плазмодиев, сменой экспрессируемых ими антигенов и изменением их локализации.

- Спорозоиты, проникающие в организм с укусом комара, вызывают раннюю реакцию клеток врожденного иммунитета. Реакция обычно недостаточно эффективна, чтобы элиминировать плазмодии. Взаимодействуя с поверхностными молекулами клеток (CD36, ICAM-1, гиалуронатом, хондроитинсульфатом), в том числе эритроцитов, плазмодии проникают в них и размножаются.
- Спорозоиты экспрессируют один из примерно 60 возможных «вариантных антигенов» — VSA (*Variant surface antigen*), против которого с участием дендритных клеток и  $CD4^+$  Т-лимфоцитов развивается В-клеточный иммунный ответ. Образующиеся при этом антитела обеспечивают частичный лизис плазмодиев, что приводит к ремиссии заболевания. Однако после этого взамен прежнего экспрессируется другой VSA, с которым накопленные антитела не взаимодействуют. Происходит новая волна размножения плазмодия с соответствующей клинической картиной и индукцией новых антител, обеспечивающих очередную ремиссию.
- На стадии мерозоита плазмодий экспрессирует новые антигены, из которых наиболее известен MSP-1. Они вызывают развитие (преимущественно в селезенке) иммунного ответа, как гуморального, так и кле-

точного типа. Гуморальный иммунный ответ разворачивается преимущественно в лимфоидных фолликулах селезенки. Т-клеточный ответ формируется в двух основных формах — воспалительной и цитотоксической. Воспалительный иммунный ответ реализуется с участием  $CD4^+$  Т-лимфоцитов и макрофагов в маргинальной зоне и красной пульпе селезенки. Он сопровождается значительной выработкой цитокинов и вносит наиболее существенный вклад в ограничение инфекции на стадии мерозоитов. Цитотоксический иммунный ответ, опосредованный  $CD8^+$  Т-киллерами, развивается в печени и сопровождается значительным повреждением гепатоцитов.

- Тем не менее элиминировать возбудитель иммунная система не в состоянии. Плазмодий на стадии гаметocyта поступает в кровь, а из нее — в организм промежуточного носителя (комара).

Таким образом, при ответе на плазмодий мобилизуются все основные формы иммунной защиты, однако это не приводит к элиминации патогена. Это обусловлено главным образом антигенной изменчивостью и сменой стадий развития паразита, характеризующихся различной локализацией и экспрессируемыми антигенами.

#### ***Иммунная защита против гельминтов***

Эта форма иммунной защиты изучена меньше других.

- Существует два типа локализации гельминтов — в кишечнике, куда они поступают с пищей, и в различных других органах (печени, легких, головном мозгу, стенке сосудов и т.д.), куда они проникают гематогенным путем. Паразиты, локализующиеся в органах, часто окружены гликолипидной или гликопротеиновой оболочкой, формируемой клетками хозяина и защищающей гельминт от действия факторов иммунной системы. В кишечнике роль фактора изоляции играет сама слизистая оболочка.
- Клетки врожденного иммунитета распознают различные компоненты гельминтов (PAMP) — лизофосфатидилсерин (распознается TLR-2), липопротеины, обогащенные фосфорилхолином (распознаются TLR-4) и др.; гликаны, распознаваемые лектиновыми рецепторами, в частности DC-SIGN; протеазы, секретируемые гельминтами; хитин. В качестве распознающих клеток выступают макрофаги, дендритные клетки, энтероциты слизистой оболочки кишечника.
- Активация дендритных клеток приводит к развитию незрелых клеток DC2-типа, способствующих дифференцировке Т-хелперов типа Th2. Th2-ответ — преобладающая форма протективного иммунного ответа против гельминтов.
- Среди цитокинов, секретируемых Th2-клетками при гельминтозах, наиболее важную роль играет IL-4 (обеспечивает переключение изотипов антител на IgE), IL-13 (привлекает эозинофилы и базофилы, обеспечивает морфогенетические перестройки — ремоделирование) и IL-5 (привлекает эозинофилы).
- Важная защитная роль при гельминтозах принадлежит антителам класса IgE. Взаимодействуя с сенсibilизированными тучными клетками, они стимулируют выброс факторов с антигельминтной активностью и

секретируют цитокины, привлекающие базофильные и эозинофильные гранулоциты.

- Эозинофилы и базофилы формируют вал вокруг гельминтов и выделяют молекулы и вещества, оказывающие антигельминтное действие. Наибольшую роль среди них играют белки эозинофилов — МВР (главный щелочной белок) и ЕСР (эозинофильный катионный белок), способные вызвать гибель гельминта.
- Гибель гельминтов в кишечнике сопровождается их эвакуацией из пищеварительного тракта. Гельминты, погибшие в органах, элиминируются клетками мононуклеарной фагоцитирующей системы.
- Против гельминтов формируется относительно слабая и кратковременная иммунологическая память, обычно не гарантирующая развития повторных инвазий. Эффективные антигельминтные вакцины пока не созданы.

#### 4.1.1.3. Протективный иммунитет при инфекционных заболеваниях

##### *Протективный иммунитет и иммунологическая память*

Термин «иммуитет», давший название науке, означает не иммунные процессы, обеспечивающие защиту от чужеродных, особенно инфекционных агентов, а состояние устойчивости к действию этих агентов, не допускающее развития заболевания. Известны 2 разновидности иммунитета к патогенам — естественный и приобретенный. Естественный иммунитет основан на врожденных свойствах организма, прямо не связанных с иммунологическими процессами (поэтому его редко рассматривают с точки зрения иммунологии). К этим свойствам относят: биохимические особенности инфекционного агента и хозяина, делающие невозможным активное существование патогена в организме хозяина; отсутствие у инфекционных агентов рецепторных структур, необходимых для внедрения в макроорганизм и взаимодействия с его тканями; устойчивость организма хозяина к действию факторов патогенности микроорганизмов и т.д. Факторы врожденного иммунитета входят в естественный иммунитет в качестве составляющей, но отнюдь не исчерпывают его.

Приобретенный иммунитет формируется в ходе иммунного ответа. Его основные слагаемые:

- появление в организме факторов (антител, эффекторных клеток), предотвращающих последующее инфицирование;
- ускоренное формирование таких факторов вследствие наличия иммунологической памяти.

То и другое предполагает предварительный контакт организма с антигеном и иммунный ответ на него. Состояние протективного иммунитета соответствует промежутку времени, когда в организме присутствует набор эффекторных факторов, сформировавшихся в результате иммунного ответа. В случае гуморального иммунитета — это антитела. Протективность антител определяется их специфичностью (они должны быть направлены против эпитопов, ассоциированных с детерминантами вирулентности и патогенности микроорганизма) и биологической активностью (способностью нейтрализовать патоген, взаимодействовать с Fc-рецепторами, активировать комплемент и т.д.). Длительность состояния иммунитета ограничена во

времени и определяется продолжительностью жизни эффекторных клеток. В полном объеме протективный иммунитет сохраняется около месяца (см. рис. 1.9). После этого из эффекторных клеток — продуктов иммунного ответа — остаются только долгоживущие антителообразующие клетки, не покидающие своей ниши — костного мозга.

Состояние иммунной защиты после гибели основных эффекторных клеток определяется сохранностью клеток памяти. Срок их жизни, как уже отмечалось, сопоставим с продолжительностью жизни всего организма. В этот период состояние иммунитета в сформированном виде отсутствует, но быстро индуцируется при повторном поступлении возбудителя (см. раздел 3.6.3.3).

Состояние иммунитета и эффективная иммунологическая память могут развиваться не ко всем возбудителям, что может быть обусловлено тремя основными причинами:

- 1) чрезвычайной агрессивностью патогена, устойчивого к факторам врожденного иммунитета, способного подавлять развитие адаптивного иммунитета и/или успевающего наработать факторы патогенности раньше проявления эффективной защиты. Этот вариант выявляют при особоопасных инфекционных заболеваниях (чуме, оспе, холере, сибирской язве);
- 2) чрезвычайно высокой изменчивостью возбудителя, приводящей к тому, что при повторной инфекции в организм попадает патоген, экспрессирующий другие антигены. Именно поэтому эффекторные клетки и клетки памяти не распознают его. Примеры такого рода приводились выше;
- 3) возбудитель несет антигены, не индуцирующие формирование памяти в силу особенностей своего строения, например (как это происходит при некоторых кишечных инфекциях, инфицировании пневмококками), тимуснезависимой природы.

В течение многих веков в человеческой популяции «иммунологический опыт» приобретался в процессе инфекционных заболеваний, особенно в детском возрасте («детские инфекции»). С развитием цивилизации и прогрессом профилактической иммунологии был внедрен (и продолжает внедряться) более контролируемый и безопасный способ индукции иммунологической памяти путем вакцинаций, которые будут рассмотрены в главе, посвященной иммунопрофилактике (см. раздел 4.8.2).

## 4.1.2. Противоопухолевый иммунитет

### 4.1.2.1. Концептуальные аспекты

Идея о том, что опухоли, как потенциальные носители соматических мутаций, должны вызывать иммунную реакцию отторжения, впервые была высказана П. Эрлихом в начале XX века. Эта идея была возрождена на новой теоретической основе Л. Томасом (*L. Thomas*) в конце 1950-х годов и развита в концепцию иммунного надзора Ф.М. Бернетом (*F.M. Burnet*) в 1970 г.

Эта концепция предполагает постоянный надзор со стороны Т-лимфоцитов за антигенным составом собственных клеток организма и элиминацию клеток, подвергшихся трансформации, признаком которой является

появление на поверхности клетки измененных антигенов. Действительно, частота соматических мутаций в организме многоклеточных животных и человека такова, что за сутки должно возникнуть около миллиона мутантных клеток, среди которых значительная часть должна выходить из-под контроля регуляторных систем, т.е. малигнизироваться. Причину несопоставимо более низкой частоты реализации опухолевой трансформации и формирования опухолей последователи концепции иммунного надзора объясняют элиминацией измененных клеток с помощью иммунологических механизмов вследствие экспрессии ими чужеродных, точнее — «измененных своих» молекул. Дальнейшее изучение природы распознавания антигенов Т-клетками способствовало укоренению подобного взгляда («измененное свое» как объект распознавания, осуществляемого Т-клетками). Временная трудность возникла в связи с тем, что у бестимусных мышей *nude*, у которых нарушено развитие Т-лимфоцитов, развитие опухолей не становится более частым. Однако вскоре выяснилось, что противоопухолевая резистентность у этих мышей обусловлена НК-клетками — другим типом клеток, осуществляющих иммунный надзор. В соответствии с данной концепцией на обычный вопрос: «Если существует иммунный надзор, почему же развиваются злокачественные опухоли?», должен следовать ответ: «В отсутствие иммунного надзора их было бы значительно больше». Тем не менее концепция иммунного надзора встречает многочисленные возражения и отнюдь не является общепризнанной, особенно в среде онкологов.

Ни у кого не вызывает сомнений роль иммунологических механизмов в защите от опухолей вирусной природы. Из опухолей человека к ним относят ассоциированный с папилломавирусом рак шейки матки, лимфомы и другие иммунобластные опухоли, вызываемые вирусами (в частности, вирусом Эпштейна—Барр), а также саркома Капоши, вызываемая вирусом герпеса человека — ВГЧ-8. Сторонники концепции иммунного надзора приводят свидетельства более широкой значимости иммунологических механизмов в обеспечении резистентности к опухолям. В качестве доводов они приводят следующие соображения.

- Длительное применение иммунодепрессантов при аллотрансплантации органов повышает частоту развития многих опухолей, в том числе тех, этиология которых не связана с вирусами (меланома, рак почек, толстой кишки, легких, эндокринных органов, мочевого пузыря). Разные авторы регистрировали при этом повышение частоты развития различных опухолей указанной локализации в 3–25 раз.
- При росте злокачественных опухолей регистрируется реакция со стороны иммунной системы. У мышей повторная подсадка сингенной опухоли после хирургического удаления первого трансплантата вызывает реакцию отторжения. У человека при росте опухоли происходит накопление сывороточных антител, а также выявляют клеточные реакции, не приводящие к отторжению.
- Опухоль инфильтрируется лимфоцитами (TIL — *Tumor-infiltrating lymphocytes*), причем интенсивность инфильтрации положительно коррелирует со сроком выживаемости пациентов, являясь независимым прогностическим признаком.

Таким образом, участие иммунной системы в противоопухолевой защите в настоящее время имеет серьезные обоснования. Разногласия относятся лишь к выраженности этого участия и степени протективности иммунной защиты. Никто не сомневается в полезности иммунодиагностики опухолей, но многие проявляют скепсис в отношении перспективности иммунотерапии.

#### 4.1.2.2. Антигены, ассоциированные с опухолями

Первое четкое доказательство существования антигенов, связанных со злокачественными опухолями, было получено отечественным ученым Г.И. Абелевым в начале 60-х годов XX века. Им было установлено, что в сыворотке крови мышей-носителей первичного рака печени появляется  $\alpha$ -фетопротеин — эмбриональный эквивалент сывороточного альбумина. Вскоре Ю.С. Татаринов подтвердил эту закономерность для человека. На выявлении этого белка основан диагностический тест, обладающий высокой информативностью при этой форме рака. Позже были описаны другие антигенные онкомаркеры, как секретируемые и накапливающиеся в сыворотке крови, так и мембранные, связанные с опухолевыми клетками. К сывороточным опухолеассоциированным антигенам относят ракоэмбриональный антиген (накапливается при раке толстой кишки и ряда других локализаций), сывороточный специфический антиген простаты (PSA), хорионический гонадотропин (гормон, в норме продуцируемый в плаценте, но также выявляемый при хориокарциноме, семиноме и других опухолях, происходящих из эмбриональных тканей). Эти и ряд других антигенов используют в иммунодиагностике опухолей. В подавляющем большинстве случаев эти антигены синтезируются вследствие экспрессии в клетках взрослого организма генов, в норме активных только в эмбриональном периоде.

В реализации противоопухолевого иммунитета большой интерес представляют опухолевые трансплантационные антигены. Такие антигены выявляют не на всех опухолях. Наличие опухолевых антигенов на клетках делает их потенциально чувствительными к действию факторов иммунной защиты. Для обозначения таких опухолей введено понятие «иммунозависимые опухоли». К ним относят, помимо вирусных опухолей, меланому, рак почки, молочных желез и т.д. Примером злокачественных опухолей, независимых или слабо зависимых от иммунологических механизмов, могут служить рак желудка, мелкоклеточный рак легких и т.д.

Для выявления опухолевых антигенов используют подходы, основанные на методах молекулярной биологии и иммунологии. Первоначально кандидатные антигены тестировали на способность стимулировать клоны Т-клеток, выделенных из лимфоидных органов носителей опухоли. В настоящее время обычно используют SEREX-технологии (*Serological expression cloning*). В качестве исходного материала используют библиотеки генов, экспрессируемых в опухолях или (чаще) в таких органах, как семенники (в них экспрессируются многие эмбриональные гены). Продукты генов, клонированных из таких библиотек, скринируют на взаимодействие с аутоантителами, присутствующими в сыворотке крови опухоленосителей.

Существует несколько классификаций опухолевых антигенов. Модифицированный вариант распространенной классификации этих антигенов представлен в табл. 4.3. Как видно из представленных данных, боль-

шинство опухолеассоциированных антигенов представляют нормальные продукты генов организма. Все опухолевые антигены — белки, обычно гликозилированные.

**Таблица 4.3.** Классификация и характеристика опухолевых антигенов

Группа антигенов	Индивидуальные антигены	Характеристика
Вирусные	EBNA (EBV), E6, E7 (HPV), HHV-8	Антигены вирусов — возбудителей опухоли
Мутантные (уникальные)	p53, Cdk4, Cas8, $\beta$ -катенин	Продукты мутантных генов, в норме контролирующих апоптоз, клеточный цикл и т.д.
Ракосеменниковые	Серии MAGE (1-12), BAGE, GAGE, NY-ESO-1, SSX2	Антигены, экспрессируемые у эмбрионов и в некоторых органах (гонадах) взрослых
Дифференцировочные	Melan A/VART-1, тирозиназа, gp100, PSA, ANKRD30A/NY-BR-1, GF-AP, TG	Нормальные дифференцировочные антигены
Амплифицированные	HER-2/neu, BIRC, циклины B1 и D1, Bcr/Abl	Нормальные усиленно экспрессируемые антигены
Продукты аномального процессинга	MUC-1 — MUC-7	Нормальные антигены с чрезмерным гликозилированием

Вирусные антигены — продукты вирусных генов, экспрессируемые в инфицированных клетках. Остальные антигены являются обычными («своими») антигенами с измененной экспрессией, количественно превосходящей норму, проявляющейся в необычные временные сроки или в нехарактерном месте. Очень редко антигены бывают уникальны для конкретной опухоли или для конкретного носителя опухоли. Во всех случаях это — продукты мутантных генов, например гена  $\beta$ -катенина. Однако нередко мутация гена связана с происхождением опухолевого антигена более опосредованно. Наиболее известный пример — белок p53, служащий онкосупрессором. Он контролирует нарушения целостности ДНК и сигнализирует о нерепарированных разрывах и других нарушениях, запуская механизм апоптоза. В норме эта молекула практически не выявляется. Примерно в половине опухолей присутствуют мутации гена p53, следствие которых — экспрессия нефункционального белка с более продолжительным сроком жизни. Белок выявляют с разной частотой при различных опухолях (до 20–35%), а в 15–20% в сыворотке регистрируют антитела к нему. При этом специфичность В-эпитопа не связана с мутационным изменением белка, и выявляемые антитела в равной степени реагируют с интактным и мутантным белками.

Распространенный вариант опухолевых антигенов — эмбриональные антигены, т.е. белки, в норме экспрессируемые только (или преимущественно) в эмбриональном периоде. К этой группе относят также онкосе-

менниковые антигены, поскольку некоторые из эмбриональных белков продолжают экспрессироваться в семенниках. Именно поэтому библиотеки генов, экспрессируемых в семенниках, очень часто используют в качестве исходного материала, для отбора генов, кодирующих белки, против которых направлены обнаруживаемые в сыворотках крови раковых больных антитела, или белки, соответствующие теоретически рассчитанным (на основе биоинформационного анализа) критериям. Такой подход позволил идентифицировать больше 40 семейств генов ракосеменниковых антигенов (СТА — *Cancer-testis antigen*), включающих от одного до 12 генов. Первым на этой основе был обнаружен антиген MAGE-1, маркирующий клетки меланомы. MAGE-1 относится к самому большому семейству, содержащему 12 генов (MAGE-1 был идентифицирован с помощью клонирования Т-клеточных эпитопов). В нормальных тканях, помимо семенников, белки группы ракосеменниковых антигенов не выявляют, однако и в опухолевых клетках они экспрессируются достаточно редко — в 5–10%.

Несбалансированное усиление экспрессии (амплификация) характерна для некоторых опухолевых антигенов, например для Her-2/neu — варианта рецептора для эпидермального фактора роста (EGFR2). Выявление этого антигена широко используют для диагностики рака молочной железы и некоторых других опухолей. Гиперэкспрессия характерна для белков BIRC — представителей семейства ингибиторов апоптоза IAP (*Inhibitors of apoptosis*), а также двух циклинов (B1 и D1).

Дифференцировочные антигены являются органоспецифическими антигенами нормальных тканей. При опухолях их экспрессия значительно повышается, что обуславливает нарушение естественной аутоотолерантности. В этом смысле эти антигены близки ракосеменниковым. Иногда иммунный ответ на дифференцировочные антигены становится проявлением аутоиммунного процесса и сопровождается повреждением нормальных тканей и нарушением их функций. Яркий пример этого — паранеопластические неврологические синдромы, обусловленные повреждением нервной системы в результате перекрестного реагирования антител к онко-нervальным антигенам с нормальными клетками. В ряде случаев появление у молекулы свойств опухолевого антигена обусловлено чрезмерным ее гликозилированием. Так происходит с антигенами семейства MUC. Эти белки имеют повторяющиеся домены, содержащие О-гликозильные группы, которые разделены участками, включающими остатки цистеина. В норме эти белки служат рецепторами молекул адгезии. Муцины характерны для карцином кишечника. Они способны индуцировать как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ.

Опухолевые антигены маркируют отнюдь не только конкретные опухоли (это свойственно в большей степени дифференцировочным антигенам). Часто экспрессия этих антигенов свидетельствует о наличии злокачественного процесса как такового. В иммунодиагностике опухолей удобнее выявлять не ассоциированный с опухолевыми клетками антиген, а сывороточные аутоантитела к этим антигенам. Такой подход имеет как преимущества, обусловленные удобством работы с сывороткой и специфичностью метода выявления антител, так и недостатки, главный из которых — относительная редкость выявления антител к конкретному антигену (около 10%

больных данной формой рака). Именно поэтому для диагностики используют панели из нескольких антигенов, что позволяет повысить вероятность выявления опухолеассоциированных антител. Например, для диагностики колоректального рака рекомендуют использовать панель, включающую 13 антигенов, что позволяет повысить чувствительность до 46% (при 3–8% для каждого отдельного антигена, включенного в панель).

Данные об опухолевых антигенах преимущественно относятся к антигенам, распознаваемым антителами (В-антигена), что обусловлено простотой серологических подходов к тестированию антигенов. Эти сведения очень полезны для иммунодиагностики рака. Однако с точки зрения противоопухолевой защиты больший интерес представляют данные об опухолевых антигенах, распознаваемых Т-лимфоцитами (Т-антигенах). Практически всегда молекулы, несущие В-эпитопы, содержат также Т-эпитопы, причем оба типа эпитопов часто перекрываются. Для понимания характера иммунного ответа на опухолевые антигены отметим, что опухоли не содержат РАРР, мобилизующие факторы врожденного иммунитета и способствующие развитию адаптивного иммунного ответа.

Помимо классических антигенов опухоли экспрессируют молекулы МІСА и МІСВ (см. раздел 2.6.3.1) — так называемые стрессорные молекулы, кодируемые генами *МНС* класса I. МІСА и МІСВ по своей третичной структуре сходны с классическими молекулами МНС-I, отличаясь от них отсутствием легкой цепи ( $\beta_2$ -микроглобулина) и желобка для связывания пептида. Молекулы МІСА и МІСВ в норме представлены на некоторых клетках кишечника, а на других клетках экспрессируются в условиях стресса и при инфицировании вирусами. На опухолевых клетках они экспрессируются с достаточно высокой частотой. Эти молекулы распознаются поликлонально естественными киллерами и  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами.

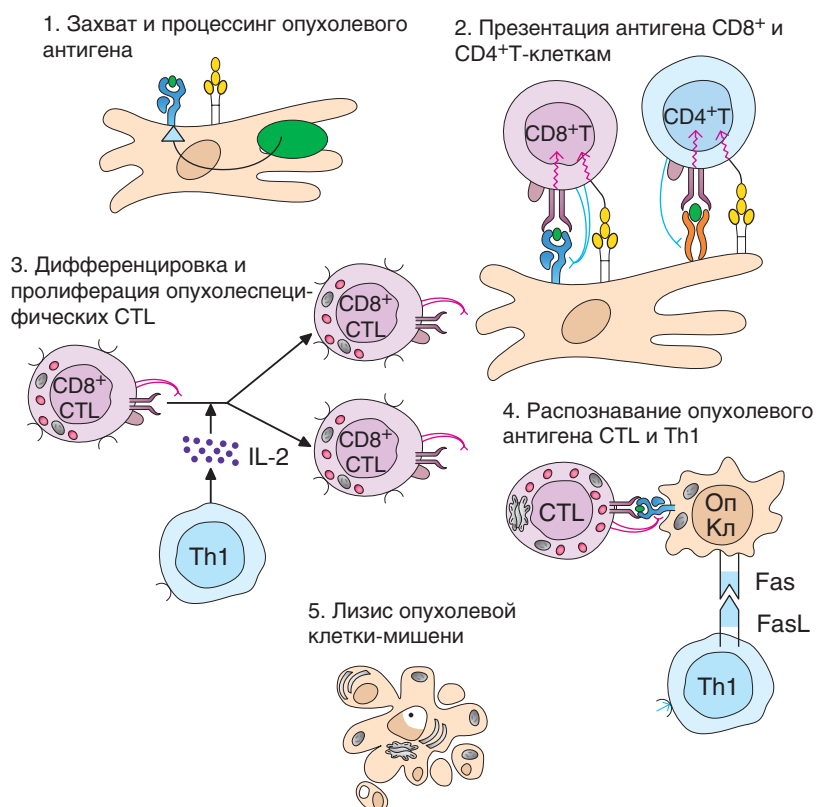
#### 4.1.2.3. Эффекторные механизмы противоопухолевого иммунитета

При рассмотрении противоопухолевого иммунитета следует учитывать «историю» формирования опухоли: между появлением трансформированной клетки и образованием опухоли должно произойти несколько событий, обозначаемых опухолевой прогрессией и знаменующих приобретение клеткой все большей автономии. После этого опухолевые клетки формируют своеобразный орган с собственной стромой и внутренней иерархией клеток. Эти процессы сопровождаются не столько приобретением новых антигенных свойств, сколько антигенным упрощением (уменьшением интенсивности и разнообразия экспрессируемых антигенов). Кроме того, постепенное развитие опухоли способствует формированию иммунологической толерантности организма к неоантигенам. Тем не менее на экспериментальных моделях не только показана возможность развития иммунного ответа на опухолевые антигены, но и детально проанализированы его механизмы.

Одна из современных концепций предлагает трехстадийную динамику иммунологических взаимоотношений между опухолью и организмом. В соответствии с обозначением этих стадий — удаление (*elimination*), равновесие (*equilibrium*) и ускользание (*escape*) — она может быть обозначена как «концепция трех Е». На стадии элиминации срабатывают механизмы иммунологического отторжения чуждых по антигенному составу клеток.

Успешная элиминация трансформированных клеток предотвращает развитие опухоли. Если малигнизировавшая клетка избегает гибели под влиянием эффекторных механизмов иммунитета, наступает длительный период равновесия между сдерживающим влиянием иммунной системы и пролиферативным потенциалом опухолевых клеток. Прогрессирование опухолевого процесса приводит к наступлению последней фазы, когда опухоль полностью выходит из-под контроля иммунных механизмов.

По данным исследований в модельных системах и косвенных свидетельствах, полученных из опыта иммунотерапии опухолей человека, ключевую роль в иммунном повреждении опухолевых клеток играют 2 типа цитотоксических лимфоцитов — естественные киллеры (NK-клетки) и цитотоксические Т-лимфоциты (рис. 4.4). Первые распознают стрессорные молекулы MICA и MICB, экспрессируемые опухолевыми клетками, реагируют поликлонально без предварительной дифференцировки. Вторые образуются в результате достаточно длительного иммунного ответа. Их предшественники ( $CD8^+$  Т-лимфоциты) распознают опухолевые анти-



**Рис. 4.4.** Стадии эффективного иммунного ответа на антигены опухолевой клетки. Показан ход успешного иммунного ответа на опухолевые антигены, возможный на стадии становления опухоли или при использовании эффективного вакцинного препарата

гены, презентруемые дендритными клетками в составе молекул МНС-I; при этом активируются клетки ограниченного числа клонов, в соответствии со специфичностью их TCR. Механизм действия цитотоксических клеток сходен: они используют классический перфорин-гранзимовый механизм контактного цитолиза, а также Fas-зависимую индукцию апоптоза опухолевых клеток (см. разделы 2.4.4.3 и 3.6.5.1). При противоопухолевой иммунной защите большую роль играет индукция апоптоза, опосредованная через взаимодействие молекулы TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) и ее рецептора DR5 (*Death domain 5*). TRAIL спонтанно экспрессируется на NK-клетках, а под влиянием интерферонов I и II типов еще и на моноцитах и дендритных клетках. DR5 экспрессируется на опухолевых клетках. Контактное взаимодействие клеток упомянутых типов с опухолевой клеткой обеспечивает передачу летального сигнала в опухолевую клетку.

В активации CD8<sup>+</sup> Т-клеток и экспансии их клонов принимают участие CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты, а точнее — Th1-клетки. Сами по себе Th1-лимфоциты вносят вклад в защиту, иницируя «иммунное воспаление», сопровождающееся активацией макрофагов, продукты которых способствуют местным нарушениям кровотока и формированию тромбов. Это приводит к нарушению трофики и служит косвенной причиной гибели опухолевых клеток. Четвертая разновидность лимфоцитов, участвующих в иммунной защите от опухолевых клеток —  $\gamma\delta$ Т-клетки. Хотя механизм их противоопухолевого действия не выяснен (вероятнее всего, это прямой цитолиз), факт их участия в противоопухолевой защите подтвержден повышением частоты индукции опухолей у мышей с нокаутом генов  $\gamma$ - или  $\delta$ -цепей TCR (причем оно выражено даже сильнее, чем при выключении генов  $\alpha\beta$ TCR).

Показатель вовлечения Т-лимфоцитов в противоопухолевую защиту — инфильтрация опухоли лимфоидными клетками, называемыми лимфоцитами, инфильтрирующими опухоль — TIL (*Tumor-infiltrating lymphocytes*). Это преимущественно CD8<sup>+</sup> Т-клетки с признаками активации. Однако подавляющее большинство этих клеток функционально инертны, поскольку в них блокирована экспрессия цепей TCR-комплекса — обычно  $\zeta$ -, реже  $\epsilon$ -цепи. После инкубации *in vitro* с цитокинами (IL-2 и другими) экспрессия цепей восстанавливается, и туморинфильтрирующие лимфоциты проявляют высокую противоопухолевую активность. Предполагается также присутствие в окружении опухоли активированной формы естественных киллеров — LAK-клеток, для которых характерна (по данным опытов *in vitro*) не только более высокая активность, но и более широкий спектр клеток-мишеней (см. раздел 2.4.5).

Среди эндогенных противоопухолевых факторов прежде всего следует назвать IFN $\gamma$ . При иммунных процессах его раньше всего продуцируют NKT-клетки, несколько позже — NK- и Th1-клетки. Противоопухолевая активность IFN $\gamma$  имеет множество проявлений. Он подавляет пролиферацию опухолевых клеток (через индукцию белков p21 и p27, ослабляющих экспрессию циклинзависимых киназ — соответственно Cdk2 и Cdk4, обеспечивающих продвижение клеток по циклу. IFN $\gamma$  способствует развитию апоптоза опухолевых клеток, индуцируя экспрессию каспазы 1, а также Fas-рецептора на опухолевых клетках и Fas-лиганда на цитотоксических

Т-лимфоцитах. Этот цитокин индуцирует выработку опухолевыми и стромальными клетками хемокинов CXCL9 (MIG) и CXCL10 (IP-10), которые привлекают в опухоль Т-лимфоциты, экспрессирующие рецептор для этих хемокинов — CXCR3. Кроме того, IFN $\gamma$  подавляет ангиогенез, что влияет на трофику опухоли и усиливает гибель опухолевых клеток по механизму некроза. Наконец, IFN $\gamma$  — мощный активатор макрофагов и индуктор развития Th1-клеток — Т-хелперов, необходимых для развития и усиления противоопухолевого иммунитета.

Иммунная реакция на опухолевые антигены включает также гуморальный иммунный ответ, однако он не имеет протективного характера. Вероятно, это связано с неэффективностью комплемента, компоненты которого разрушаются факторами, представленными на поверхности всех клеток организма, включая опухолевые. Неэффективность Fc-зависимого привлечения макрофагов и других фагоцитирующих клеток связана, по-видимому, со слабым уровнем активации клеток врожденного иммунитета и отсутствием должного провоспалительного фона для развития эффективной защитной реакции. Способность антител блокировать антигены-мишени приводит к защите опухолевой клетки от клеточных эффекторных факторов. Это защитное действие было описано достаточно давно и обозначено термином «эффект усиления опухолевого роста» (*enhancing effect*). Таким образом, антитела к опухолеассоциированным антигенам, образуемые при росте опухолей, в лучшем случае сигнализируют о наличии опухолевого процесса. Как отмечалось выше, антитела к конкретному антигену выявляют в сыворотке больных раком не очень часто (около 10% случаев), но антитела к одному из нескольких опухолеассоциированных антигенов появляются примерно у половины больных, что позволяет успешно использовать их определение с диагностической целью. На основе таких антител разрабатывают иммунотерапевтические препараты — иммунотоксины (см. раздел 4.8.3.2).

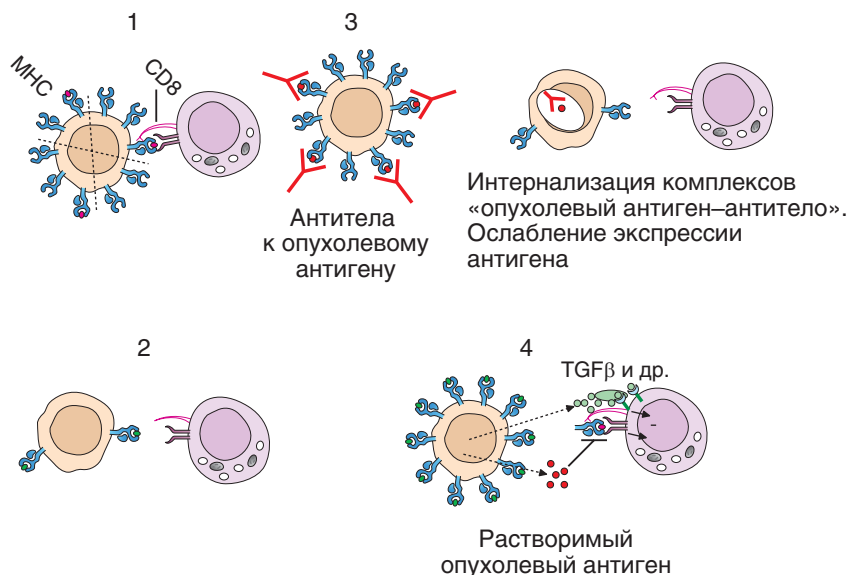
В экспериментах на мышах показано формирование иммунологической памяти при ответе на опухолевые антигены. Наличие Т-клеточной памяти у экспериментальных животных обеспечивает эффективное отторжение повторно трансплантируемой опухоли. Устойчивость к перевивке сингенных опухолей может быть перенесена с Т-клетками интактным реципиентам. При этом активность проявляют как CD8<sup>+</sup>, так и CD4<sup>+</sup> Т-клетки, однако CD8<sup>+</sup> более эффективны. Возможность формирования эффективной противоопухолевой иммунологической памяти вселяет надежды на возможность ее индукции путем вакцинации, реализовать которую пока не удастся (см. раздел 4.8.3.3).

Таким образом, при успешном запуске противоопухолевого иммунного ответа в его осуществление вовлекаются почти все звенья врожденного и адаптивного иммунитета. В то же время основной эффект защитной реакции (гибель опухолевых клеток) реализуют преимущественно киллерные клетки — естественные киллеры и цитотоксические Т-лимфоциты. Иммунные механизмы не способны вызвать отторжение сформировавшейся опухоли. Это обусловлено как их недостаточной эффективностью, так и способностью опухолевых клеток избегать действия эффекторных факторов иммунитета.

#### 4.1.2.4. Механизмы избегания опухолью иммунного надзора

Опухолевые клетки располагают разнообразными механизмами, позволяющими им избежать действия факторов иммунного надзора (рис. 4.5). Некоторые из этих факторов направлены на затруднение распознавания чужеродных компонентов в составе опухоли и запуска иммунных процессов. Другие механизмы препятствуют реализации эффекторных механизмов.

- Опухолевые клетки не экспрессируют РАРР. Это сильно влияет на их иммуногенность, поскольку презентация антигенных эпитопов Т-клеткам осуществляются в этом случае дендритные клетки, не подвергшиеся стимуляции в условиях провоспалительного окружения, индуцируемого РАРР. Такие дендритные клетки слабо экспрессируют костимулирующие молекулы CD80 и CD86, секретируют мало IL-12 и могут вырабатывать IL-10. Как известно, такие условия презентации вызывают скорее развитие анергии, чем активацию Т-клеток. Тем не менее, вероятно под действием кофакторов, Т-клеточный иммунный ответ может запуститься и без влияния РАРР. О том, что это не уникальное явление, свидетельствует факт развития трансплантационного иммунитета — отторжения аллогенных тканей, тоже необъяснимого с рассматриваемой точки зрения



**Рис. 4.5.** Механизмы избегания опухолевой клеткой действия защитных иммунных реакций: 1 — опухолевая клетка экспрессирует специфический эпитоп в большом количестве, что обеспечивает успешную атаку со стороны распознающего его цитотоксического Т-лимфоцита; 2 — опухолеассоциированный эпитоп не экспрессируется опухолевой клеткой, что позволяет ей избежать цитолитического действия Т-киллера; 3 — антитела к опухолевому антигену связываются с ним и интернализуются, что защищает опухолевую клетку от действия цитотоксического Т-лимфоцита; 4 — опухоль выделяет блокирующие факторы — супрессорные цитокины (TGFβ и др.), простагландины, растворимые антигены, которые предотвращают распознавание и цитоллиз опухолевой клетки

(см. раздел 4.2.2). В связи с вышесказанным в большинстве случаев к опухолевым антигенам развивается иммунологическая толерантность.

- Если опухолевая клетка несет на своей поверхности и классические молекулы МНС-I — А, В и С, и неклассические молекул HLA-G или Е, она подвергается цитотоксическому действию  $CD8^+$  Т-клеток, распознающих классические молекулы МНС-I. NK-лимфоциты не могут лизировать такие клетки, так как их активность блокируется молекулами МНС-I (классическими и неклассическими). Если опухолевая клетка утратила все молекулы МНС (что часто происходит в ходе опухолевой прогрессии), но экспрессирует стрессорные молекулы, она становится мишенью естественных киллеров. В этой ситуации цитотоксические Т-лимфоциты не могут распознать клетку, лишенную МНС-I, а следовательно и опухолеспецифического пептида. Однако если опухолевая клетка утратила классические молекулы МНС-I, но сохранила неклассические молекулы, она становится недоступной для действия киллеров — ни естественных (их реакцию блокирована неклассическими МНС-I), ни  $CD8^+$ -Т-клеточных (распознаваемый ими комплекс антигенного пептида с молекулой МНС-I отсутствует). Это позволяет опухоли избежать иммунного надзора.
- Опухолевый антиген, против которого направлены клеточные эффекторный механизмы, может исчезнуть с поверхности клетки в результате мутации или модуляции. Возможность модуляции опухолевых антигенов показана на примере антигена TL, ассоциированного с Т-лимфомой мышей. Введение в культуральную среду антител к этому антигену приводит к его стойкому исчезновению с поверхности клетки. Экспрессия антигена на поверхности восстанавливается только после удаления антител. Предполагают, что этот механизм может срабатывать *in vivo*, хотя его реальную роль в защите опухолевых клеток от эффекторных механизмов оценить затруднительно.
- Опухолевые клетки секретируют растворимые формы антигенов. Они блокируют защитные факторы или подавляют гуморальный иммунный ответ. К блокирующим факторам относят растворимые опухолевые антигены, смываемые с поверхности клетки или активно секретируемые. Роль растворимых антигенов не может быть значительной, поскольку они нейтрализуют антитела (обычно не имеющие протективного значения), но не влияют на клеточный иммунный ответ. То же можно сказать об иммунных комплексах, образуемых растворимыми антигенами с антителами. Через FcR-зависимый механизм эти комплексы подавляют гуморальный иммунный ответ. Блокада гуморального иммунного ответа может иметь значение лишь при лейкозах, поскольку лейкозные клетки более чувствительны к антителам. Возможно, более важна с точки зрения «самозащиты» опухолей способность их клеток секретировать растворимые молекулы стрессорных белков семейства MIC, блокирующие рецепторы NKG2D на поверхности NK-клеток и, тем самым препятствующие их активации. Одновременно может подавляться экспрессия этих рецепторов на опухолевых клетках.
- Опухолевые клетки секретируют супрессорные цитокины — IL-10, TGF $\beta$ , а также простагландин E, подавляющие иммунный ответ,

особенно его воспалительную и цитотоксическую формы. Росту опухоли способствует выработка опухолевыми клетками ростовых факторов (эпидермального, тромбоцитарного, фибробластного), а развитию стромы и улучшению трофики опухоли — выработка сосудистого ростового фактора VEGF (*Vascular endothelium growth factor*). Результатом действия опухолевых клеток, вероятно реализуемого через секретируемые факторы, является упоминавшаяся выше блокада экспрессии  $\zeta$ - и других цепей рецепторного комплекса, что сопровождается утратой функциональной активности туморин-фильтрующих лимфоцитов.

- При росте опухоли активируются регуляторные Т-клетки: естественные, индуцированные (в частности Th3), секретирующие TGF $\beta$  и IL-10, а также регуляторные Т-клетки фенотипа CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup>. Гистологические исследования показывают, что регуляторные Т-клетки сосредотачиваются в окружении опухоли и в региональных лимфатических узлах и напрямую контактируют с дендритными клетками. Регуляторные клетки ослабляют иммунный ответ, действуя на эффекторные Т-лимфоциты (как CD8<sup>+</sup>, так и CD4<sup>+</sup>).

#### 4.1.2.5. Пути активизации противоопухолевой защиты

Из представленных выше данных следует, что при развитии опухолей в случаях наличия в опухолевых клетках субстанций, которые могут выступать в качестве антигенов, включаются иммунные процессы. Их значимость ограничивается рядом факторов, проявляющихся как на этапе запуска иммунного ответа, так и при реализации его конечных эффектов. В соответствии с этим подходы к усилению противоопухолевого иммунитета разрабатывают в двух основных направлениях:

- усиление иммуногенности опухолей;
- усиление эффекторных механизмов противоопухолевого иммунитета.

Целенаправленные поиски способов повышения эффективности противоопухолевого иммунитета начались в 70-е годы прошлого века, когда для лечения опухолей стали использовать адъюванты (усилители иммунного ответа) на основе микобактерий (вакцина БЦЖ), а также *Corinebacterium parvum*. Результаты лечения оказались неоднозначными, однако с современных позиций следует признать, что направление поисков было выбрано правильно, поскольку они были связаны с попытками добавить к действию иммуногена (опухолевые клетки) эффекта РАРР, т.е. сформировать полноценный иммуногенный стимул. Продолжением этого направления в настоящее время стали попытки создания противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток, нагруженных опухолевыми антигенами и получивших стимулы, усиливающие иммуностимулирующую активность этих клеток и ослабляющие их толерогенность. Недостаточная эффективность этих подходов, очевидно, отражает неполноту наших знаний в данной области. Это направление остается основным в разработке методов иммунотерапии рака.

Подходы, направленные на усиление результативности эффекторных механизмов, как правило, связаны с введением в организм больного эффекторных продуктов или факторов, способствующих их образованию.

В настоящее время используются или находятся в процессе разработки следующие подходы к иммунотерапии опухолей:

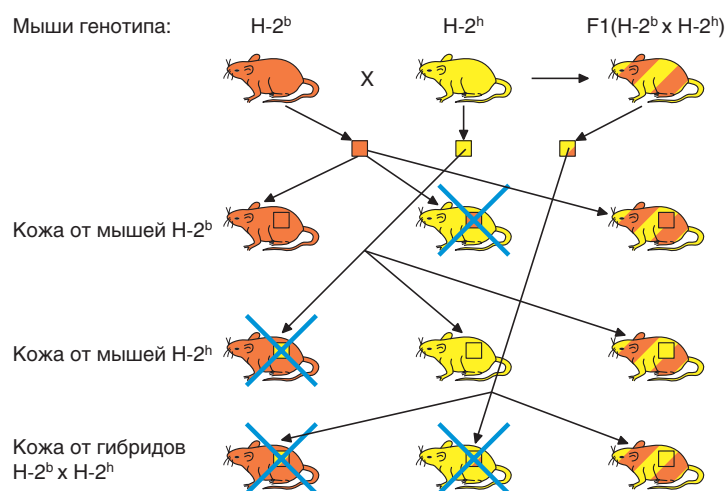
- цитокинотерапия;
- использование препаратов моноклональных антител;
- использование иммунотоксина на основе моноклональных антител;
- иммуноцитотерапия;
- применение лечебных онковакцин.

Подробнее эти подходы будут рассмотрены в разделах 4.8.3.2 и 4.8.3.3.

## 4.2. ИММУНИТЕТ В АЛЛОГЕННЫХ СИСТЕМАХ

Изучение реактивности иммунной системы в условиях тканевой несовместимости стало актуальным в связи с развитием трансплантации тканей. Однако проблема имеет более глубокие корни, уходящие в фундаментальные механизмы вынашивания плода у млекопитающих. В обоих случаях существует необходимость преодоления иммунных реакций, развивающихся в условиях несовместимости, основным предметом теоретического изучения и практической деятельности является проблема контролируемого баланса между иммунным ответом и анергией.

Иммунная природа отторжения чужеродных (прежде всего аллогенных) трансплантатов была доказана в 40-е годы прошлого века П. Медавара (*P. Medawar*), продемонстрировавшим ключевую роль лимфоцитов в реакции отторжения и возможность развития этой реакции по типу вторичного иммунного ответа. Дополнительный довод в пользу клеточной иммунологической природы отторжения аллотрансплантата — опыты Э.Н. Митчисона (*E.N. Mitchison*) по переносу сингенному реципиенту с лимфоцитами состояния сенсibilизации к трансплантату (рис. 4.6).



**Рис. 4.6.** Иллюстрация генетических законов аллотрансплантации. Ткани от генетически однородных мышей приживаются при пересадке сингенным линиям или их гибридам F1 с любой другой линией мышей и отторгаются мышами других линий. Ткани от гибридов F1 приживаются у таких же гибридов, но не у мышей родительских линий

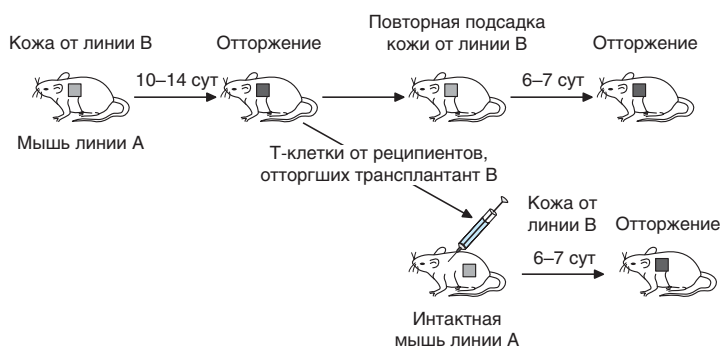
### 4.2.1. Генетика гистосовместимости

Успехи в осуществлении анализа генетических основ тканевой несовместимости и трансплантационного иммунитета были связаны с использованием генетически чистых линий мышей и следовали за достижениями в изучении локусов гистосовместимости, прежде всего МНС (см. раздел 3.2.2.1). Дж. Снелл (*G.D. Snell*) — один из сооткрывателей МНС — сформулировал генетические законы трансплантации. Приведем здесь первые четыре из них, наиболее важные для иммунологии трансплантаций (см. также рис. 4.7):

- сингенные трансплантаты (внутри генетически чистой линии или между однояйцовыми близнецами) приживаются;
- аллогенные трансплантаты (между мышами разных линий) отторгаются;
- трансплантаты от мышей родительской линии приживаются у гибридов первого поколения (F1) с мышами другой линии;
- трансплантаты от гибридов F1 приживаются у F1, но отторгаются у мышей обеих родительских линий.

Законы трансплантации соответствуют представлениям о кодоминантной природе наследования антигенов гистосовместимости, т.е. экспрессии обоих аллелей в условиях гетерозиготности.

Тогда же сложилась современная номенклатура трансплантологии. Ткани от генетически идентичных доноров называют сингенными, от генетически неидентичных доноров того же вида — аллогенными, от представителей другого вида — ксеногенными. Пересадка тканей в пределах одного организма называют ауто трансплантацией, между разными организмами одного вида — аллотрансплантацией, между разными видами — ксенотрансплантацией. Антигены, отражающие генетический полиморфизм внутри вида, обозначают как аллоантигены. Наиболее известные их разновидности — антигены МНС, а также антигены групп крови.



**Рис. 4.7.** Доказательства иммунологической природы отторжения аллотрансплантата: наличие вторичного иммунного ответа и возможность переноса иммунитета с клетками. Два главных доказательства иммунологической (клеточной) природы отторжения аллотрансплантата состоят в возможности индуцировать иммунологическую память и вторичный иммунный ответ и перенести память интактным сингенным реципиентам с лимфоцитами мышей, ранее отторгших ткань того же донора

Известно много (у мышей — 30–40) генетических локусов, обуславливающих тканевую совместимость, или гистосовместимость. Однако с различиями только по одному локусу — МНС (у мышей — H-2, у человека — HLA) связано развитие сильной трансплантационной реакции, релизуемой в пределах двух недель. Наибольшую роль в развитии реакции отторжения играют различия по антигенам МНС-II, вызывающие преимущественно Т-клеточный иммунный ответ. Влияние на судьбу трансплантата определило название данного генетического комплекса как главного локуса гистосовместимости. Этот генетический комплекс детально рассмотрен ранее (см. раздел 3.2.2.1). Отметим, что его открытие и первоначальное изучение было связано именно с анализом генетических основ несовместимости тканей, а не с изучением роли молекул МНС в презентации антигенов Т-клеткам, которая была установлена значительно позже. С этим связано и название локуса, не соответствующее современным представлениям о функциях закодированных в нем молекул, но сохраненное в соответствии со сложившейся традицией.

Различия по другим (слабым) локусам гистосовместимости обуславливают медленное отторжение, растягивающееся на месяцы.

#### 4.2.2. Трансплантационный иммунитет

Рассмотрим феноменологию отторжения аллогенных тканей на примере трансплантатов кожи. После подсадки кожного лоскута происходит его васкуляризация. Этот процесс в основном завершается через 3–4 сут. В случае подсадки органов на сосудистой ножке этот этап отсутствует. Начиная с 5–7-х суток, проявляются признаки иммунной реакции организма — инфильтрация лоскута мононуклеарами, развитие иммунного воспаления.

При различиях между донором и реципиентом по генам МНС отторжение происходит на 10–12-е сутки. Оно проявляется в нарушении питания трансплантата вследствие тромбоза сосудов, некрозе ткани, подсыхании и отделении трансплантата от ложа. При различиях по слабым локусам гистосовместимости реакция развивается медленнее и иногда приобретает хроническую форму с постепенным отмиранием клеток трансплантата и их замещением клетками хозяина в течение нескольких месяцев.

Трансплантационная реакция сочетает некоторые черты цитотоксической и воспалительной форм клеточного иммунного ответа. Она реализуется с участием как  $CD8^+$ , так и  $CD4^+$  Т-лимфоцитов. Первые являются основными эффекторными клетками, ответственными за гибель клеток трансплантата; вторые обеспечивают развитие иммунного воспаления, способствующего гибели пересаженной ткани через нарушение трофики и активацию факторов врожденного иммунитета.

Афферентное звено иммунного ответа на аллотрансплантат состоит из двух параллельных путей, приводящих к активации  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитов. Вовлечение в ответ  $CD4^+$  Т-клеток происходит за счет миграции из трансплантата в региональный лимфатический узел клеток Лангерганса. Известен феномен «клеток-пассажира»: для того, чтобы аллогенный трансплантат был распознан иммунной системой хозяина, в нем должны присутствовать клетки костномозгового происхождения, при искусственном вымывании которых трансплантат утрачивает иммуногенность. Этими клет-

ками являются дендритные клетки, а в случае кожных трансплантатов — их разновидность, клетки Лангерганса.

Показано, что Т-клетки могут распознавать молекулы МНС с помощью двух разных механизмов — прямого и непрямого, опосредованного через презентацию аутологичными АПК (рис. 4.8). В последнем случае презентация реализуется по классическому пути: молекула МНС вместе с другими молекулами аллогенных клеток поступает в дендритные клетки путем эндоцитоза, расщепляется в их эндосомах и включается в состав молекул МНС-II. Такой путь презентации обычно реализуется при активации  $CD4^+$  Т-лимфоцитов. В соответствии с основными закономерностями развития иммунного ответа этот процесс реализуется в региональном лимфатическом узле, в который мигрируют из трансплантата содержащиеся в нем дендритные клетки («клетки-пассажиры»). Вероятно, именно они служат источником донорских молекул МНС.

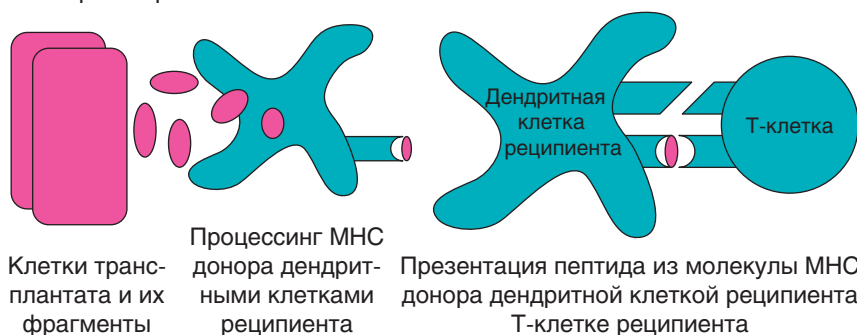
Прямое распознавание МНС-антигенов чаще реализуется при активации  $CD8^+$  Т-клеток. В этом случае TCR непосредственно взаимодействует с аллогенной молекулой МНС. Вероятно, источником антигенного сигнала

#### I. Прямое распознавание



Распознавание Т-клеткой реципиента МНС донора

#### II. Непрямое распознавание



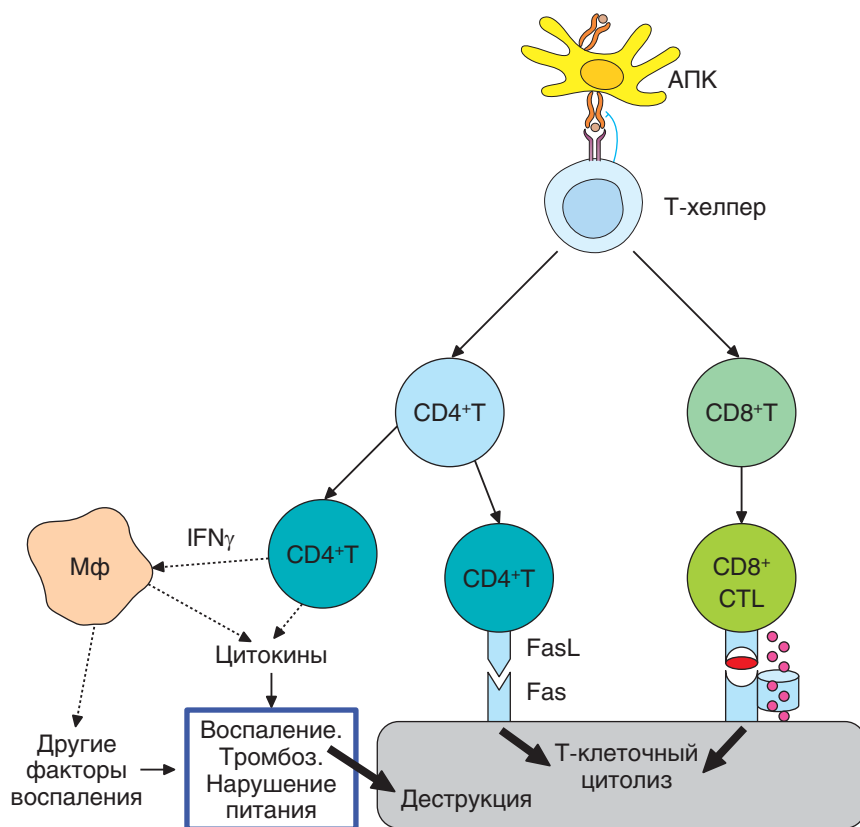
**Рис. 4.8.** Прямое и не прямое распознавание молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) при трансплантации тканей. Клетки и молекулы донора и реципиента обозначены разными цветами. Прямое распознавание предполагает распознавание Т-клеткой реципиента целой молекулы МНС, не прямое — распознавание эпитопов донорской молекулы МНС в составе МНС хозяина

служит клетка-пассажир — аллогенная дендритная клетка, которая сама представляет молекулу МНС класса I Т-лимфоциту реципиента. Полагают, что в этом процессе основную роль играет распознавание не антигенного пептида (вероятно, он вообще не имеет значения), а особенностей структуры молекулы МНС, отличающейся от МНС хозяина. Очевидно, аллогенная дендритная клетка, как и сингенная, поставляет костимулирующие сигналы. Соотношение прямого и опосредованного распознавания молекул МНС на этом этапе трансплантационной реакции изучено недостаточно. Считают, что оба типа распознавания участвуют в вовлечении в иммунный ответ как  $CD4^+$ , так и  $CD8^+$  Т-клеток, однако во втором случае преобладает прямое распознавание.

Формирующиеся эффекторные Т-клетки обоих типов (Th1-клетки и цитотоксические Т-лимфоциты) поступают в циркуляцию и в результате экспрессии на их поверхности хемокиновых рецепторов (CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 и др.), мигрируют в очаги воспаления, всегда сопутствующего трансплантации, и инициируют реакции, приводящие к отторжению ткани. Наряду с этими антигенспецифическими клетками в трансплантат мигрируют естественные киллеры, а также воспалительные клетки, прежде всего макрофаги. Лимфоидная инфильтрация — одно из самых типичных морфологических проявлений трансплантационной реакции.

Как уже упоминалось, реакция отторжения складывается из двух составляющих, опосредованных  $CD8^+$  и  $CD4^+$  Т-клетками. С одной стороны, это типичная цитотоксическая реакция, опосредованная естественными киллерами и цитотоксическими Т-лимфоцитами. Участие естественных киллеров обусловлено отсутствием на клетках мишенях сингенных молекул МНС. Цитотоксические Т-лимфоциты распознают молекулы МНС-I донора на поверхности клеток трансплантата напрямую. Цитотоксические клетки обоих типов осуществляют цитолиз по перфориновому и Fas-зависимому механизмам. Дополнительный вклад в отторжение аллотрансплантатов вносит  $IFN\gamma$ , выделяемый цитотоксическими клетками обоих типов. Этот цитокин способствует развитию апоптоза клеток трансплантата и стимулирует реализацию реакций, опосредуемых  $CD4^+$  Т-клетками. Данные о вовлечении в этот процесс клеток «промежуточного типа» —  $\gamma\delta$ Т- и NKT-клеток практически отсутствуют.

Клеточный ответ воспалительного типа, опосредованный  $CD4^+$  Т-клетками и макрофагами, создает фон для реализации цитотоксического ответа (рис. 4.9). Вызываемое этими клетками иммунное воспаление инициируется взаимодействием Th1-клеток с макрофагами. При этом Th1-лимфоциты повторно стимулируются пептидными фрагментами молекул МНС-II донора, представляемыми макрофагами. Такие активированные Th1-клетки в свою очередь стимулируют макрофаги через костимулирующую молекулу CD40. Th1-лимфоциты выделяют  $IFN\gamma$  и  $TNF\alpha$ . Эти цитокины, с одной стороны, служат дополнительными активаторами макрофагов, а с другой — сами по себе проявляют провоспалительную и деструктивную активность. Активированные макрофаги выделяют провоспалительные цитокины, а также активные формы кислорода, оксид азота, ферменты и другие факторы, оказывающие при инфицировании бактерицидное действие, а при трансплантации участвуют в разрушении пересаженных тканей. Кроме



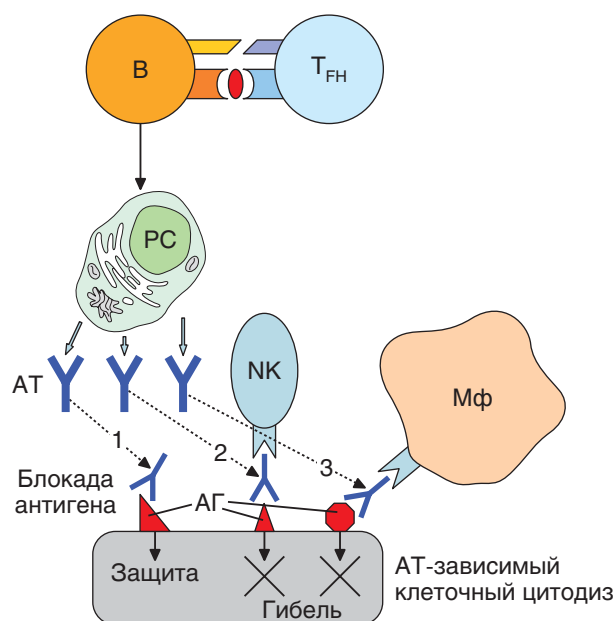
**Рис. 4.9.** Клеточные механизмы отторжения трансплантата. Отражены 2 основных механизма, обеспечивающие отторжение аллотрансплантата: цитолиз, осуществляемый преимущественно CD8<sup>+</sup> и в меньшей степени CD4<sup>+</sup> Т-клетками, и нарушение питания трансплантата вследствие локального воспаления

того, продукты макрофагов способствуют развитию локального воспаления, сопровождающегося нарушением микроциркуляции, формированием тромбов и другими изменениями, что нарушает трофику трансплантата и приводит к его отторжению.

Повторная подсадка тканей, несущих те же антигены, которые присутствовали в первом трансплантате, вызывает ускоренную реакцию отторжения, обозначаемую как реакция *second set* («второй заход»). Она проявляется несколько иначе, чем первичная реакция. Основное отличие состоит в отсутствии довольно длительной фазы васкуляризации и сокращении индуктивной фазы. При вторичном ответе на трансплантат с достаточно сильными антигенными отличиями от клеток реципиента, его кровоснабжение, как правило, не устанавливается (отсюда название — «бледный трансплантат»). При повторной подсадке органов на сосудистой ножке быстро развивается тромбоз сосуда, и кровоснабжение нарушается. Это само по себе препятствует приживлению трансплантата,

который с самого начала оказывается в условиях ишемии и дефицита питательных веществ. Сосудистая реакция развивается под влиянием цитокинов, секретируемых эффекторными Т-лимфоцитами, которые быстро образуются из клеток памяти и стимулируют макрофаги; последние тоже вносят вклад в цитокиновую реакцию. В то же время нарушение кровоснабжения делает невозможным и излишним развитие реакции цитотоксических лимфоцитов в том объеме, в каком она реализуется при первичном ответе. В отсутствие спазма сосудов быстрое формирование эффекторных клеток из клеток памяти также обеспечивает ускоренное отторжение трансплантата.

Еще П. Медавар показал, что гуморальные антитела не играют существенной роли в отторжении аллотрансплантата. В некоторых ситуациях антитела даже препятствуют отторжению, защищая клетки трансплантата от разрушительного действия Т-лимфоцитов. При повторной подсадке аллогенных тканей антитела, образующиеся в ходе иммунного ответа на аллоантигены, вносят вклад в реакцию отторжения. Они могут диффундировать в трансплантат, формировать иммунные комплексы с мембранными антигенами его клеток, привлекая макрофаги и обуславливая их FcR-зависимую активацию (рис. 4.10). В конечном счете это способствует развитию воспалительной реакции.



**Рис. 4.10.** Неэффективность гуморального иммунитета при отторжении трансплантата. Антитела не являются основным фактором отторжения трансплантатов, хотя могут привлекать макрофаги (3) и естественные киллеры (2) к его разрушению. Более важна конкуренция антител и Т-клеток за клетки-мишени (1), хотя эту конкуренцию едва ли следует понимать буквально, поскольку В- и Т-эпитопы, как правило, не совпадают

При пересадке ксенотрансплантатов антитела могут играть ключевую роль в отторжении. Однако это не иммунные, а естественные антитела к  $\alpha$ -гликановым остаткам, присутствующие в сыворотке крови всех людей. Мишени этих антител ( $\alpha$ -гликаны) входят в состав мембранных гликопротеинов клеток большинства животных, но отсутствуют у человека. В результате развивается быстрая реакция, сопровождающаяся спазмом сосудов, напоминающая реакцию *secondset* на аллотрансплантат.

#### 4.2.3. Трансплантация костного мозга. Реакция «трансплантат против хозяина»

Пересадки клеток костного мозга занимают обособленное место в практике трансплантаций. Во-первых, их осуществляют в форме инфузий суспензий клеток, а не подсадки солидной ткани. Во-вторых, при пересадке аллогенного костного мозга мобилизуются иммунные механизмы, отличные от таковых при трансплантации солидных органов. В-третьих, подобная трансплантация несет опасность иммунологической агрессии со стороны пересаженной ткани.

Наиболее типичные показания для пересадки костного мозга — необходимость компенсации недостаточности кроветворения при разного рода цитопениях и замещение костного мозга, разрушенного в результате действия ионизирующих излучений, в том числе с лечебной целью (например, при гемобластозах). Основные отличия иммунных механизмов отторжения костного мозга от типичных механизмов трансплантационного иммунитета состоят в большей степени вовлечении НК-клеток и реальной роли антител в отторжении аллогенного костного мозга.

Трансплантация аллогенного костного мозга, содержащего Т-лимфоциты, может послужить основой для возникновения **реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ)** (рис. 4.11). РТПХ, возникающую при клинических пересадках костного мозга, обозначают как **болезнь «трансплантат против хозяина»**. Уже из названия следует, что эта реакция направлена против антигенов хозяина и осуществляется пересаженными клетками.

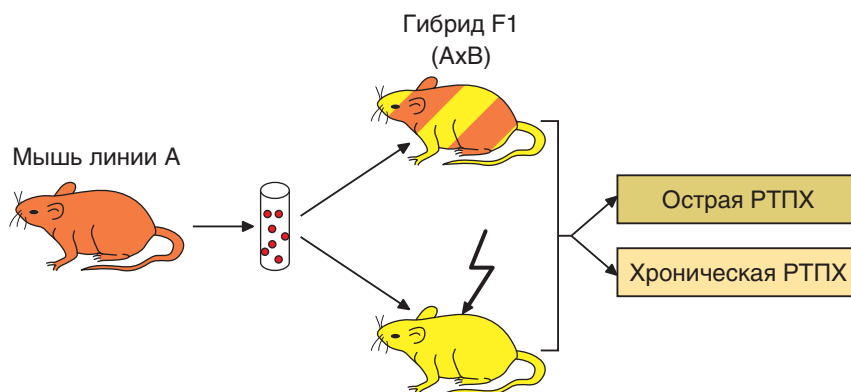


Рис. 4.11. Схема индукции реакции «трансплантат против хозяина»

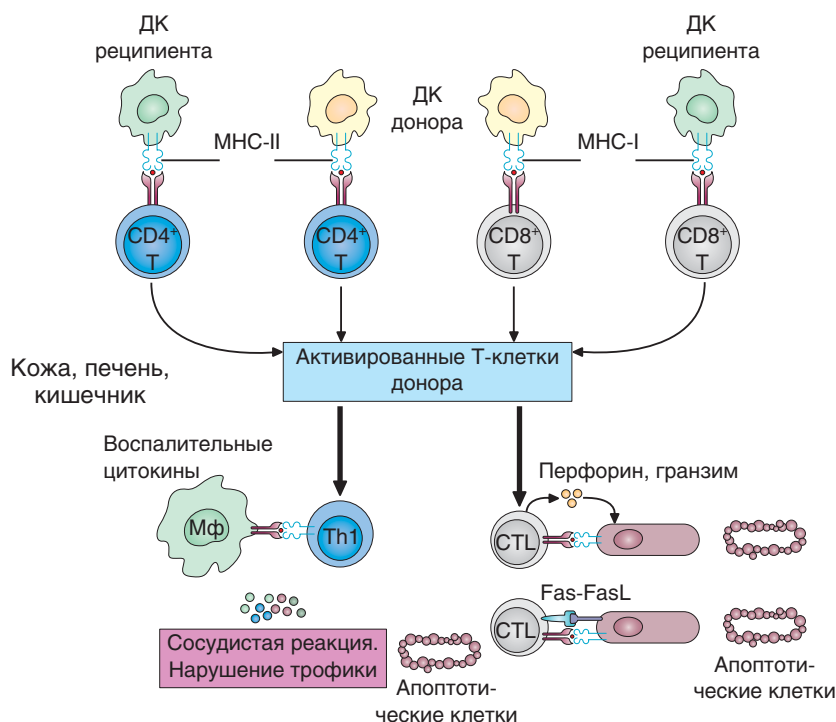
Впервые РТПХ была воспроизведена путем нанесения на хорион-аллантоисную оболочку куриного эмбриона лимфоцитов родительской линии. При этом на оболочке появлялись очаги пролиферации лимфоцитов, а затем лимфоидные клетки повреждали ткани эмбриона. В настоящее время общепринятым подходом для воспроизведения РТПХ в экспериментах на мышах служит введение лимфоидных клеток родительской линии (из любого источника, чаще всего — из лимфатических узлов) гибридам F1. В этом случае реципиент не способен отторгать подсаженные клетки, так как они не содержат чужеродных антигенов, но эти клетки распознают молекулы гистосовместимости, унаследованные гибридами от второго родителя, и реагируют на них. При внутривенном введении на 7–10-е сутки развивается системная реакция, сопровождающаяся сплено- и гепатомегалией, а при введении высоких доз клеток (особенно молодым животным) — гибелью реципиентов. При введении клеток в стопу развивается локальная реакция, выявляемая по увеличению региональных лимфатических узлов. Этот вариант часто применяют в экспериментах в качестве теста на состояние клеточного иммунного ответа у донора клеток. Другой вариант воспроизведения РТПХ состоит во введении лимфоцитов аллогенному реципиенту с подавленным иммунитетом (например, облученным взрослым, мышам с врожденным иммунодефицитом или новорожденным). Развитие РТПХ при введении родительских клеток новорожденным гибридам F1 сопровождается задержкой роста, облысением, поражением слизистых оболочек с диареей, кахексией. Такое состояние называют болезнью задержки роста (*runt*-синдром) или синдромом истощения (*wasting*-синдром).

Как уже было отмечено, у человека болезнь «трансплантат против хозяина» является следствием лечебных процедур — обычно после введения костного мозга, реже — суспензии лимфоидных клеток, больным, облученным с лечебной целью или при радиационных катастрофах. Болезнь может быть индуцирована также пересадками органов, богатых лимфоидными клетками, например, легких или фрагментов кишечника. Болезнь развивается в двух вариантах — остром и хроническом. Острая болезнь «трансплантат против хозяина» развивается в течение 100 сут (в типичных случаях — на второй декаде) после облучения и пересадки костного мозга. Раньше ее называли вторичной радиационной болезнью, понимая под первичной прямые последствия облучения. Реакция на антигены МНС протекает тяжелее реакции на слабые антигены гистосовместимости.

Типичную для экспериментальной РТПХ клиническую картину, состоящую в увеличении селезенки, лимфатических узлов и печени наблюдают достаточно редко. Чаще всего наблюдается поражение трех «мишеней» — кожи (эпидермиса), печени (эпителия желчных протоков, но не гепатоцитов) и пищеварительного тракта (слизистой оболочки). Проявлениями РТПХ в этом случае являются сыпь, желтуха, диарея, кишечные кровоизлияния. Массивное слушивание эпителия слизистой оболочки кишечника или обширные некротические процессы могут приводить к смертельному исходу.

Хроническая болезнь «трансплантат против хозяина» развивается позже 100 сут после подсадки костного мозга. Она проявляется фиброзом и атрофическими процессами без некрозов. Поражаются те же эпителиальные ткани и органы, что и при острой форме болезни, а также легкие.

При острой экспериментальной РТПХ основной мишенью донорских лимфоцитов служат молекулы МНС-II и в первую очередь поражаются экспрессирующие их клетки (клетки Лангерганса в коже, дендритные и эпителиальные клетки в тимусе и др.). Это основная причина развития сопутствующего иммунодефицита. Хроническая РТПХ в большей степени направлена против молекул МНС-I. Поскольку при пересадках клеток происходит отбор доноров, совместимых по МНС, болезнь «трансплантат против хозяина», регистрируемая в практике трансплантаций, обычно обусловлена реакцией Т-клеток на слабые антигены гистосовместимости. Ключевая роль в патогенезе РТПХ и соответствующей болезни принадлежит Т-лимфоцитам, как  $CD4^+$  (преимущественно), так и  $CD8^+$  (рис. 4.12). Допускают участие в реакции НК-клеток. Если механизмы запуска реакции в целом понятны, то механизм формирования клинических проявлений объяснить сложнее. Увеличение лимфоидных органов и печени связаны с размножением лимфоидных клеток, причем не только донора, но и собственных клеток реципиента в ответ на цитокины, выделяемые активированными донорскими клетками. Цитокины участвуют также в повреждении эпителиальных клеток, которое предотвращают антитела к IL-1 и TNF $\alpha$ . Вероятно, в развитии кахексии при острой РТПХ участвует



**Рис. 4.12.** Клеточные механизмы реакции «трансплантат против хозяина». В основе реакции лежат те же механизмы, которые отвечают за отторжение аллотрансплантата: перфорин- и Fas-зависимый апоптоз клеток-мишеней, нарушение питания пораженных участков вследствие развития воспаления

TNF $\alpha$ , а развитие фиброза при хронической болезни «трансплантат против хозяина» не обходится без участия TGF $\beta$ .

Общепринятый подход к профилактике болезни «трансплантат против хозяина» состоит в удалении Т-клеток из пересаживаемого костного мозга. Это действительно предотвращает развитие заболевания, но при этом ухудшается приживление трансплантируемых клеток в костном мозгу реципиента. Полагают, что для приживления (независимо от совместимости по МНС) необходимы цитокины, вероятнее всего, колониестимулирующие факторы, выделяемые Т-клетками. В настоящее время разрабатывают подходы к профилактике болезни «трансплантат против хозяина» путем добавления к пересаживаемым клеткам костного мозга регуляторных Т-лимфоцитов, подавляющих функциональную активность Т-клеток. Одновременно развивается подход, заменяющий пересадку костного мозга переливанием крови (точнее лейкомассы), в которую предварительно мобилизованы (с помощью введения G-CSF) стволовые кроветворные клетки. Присутствие в крови зрелых Т-клеток повышает угрозу развития РТПХ, что создает необходимость освобождения от них переливаемой лейкомассы.

Серьезную проблему при пересадке костного мозга составляет недостаточная эффективность восстановления Т-лимфоцитарного ростка, в особенности CD4<sup>+</sup> Т-хелперов, обусловленная как недостаточной функциональной активностью тимуса во взрослом организме, так и нарушением гомеостатических процессов, прежде всего ослаблением экспрессии молекул МНС-II, приводящим к уменьшению объема ниш для CD4<sup>+</sup> Т-клеток.

#### 4.2.4. Пересадка органов в клинической практике.

##### Подходы к преодолению трансплантационной реакции

Массовые пересадки аллогенных органов начали применять в медицине в 60-е годы прошлого века. Чаще всего пересаживают почки и костный мозг, реже — сердце, печень, поджелудочную железу. В тактике клинической трансплантации решающую роль играют две процедуры — подбор доноров трансплантатов и иммуносупрессия.

Обычный материал для пересадок — органы, полученные непосредственно после смерти (чаще всего при несчастных случаях) или криоконсервированные органы. Существуют межнациональные банки органов, и при необходимости пересадки на основании анализа баз данных подбирают донора с максимальной совместимостью. При этом учитывают антигены полиморфных локусов *HLA* — *DRB*, *DQA*, *DQB*, *DPA*, *DPB*, *A*, *B*, *C*. Решающее значение для успеха трансплантации имеет совместимость по генам *HLA* класса II, особенно *DRB*. Среди продуктов генов *HLA* класса I наибольшее значение имеют антигены *HLA-B*. Показано, что при полной совместимости по генам *DR* и *B* и адекватной иммуносупрессии приживление донорской почки в течение года происходит в 90% случаев, тогда как при максимальной несовместимости по этим генам (различия по 4 аллелям) и такой же супрессивной терапии — в 70% случаев.

Иммуносупрессивные воздействия входят в программу подготовки реципиентов к трансплантации и проводятся в ранний период после пересадки, а в последующем — в зависимости от состояния трансплантата, за которым проводят постоянное наблюдение (мониторинг). Оптимальные

средства иммуносупрессии при аллотрансплантациях три препарата — циклические антибиотики циклоспорин, такролимус (FK506) и рапамицин. Первые 2 препарата прерывают передачу  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого сигнала, обеспечивающего транслокацию в ядро транскрипционного фактора NF-AT и по этой причине препятствуют активации клеток, синтезу IL-2 и экспансии клонов Т-лимфоцитов. Рапамицин блокирует передачу сигнала от рецептора IL-2 с аналогичными последствиями (см. раздел 3.4.2.1 и 4.8.3.1). Благодаря применению циклоспорина на протяжении 80-х годов XX века был достигнут современный уровень эффективности аллотрансплантаций.

Поиски оптимальных способов использования антител, препятствующих отторжению трансплантатов, продолжаются. Первоначальные подходы в этой области были связаны с использованием антилимфоцитарных сывороток, а затем антилимфоцитарного глобулина — препаратов поликлональных антител к мембранным молекулам лимфоцитов. Эти препараты были весьма гетерогенны по составу и специфичности и содержали многочисленные примеси. Новый уровень в этой области был достигнут при использовании моноклональных антител к конкретным мембранным антигенам Т-лимфоцитов. Аprobация моноклональных антител к молекуле CD3 показала их безусловную эффективность. Однако для лечебного использования пригодны только блокирующие антитела, тогда как активирующие антитела вызывают поликлональную активацию Т-лимфоцитов, сопровождающуюся выбросом большого количества цитокинов. Проблемы, связанные с антигенностью мышиных антител для человека, обходят с помощью «гуманизации» молекул (см. раздел 4.8.3.2). В настоящее время исследуют способы подавления реакции отторжения с помощью антител к костимулирующим рецепторам (например, CD80).

#### 4.2.5. Переливание крови

Особым вариантом пересадки аллогенных тканей — переливание крови. Эта процедура получила широкое применение в медицинской практике после открытия К. Ландштейнером (*K. Landsteiner*) в 1900 г. групп крови — первых установленных систем антигенного полиморфизма у человека.

Переливание крови рассчитано на временный эффект, связанный с переносом эритроцитов, и не предполагает длительного приживания перелитых клеток. В связи с этим возникающие при этом проблемы тканевой несовместимости проявляются иначе. Прежде всего в данном случае важны аллоантигены эритроцитов, а не лейкоцитов (что исключает проблемы, связанные с несовместимостью по МНС). Несовместимость по эритроцитарным аллоантигенам при гемотрансфузии важна только в том случае, если в организме реципиента к моменту переливания есть антитела, специфичные к аллоантигенам эритроцитов донора. Это может быть следствием нескольких причин. Основная из них — предварительная иммунизация, имеющая место при повторных переливаниях крови от одного и того же донора или при повторных беременностях от одного партнера. Однако использование одного донора для повторных переливаний крови не практикуют, а эффект беременности важен для сохранности плода при несовместимости по системе Rh (см. раздел 4.5.2.1). Еще одна причина не связана с предварительной

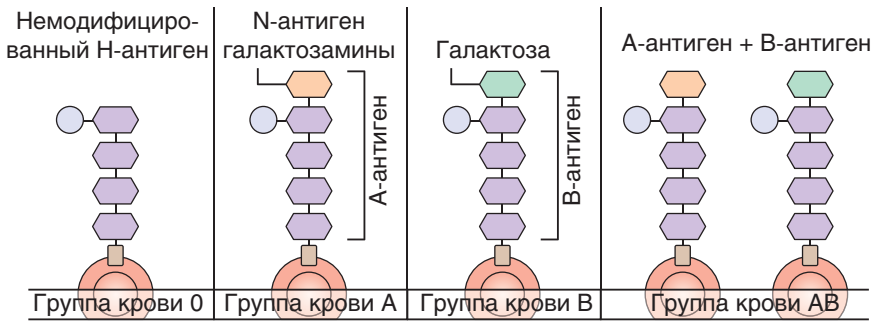


Рис. 4.13. Вещества групп крови — антигены Н, А и В

иммунизацией и заключается в несовместимости по системе аллоантигенов АВ0, при которой в сыворотке крови содержатся естественные антитела к отсутствующим антигенам.

Известно более 20 аллоантигенных систем эритроцитов. Практически все эритроцитарные аллоантигены имеют полисахаридную природу и различаются по концевым олигосахаридным остаткам. В связи с этим для выявления некоторых из них используют лектины — белки, обладающие сродством к определенным сахарам. Антигены системы АВ0 (табл. 4.4) кодируют три кодоминантных аллеля — *H*, *A* и *B*, которым соответствуют антигенные фенотипы 0, А и В (рис. 4.13). Эти антигены имеют общую молекулу-предшественницу — вещество *H*. Ген *H* блокирует дальнейшую химическую модификацию этой молекулы, тогда как гены *A* и *B* кодируют гликозилтрансферазы, обуславливающие приращение к остатку D-галактозы молекулы *H* остатков D-N-ацетилгалактозамина и D-галактозы, соответственно. Именно эти остатки определяют специфичность антигенных эпитопов *A* и *B*. Фенотип 0 соответствует экспрессии вещества *H* и отсутствию антигенов А и В, фенотип А — экспрессии антигена *A* (в сочетании с веществом *H* при генотипе *AH*), фенотип *B* — экспрессии антигена *B* (в сочетании с веществом *H* при генотипе *BH*), гетерозиготы *AB* экспрессируют антигены *A* и *B*. Обозначения групп крови соответствуют указанным фенотипам; широко применяют также их цифровое обозначение — I(0), II(A), III(B), IV(AB).

Таблица 4.4. Характеристика групп крови АВ0

Группа крови	Генотип	Эритроцитарный антиген	Естественные антитела
0(I)	h/h	H	Анти-А (α), анти-В (β)
A(II)	A/A, A/h	A	Анти-В (β)
B(III)	B/B, B/h	B	Анти-А (α)
AB(IV)	A/B	A, B	Нет

Особенность этой системы аллоантигенов, важная при переливании крови, состоит в уже упомянутом наличии в сыворотке крови людей естественных антител к отсутствующим антигенам — *A* и *B* при I группе крови, *B* при II группе крови и *A* при III группе крови; при IV группе крови

естественные антитела отсутствуют. Эти антитела относятся к изотипу IgM. Вероятно, они являются продуктами В1-клеток наряду с другими естественными антителами, в том числе направленными против аутоантигенов. Никаких свидетельств вовлечения активного иммунного ответа (например, на перекрестно реагирующие бактериальные антигены) нет: отсутствует переключение изотипов, гипермутационный процесс, повышение сродства к антигену и т.д. Антитела способны агглютинировать (склеивать) эритроциты, экспрессирующие соответствующие антигены. В связи с этим антигрупповые антитела называют изоагглютинидами и обозначают греческими буквами, соответствующими латинским обозначениям антигенов, которые они распознают, например изоагглютинин  $\alpha$  — это анти-А-антитела. Реакцию агглютинации используют для определения групп крови. В присутствии комплемента антигрупповые антитела вызывают лизис антигенположительных эритроцитов.

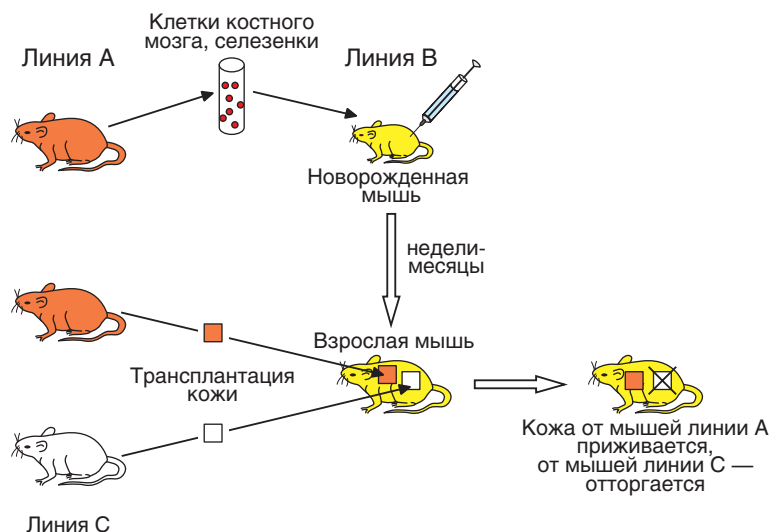
Таким образом, наличие у реципиента предсуществующих антител к антигенам донора приводит к лизису перелитых эритроцитов и формированию иммунных комплексов, содержащих антитела и фрагменты мембраны эритроцитов. Это не только делает бессмысленной процедуру переливания, но и вызывает развитие тяжелой реакции — гемотрансфузионного шока, обусловленного отложением иммунных комплексов на FcR-несущих структурах, в частности, на мембранах клубочков почек, что приводит к тяжелым последствиям (см. раздел 4.5.2.2). Поскольку количество вводимой крови, как правило, значительно меньше ее общего объема у реципиента, ее агглютинирующая способность, как правило, нивелируется. Именно поэтому наличие в переливаемой крови антител к эритроцитарным антигенам хозяина обычно не вызывает патологических последствий. Раньше на этом основании формулировали правила переливания крови, в соответствии с которыми лиц с I группой крови рассматривали как универсальных доноров, а лиц с IV группой — как универсальных реципиентов. В настоящее время общепринята практика, допускающая переливание крови только при полной совместимости донора и реципиента по антигенам системы AB0.

## 4.3. ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ И АНЕРГИЯ

### 4.3.1. Искусственная иммунологическая толерантность к трансплантатам

В 1945 г. Дж. Оуен (*J. Owen*) описал устойчивый **химеризм** (сосуществование в одном организме клеток разного генотипа) эритроцитов телят-близнецов, у которых в эмбриональном периоде было сращение (анастомоз) сосудов пуповины. Это наблюдение дало начало целенаправленным поискам способа индукции неответчивости на чужеродные антигены — толерантности, т.е. «терпимости».

В 1953 г. были опубликованы результаты экспериментов Р. Биллингема (*R. Billingham*), Л. Брента (*L. Brent*) и П. Медавара (*P. Medawar*) по индукции иммунологической толерантности. В период эмбрионального развития



**Рис. 4.14.** Схема индукции иммунологической толерантности в эксперименте на мышах. В классических опытах иммунологическую толерантность индуцировали введением размножающихся клеток реципиентам с незрелой иммунной системой, а тестировали у взрослых животных

мышам линии A/J *in utero* вводили суспензию клеток, полученных из костного мозга и селезенки мышей линии C57BL/6. На 6–8-й неделе постнатальной жизни реципиентам пересаживали кожные лоскуты от мышей линии C57BL/6. Лоскут не отторгался (что было легко контролировать благодаря контрастной окраске шерсти мышей — белой у мышей A/J и черной у C57BL/6), тогда как в контроле отторжение происходило в течение 10–12 сут. В такой срок отторгалась кожа мышей посторонней линии (рис. 4.14). Описанное явление «терпимости» к коже, несовместимой по МНС (H-2 мышей), было названо иммунологической толерантностью.

Практически в то же время аналогичный результат получил М. Гашек (M. Hasek), который искусственно объединял кровеносные системы эмбрионов кур (создавал эмбриональный парабиоз) и после вылупления цыплят демонстрировал возможность успешного обмена между ними кожными трансплантатами. Позже было создано несколько модифицированных моделей иммунологической толерантности. Показано, что у мышей и некоторых других животных толерантность может быть индуцирована введением аллогенных клеток в первые сутки после рождения. Временной интервал, при котором существует возможность индуцировать иммунологическую толерантность введением аллогенных клеток, связывали со сроком «созревания» иммунной системы. В целом эта трактовка сохранилась, причем понятие «созревание иммунной системы» сейчас трактуется как ее «перифериализация», т.е. заселение вторичных лимфоидных органов и ослабление зависимости Т-клеток от тимуса. Толерантность удается индуцировать также у взрослых животных при предварительном разрушении лимфоидной ткани облучением или цитотоксическими агентами.

Иммунологическая толерантность — не просто состояние иммунодепрессии (хотя иммунодепрессия часто является фоном, на котором удается индуцировать толерантность), поскольку неответаемость распространяется только на антигены, использованные для индукции толерантности, тогда как способность к иммунному ответу на другие антигены у животных сохраняется. Иными словами, иммунологическая толерантность представляет собой специфическое подавление способности к иммунному ответу на уровне отдельных клонов лимфоцитов.

Оптимальный материал для индукции толерантности — пролиферирующие клетки кроветворной и иммунной систем. Это связано, во-первых, с длительным персистированием этих клеток в организме вследствие их способности к самовоспроизведению, а во-вторых, — с высоким уровнем экспрессии ими молекул МНС обоих классов. В результате формируется длительный химеризм, что служит обязательным условием поддержания состояния толерантности. Важно сохранение в организме хозяина дендритных клеток донора, почти всегда присутствующих в трансплантируемой ткани.

Вскоре после открытия иммунологической толерантности было установлено, что можно индуцировать специфическую неответаемость и на растворимые антигены. Толерантность вызывали внутривенным введением некоторых сывороточных белков, освобожденных от молекулярных агрегатов ультрацентрифугированием или «биологическим фильтрованием» — пропусканием через организм мыши. Толерантность к растворимым антигенам можно индуцировать на двух дозовых уровнях, в результате чего получают низкодозовую и высокодозовую толерантность. Существуют некоторые структурные особенности антигенов или их физико-химического состояния, благоприятствующие индукции толерантности и которые можно обозначить как толерогенность (см. раздел 3.2.1.2).

Отмена состояния иммунологической толерантности может произойти спонтанно после удаления из организма антигена (в случае его связи с клетками — после устранения химеризма). Прерывание толерантности может быть ускорено с помощью воздействий, повреждающих лимфоциты и требующих восстановления лимфоидной системы, при условии отсутствия толерогена в период регенерации. Толерантность удается преодолеть введением сингенных лимфоцитов от нетолерантных животных (особенно эффективно толерантность отменяется при введении лимфоцитов от животных, иммунизированных соответствующим антигеном). Наконец, отмене толерантности способствует иммунизация антигеном, перекрестно реагирующим с антигеном, использованным для индукции толерантности.

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что иммунологическая толерантность есть некая форма активности иммунной системы. Классическая трактовка природы иммунологической толерантности состоит в том, что введенный антиген вызывает элиминацию или анергию клонов лимфоцитов, которые его распознают. По-видимому, именно с возможностью реализации такого процесса как элиминация клонов (наиболее радикального механизма толерантности) связаны возрастные ограничения индукции толерантности путем введения клеток интактным реципиентам.

Вероятно, такая возможность требует наличия на периферии иммунной системы лимфоцитов, отвечающих гибелью (а не активацией, как у взрослых) на действие антигена, а такие клетки содержатся в организме лишь в короткий срок после рождения. Для поддержания толерантности необходимо установление химеризма на уровне костного мозга, в результате чего в тимус поступают дендритные клетки донорского генотипа, несущие антиген, к которому индуцирована толерантность. Эти клетки обеспечивают элиминацию соответствующих клеток на уровне отрицательной селекции. Нарушение химеризма приводит к прекращению такой селекции и потере толерантности.

Индукцию толерантности растворимыми антигенами первоначально трактовали как результат «обхода» нормального механизма поглощения и переработки антигена макрофагами. В настоящее время это можно объяснить сходным, но несколько иным образом: безагрегатные антигены действительно не активируют макрофаги, которые вследствие этого не выделяют провоспалительные цитокины, необходимые для стимуляции созревания иммуногенных дендритных клеток (DC1). В результате антиген поглощают незрелые или DC2-дендритные клетки, являющиеся толерогенными, так как они способны индуцировать анергию Т-клеток, которым презентируют антиген. Толерантность, индуцированная белками, временна, поскольку с удалением антигена восстанавливается нормальный процесс презентации с участием DC1-клеток.

Объекты действия толерогенов и толерогенных факторов — преимущественно Т-лимфоциты, особенно Т-хелперы, первыми получающие сигнал от дендритных клеток. Поскольку от активации Т-хелперов зависят практически все формы иммунного ответа, их «толеризации» обычно бывает достаточно, для предотвращения развития иммунного ответа. Однако в опытах с индукцией иммунологической толерантности разными дозами белковых антигенов показано, что В-клетки тоже могут приобрести состояние специфической неотвечаемости, но для этого необходимы более высокие дозы антигена и достигнутое состояние бывает менее стабильным.

Хотя превентивная индукция иммунологической толерантности к антигенам тканевых трансплантатов донора применения не нашла, ее индукцию с помощью иммунодепрессивных воздействий (прежде всего циклоспорина) после подсадки органов используют повсеместно и она служит основой всех удачных случаев приживления аллогенных тканей. Индукция взаимной толерантности тканей реципиента и донора является условием также для формирования устойчивого химеризма без развития РТПХ при пересадке костного мозга реципиентам, облученным при лечении гемобластозов или в случаях радиационных катастроф.

#### **4.3.2. Естественная иммунологическая толерантность**

##### **4.3.2.1. Ауто толерантность и ее механизмы**

По-видимому, первым поставил вопрос о причинах отсутствия иммунологических реакций на собственные антигены самый проникательный иммунолог рубежа XIX и XX веков П. Эрлих (*P. Ehrlich*). Не имея рациональных подходов к получению ответа на этот вопрос, он сформулировал

аксиоматическую формулу «*horror autotoxicus*» (боязнь самоотравления). Проблема дискриминации своего и чужого приобрела особую актуальность в 50-е годы прошлого века в связи с доказательством иммунологической природы отторжения трансплантата, открытием феномена иммунологической толерантности и первыми успехами в изучении природы аутоиммунных заболеваний. Необходимость решения этой проблемы породила клонально-селекционную теорию Ф.М. Бернета (*F.M. Burnet*) — возможно, самую продуктивную теорию в истории иммунологии. В соответствии с одним из основных постулатов этой теории лимфоциты несут на своей поверхности рецепторы для распознавания антигенов, и эти крайне многочисленные рецепторы распределены в популяции лимфоцитов клонально — таким образом, что каждый клон несет рецептор одной специфичности. Другой постулат состоял в том, что характер реакции лимфоцитов на связывание антигена зависит от степени зрелости клетки и организма: незрелые клетки, преобладающие до наступления «иммунологической зрелости» организма, в ответ на контакт с антигеном гибнут, а зрелые активируются, что служит основой иммунного ответа. Именно поэтому до периода иммунологического созревания успевают элиминироваться все клоны лимфоцитов, рецепторы которых распознают собственные антигены организма. Клоны лимфоцитов, распознающие чужеродные (не принадлежащие организму) молекулы, сохраняются и при поступлении этих молекул-антигенов в иммунологически зрелый организм обеспечивают его защиту путем развития иммунного ответа. Ни одно из положений этой теории не опровергнуто, хотя многие уточнены или переформулированы. Следствием этой теории была возможность индукции неответа (толерантности) к антигенам, вводимым в организм до наступления иммунологической зрелости, что было доказано П. Медавара (*P. Medawar*) и его сотрудниками. Им удалось индуцировать иммунологическую толерантность к аллоантигенам (попытка самого Бернета получить толерантность к вирусным антигенам не увенчалась успехом). Таким образом сложилось общепризнанное в настоящее время представление о том, что отсутствие иммунного ответа на собственные антигены является следствием формирования иммунологической толерантности на определенном этапе онтогенеза (в основном — к моменту рождения или первым дням постнатальной жизни).

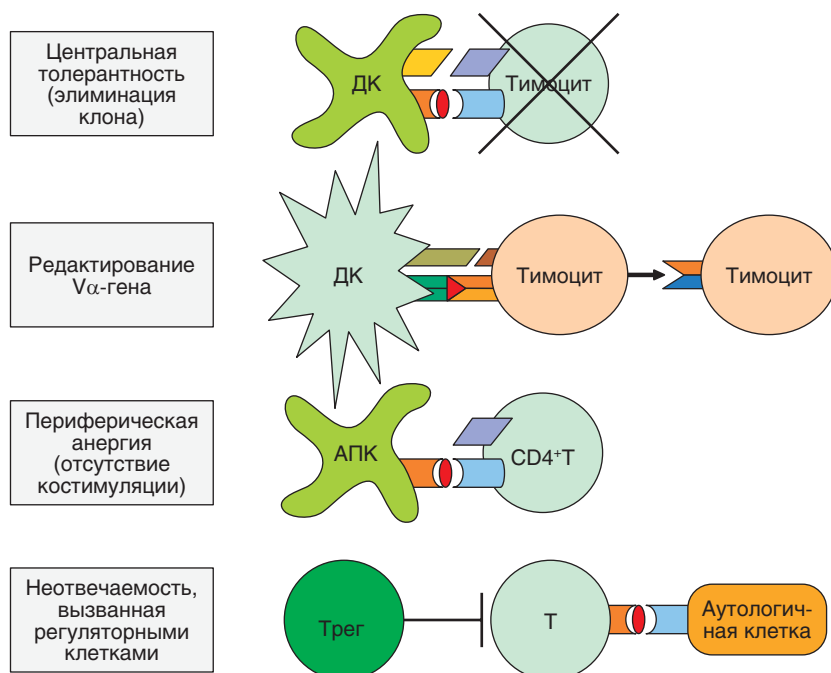
В настоящее время выделяют **активные** и **пассивные** механизмы формирования ауто толерантности. Имеется 4 основных активных механизма формирования ауто толерантности (табл. 4.5, рис. 4.15):

- 1) элиминация ауто специфических клонов (центральный механизм ауто толерантности);
- 2) редактирование генов ауто специфических рецепторов;
- 3) индукция анергии ауто специфических клонов (периферический механизм ауто толерантности);
- 4) подавление ауто специфического ответа регуляторными клетками (доминантный механизм ауто толерантности).

Пассивный механизм ауто толерантности — **игнорирование** ауто антигенов иммунной системой, обусловленное их низкой концентрацией или изоляцией от иммунной системы.

Таблица 4.5. Механизмы ауто толерантности

Механизм	Путь реализации	Место реализации
Делеция клонов	В процессе отрицательной селекции медуллярные эпителиальные и дендритные клетки тимуса индуцируют апоптоз Т-клеток, несущих TCR, обладающий высоким сродством к аутоантигенам. Полнота элиминации клонов дополнительно обеспечивается экспрессией в тимусе органоспецифических антигенов нелимфоидных органов (под контролем гена AIRE). Аутоспецифические В-клетки элиминируются в результате аналогичного взаимодействия со стромальными клетками	Для Т-клеток — тимус (кортиккомедуллярная зона и мозговой слой). Для В-клеток — костный мозг
Редактирование рецепторных генов	При распознавании незрелыми клетками аутоантигенов запускается повторная перестройка V $\alpha$ -гена TCR и V $\kappa$ / $\lambda$ -генов Ig	Вторичные лимфоидные органы
Анергия	При распознавании аутоантигена, не поддерживаемого костимуляцией, происходит стабильная утрата способности клетки к активации	Нелимфоидные органы
Контроль со стороны регуляторных Т-клеток	При одновременной презентации дендритной клеткой аутоантигена регуляторной и эффекторной Т-клеткам, регуляторные Т-лимфоциты подавляют ответ эффекторных Т-клеток по контактному механизму. Клетки типов Th3 и Tr1 подавляют ответ с помощью гуморальных факторов — TGF $\beta$ и IL-10	Вторичные лимфоидные органы

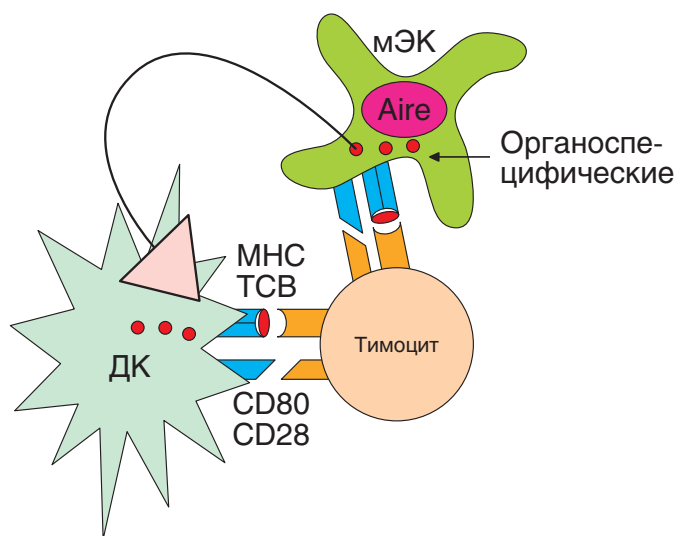


**Рис. 4.15.** Основные механизмы естественной ауто толерантности. Первый из представленных механизмов реализуется в основном в тимусе, три остальных — в периферическом отделе иммунной системы

### Элиминация клонов

В соответствии с современным взглядом на природу ауто толерантности, элиминация ауто специфических клонов служит ее главным фактором. Элиминация реализуется по механизму отрицательной селекции клонов (см. раздел 3.2.3.4). Особенно подробно изучена отрицательная селекция Т-лимфоцитов. Она осуществляется в тимусе в процессе взаимодействия тимоцитов с клетками стромы. Тимоциты проходят этот этап селекции на стадии CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, для которой характерен низкий уровень экспрессии антиапоптотических факторов (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>), т.е. в это время клетки высокочувствительны к апоптозу. Селекцию осуществляют 2 типа стромальных клеток — клетки медуллярного эпителия и дендритные клетки тимуса. Ключевое событие селекции — распознавание TCR молекулы МНС, несущей пептидный фрагмент собственных белков-антигенов. Если рецептор обладает высоким сродством к антигенному эпитопу, тимоцит получает сигнал, приводящий к развитию апоптоза клеток. В результате отрицательной селекции из популяции Т-лимфоцитов элиминируются клоны клеток, распознающих антигены, презентируемые в момент селекции в тимусе, т.е. аутоантигены.

Особую проблему составляет степень представленности в тимусе различных антигенов, в особенности вентимусных органоспецифических. Существует особый ген *AIRE*, ответственный за экспрессию этих анти-



**Рис. 4.16.** Роль экспрессии гена *AIRE* в индукции ауто толерантности к органоспецифическим антигенам. Экспрессия гена *AIRE* вызывает появление в медуллярных эпителиальных клетках тимуса малого количества органоспецифических антигенов нелимфоидных органов. Дифференцирующиеся Т-лимфоциты в процессе отрицательной селекции распознают эти антигены как на самих эпителиальных клетках, так и на дендритных клетках, презентирующих антигены эпителиоцитов. По-видимому, второй путь более эффективен

генов в эпителиальных клетках мозгового слоя тимуса (см. раздел 3.4.1.2). Внетимусные антигены экспрессируются случайным образом в очень ограниченном масштабе, однако достаточном для индукции к ним толерантности (рис. 4.16). Мутации гена *AIRE* приводят к развитию полиспецифических аутоиммунных процессов.

Наличие отрицательной селекции Т-клеток первоначально было доказано в опытах на мышах путем маркирования групп клонов на принадлежность  $\beta$ -цепей их TCR к различным семействам. Так, клоны Т-клеток, специфичные к некоторым антигенам, несут TCR, содержащие  $\beta$ -цепи определенных семейств. Например, клоны, специфичные к самцовому антигену H-Y, экспрессируют  $\beta$ -цепь семейства V $\beta$ 6. У самцов, для которых H-Y является аутоантигеном, содержание V $\beta$ 6<sup>+</sup> тимоцитов по мере их созревания снижается, а у самок, для которых H-Y — чужеродный антиген, доля таких тимоцитов, наоборот, возрастает. Особенно яркое доказательство наличия отрицательной селекции — эксперименты с использованием трансгенов (т.е. генов, вводимых в зародышевые клетки). Перенос перестроенных генов TCR известной специфичности приводит к экспрессии соответствующих TCR на всех Т-клетках. При одновременной экспрессии лиганда (антигена и молекул MHC соответствующего аллотипа) в тимусе на стадии CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> тимоцитов элиминируются все Т-клетки. В определенной ситуации, например при низком уровне экспрессии корецептора CD8, некоторые клоны CD8<sup>+</sup> Т-клеток избегают элиминации и мигрируют

на периферию. Это означает, что существует определенный порог сродства TCR к антигенному лиганду, который должен быть преодолен для осуществления отрицательной селекции.

Отрицательной селекции подвергаются и В-лимфоциты. Ее проходят в костном мозгу и, частично — в периферическом отделе иммунной системы незрелые В-клетки фенотипа  $\text{IgM}^+ \text{IgD}^-$ , а антигены презентуют стромальные клетки. Аутоспецифические В-клетки погибают вследствие апоптоза. Делеционный характер селекции показан в опытах с двойным переносом генов. Мышам одновременно трансфецировали ген яичного лизоцима и V-гены специфичного к нему BCR. В результате зрелые В-лимфоциты элиминировались при сохранении незрелых В-клеток. Таким образом, отрицательная селекция реализуется на этапе перехода от незрелых В-лимфоцитов к зрелым.

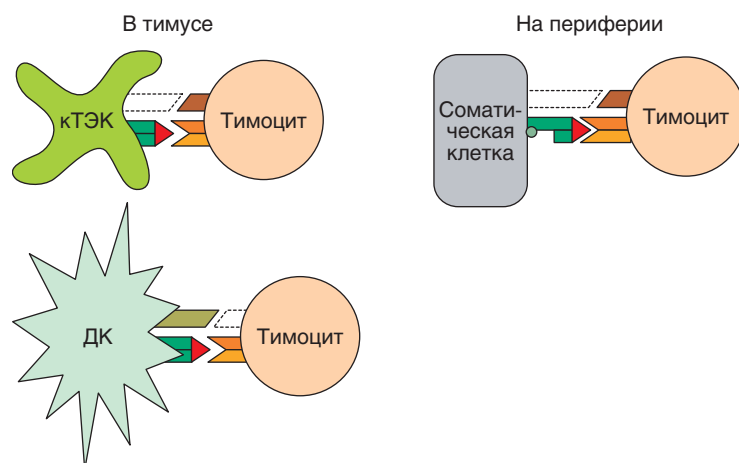
Аутоотолерантность, обусловленную элиминацией клонов, распознающих собственные антигены, называют центральной. Она бывает наиболее эффективной при постоянной реализации в течение всей жизни, поскольку популяции Т- и В-лимфоцитов непрерывно обновляются и аутоспецифические клоны могут возникать в течение всей жизни. Как и любой биологический механизм, селекция клонов не достигает 100% эффективности, и единичные аутоспецифические клоны могут пополнять периферический пул лимфоцитов.

#### **Редактирование и анергия**

На периферии действуют другие механизмы формирования аутоотолерантности и предотвращения аутоагрессии. Распознавание аутоантигена в периферическом отделе иммунной системы служит сигналом для редактирования гена  $\alpha$ -цепи TCR. Вновь экспрессируются гены *RAG* и осуществляется повторная перестройка гена *TRAV*, обычно приводящая к изменению специфичности TCR и утрате ею аутоспецифичности.

Если аутоспецифичность сохраняется при эмиграции Т-клетки из тимуса, индуцируется ее анергия, т.е. неотвечаемость. Условием ее формирования является отсутствие костимуляции при распознавании Т-клеткой аутоантигена (рис. 4.17). Это соответствует ситуации, когда антиген представляется Т-лимфоциту непрофессиональной АПК, лишенной костимулирующих молекул CD80 и CD86, способных осуществить дополнительную сигнализацию через молекулу CD28 (см. раздел 3.5.1.4). Если Т-лимфоцит распознает антиген на АПК в отсутствие костимуляции, полноценный активирующий сигнал не формируется, и клетка подвергается анергии. Это явление специфично — анергии подвергаются конкретные клоны Т-лимфоцитов.

Механизмы анергии раскрыты не полностью. Установлено, что формирование этого состояния сопряжено с ослаблением активности рецепторной тирозинкиназы Lck, отсутствием или ослаблением фосфорилирования киназы ZAP-70 и адапторного белка LAT. Среди низкомолекулярных ГТФаз в этот процесс в наибольшей степени вовлечен фактор p21ras. В связи с этим из основных сигнальных путей, запускаемых в клетке при активации через TCR/CD28, сильнее всего страдает MAP-каскад и особенно та его ветвь, которая зависит от Ras. Она приводит к формированию сигнальных факторов ERK и c-Fos. Однако активность JNK- и p38-ветвей MAP-каскада



**Рис. 4.17.** Механизмы индукции анергии Т-лимфоцитов в тимусе и периферическом отделе иммунной системы. Главный механизм индукции анергии Т-клеток — отсутствие одного из компонентов костимулирующей системы в момент распознавания антигена. Может иметь значение отсутствие костимулирующих молекул (В7) на кортикальных эпителиальных клетках тимуса или соматических клетках вне тимуса или отсутствие молекул CD28 на созревающих тимоцитах

также ослабляется. В результате из трех основных транскрипционных факторов, активируемых при презентации антигена, в наибольшей степени нарушается образование фактора AP-1 (димера *c-Fos/c-Jun*). Среди генов, активируемых при передаче сигнала через TCR/CD28, сильнее всего страдает экспрессия гена IL-2, наиболее важного для активации Т-клеток. Процессы анергии и активации различаются не только перечисленными особенностями передачи сигнала. Так, показана роль фактора Cbl-b в качестве ингибитора активации, а также вклад ряда других факторов в индукцию анергии. Обычным исходом анергии является ускоренная гибель клетки по механизму апоптоза.

Реальность анергии Т-лимфоцитов иллюстрирует следующий эксперимент. Мышам генотипа H-2<sup>a</sup> трансфецировали гены H-2<sup>b</sup> и одновременно — гены TCR, специфичного к H-2<sup>b</sup>, таким образом, чтобы ген H-2<sup>b</sup> экспрессировался в клетках поджелудочной железы, а анти-H-2<sup>b</sup> TCR — в Т-лимфоцитах. Тимоциты таких мышей реагировали на стимуляцию H-2<sup>b</sup> образованием специфических Т-киллеров, тогда как периферические Т-клетки не реагировали на H-2<sup>b</sup>. Следовательно, у таких мышей клон анти-H-2<sup>b</sup> Т-клеток не элиминировался в тимусе, но его реакция на эту молекулу МНС на периферии была подавлена. С помощью дополнительных экспериментов было показано по крайней мере временное присутствие на периферии ареактивных Т-клеток, специфичных к H-2<sup>b</sup>. Таким образом можно продемонстрировать существование периферической толерантности, обусловленной не элиминацией, а анергией Т-клона.

Индукция анергии В-лимфоцитов более проблематична. Однако в соответствии с закономерностями иммунного ответа для предотвращения акти-

вазии клонов В-лимфоцитов бывает достаточно элиминации или индукции анергии клонов Т-клеток той же специфичности.

### ***Роль регуляторных Т-клеток***

Однако индукции периферической толерантности по механизму анергии оказывается недостаточно для надежного предотвращения аутоагрессии. Существует еще один — третий механизм ауто толерантности, который опосредован регуляторными Т-клетками. В связи с активным характером такой толерантности и возможностью ее переноса сингенным реципиентам ее называют доминантной (толерантность, обусловленная элиминацией или анергией клонов, не только не может быть перенесена, но и устраняется при переносе интактных лимфоцитов в связи с присутствием в них реактивных клонов). Еще в 70-е годы было постулировано наличие в иммунной системе особой разновидности супрессорных Т-лимфоцитов, «запрещающих» реакцию на собственные антигены. Такие клетки называли вето-клетками.

Реальность их существования была показана только в 1990-е годы, когда были описаны естественные регуляторные Т-клетки. Эти клетки, имеющие мембранный фенотип  $CD4^+ CD25^{hi} CTLA-4^+$  и экспрессирующие внутриклеточный дифференцировочный фактор FOXP3, охарактеризованы выше (см. раздел 3.3.2.5). Особенность развития этих клеток состоит в том, что они в значительной степени избегают отрицательной селекции. Порог сродства к аутоантигену, обеспечивающий запуск летального сигнала, для этих клеток выше, чем для всех остальных Т-лимфоцитов. В связи с этим некоторые  $CD4^+$  Т-клетки, специфичные к аутоантигенам, не подвергаются апоптозу и дифференцируются в регуляторные Т-лимфоциты. Они эмигрируют на периферию, их выявляют в лимфатических узлах и других лимфоидных тканях, эти клетки препятствуют активации аутоспецифических эффекторных Т-лимфоцитов, если таковые избежали элиминации и анергии на других этапах индукции толерантности. Таким образом, аутоспецифичность регуляторных Т-клеток не только не перерастает в аутоагрессию, но, наоборот, служит условием ее предотвращения.

### ***Игнорирование***

Суть игнорирования состоит в том, что антиген не может вызвать реакцию иммунной системы, если его концентрация в организме ниже пороговой (порог различен для разных молекул). Наличие такого порога важно и для формирования ауто толерантности, и для индукции иммунного ответа. Обычно ауто толерантность не формируется по отношению к молекулам, присутствующим в организме в очень низких концентрациях, однако при этом иммунный ответ также не развивается. В некоторых случаях концентрация таких веществ может возрастать. Это может происходить при опухолевом росте, приводящем к увеличению экспрессии опухолеассоциированного антигена, до того вырабатывавшегося немногочисленными клетками, или при иммунном ответе, когда значительно нарастает концентрация антител, несущих определенный идиотип. В этих ситуациях может развиваться иммунный ответ на подобные антигены, к которым ауто толерантность не сформировалась. Вариант игнорирования — отсутствие реакции иммунной системы на антигены, изолированные от нее тканевыми барьерами, как это бывает в иммунологически привилегированных органах (см. раздел 4.3.2.3).

В этом случае нарушение барьера может привести к развитию аутоиммунного процесса.

Таким образом, ауто толерантность формируется с помощью трех активных механизмов — элиминации клонов в ходе отрицательной селекции (центральная толерантность), анергии клонов в периферическом отделе иммунной системы (периферическая толерантность) и контроля со стороны ауто специфичных регуляторных Т-лимфоцитов. Важен также феномен игнорирования антигенов, присутствующих в слишком низких концентрациях или недоступных для распознавания иммунной системой. Относительный вклад этих механизмов в предотвращение аутоагрессии оценить трудно. По-видимому, все они обязательны для поддержания ауто толерантности. Отключение процесса отрицательной селекции и предотвращение развития регуляторных клеток неизбежно приводят к развитию фатальных полиспецифических аутоиммунных процессов. Нарушение ауто толерантности служит основой аутоиммунных заболеваний — одного из основных проявлений иммунопатологии.

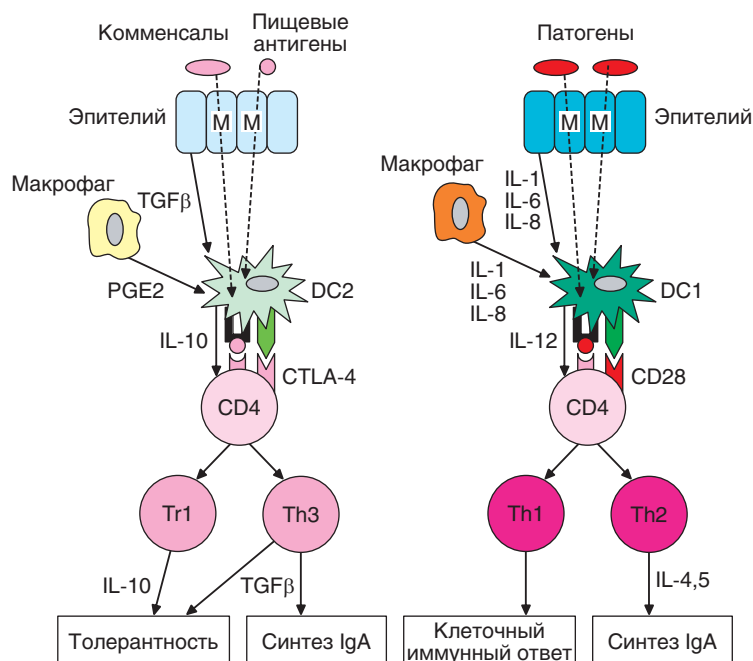
#### 4.3.2.2. Выбор между активацией и анергией в лимфоидной ткани слизистых оболочек

Среди иммунологических феноменов, имеющих отношение к иммунологической неотвечаемости, одним из первых был описан паралич Фельтена — устойчивая блокада образования специфических антител в ответ на введение *per os* высокой дозы пневмококкового полисахарида. В последующем было открыто явление пищевой толерантности — индукция иммунологической толерантности в ответ на пероральное введение антигенов. Отсутствие иммунного ответа при этом проявлялось и при введении антигена другими путями, в том числе парентерально. Природа пищевой толерантности стала понятной только после открытия механизмов мукозального иммунитета.

При любом пути поступления антигенного материала через слизистую оболочку (при участии М-клеток, путем активного захвата дендритными клетками в просвете органа или через поврежденную слизистую) он захватывается АПК, прежде всего дендритными. Они преимущественно и определяют реакцию иммунной системы на макромолекулы, поступающие в организм через тканевые барьеры (рис. 4.18).

Решающим в судьбе этих чужеродных веществ является наличие или отсутствие в их составе РАРР. Как известно, к ним относят молекулы или их фрагменты, по которым организм при помощи паттернраспознающих рецепторов опознает потенциально опасные микроорганизмы (TLR, NOD и др.). Основные носители таких рецепторов — клетки врожденного иммунитета (в первую очередь макрофаги), однако эти рецепторы присутствуют также на поверхности многих других клеток, в том числе эпителиальных клеток барьерных тканей. Если в поступающих через слизистый барьер молекулах РАРР отсутствуют, события развиваются по сценарию, обусловленному отсутствием активации клеток врожденного иммунитета и развития воспалительной реакции.

При таких условиях поступления чужеродного материала через кишечную стенку дендритные клетки не получают активирующих стимулов через TLR и не испытывают действия провоспалительных цитокинов,



**Рис. 4.18.** Выбор между активацией и анергией Т-клеток слизистой оболочки кишечника при поступлении антигенов, несущих образы патогенности и лишенных их. В отсутствие РАРР в составе поступающих молекул (пищевых, принадлежащих комменсалам) не происходит активации макрофагов, эпителиоцитов и дендритных клеток; преобладает секреция супрессорных цитокинов; костимулирующие молекулы на дендритных клетках экспрессированы слабо. Это предопределяет развитие анергии. Наличие образов патогенности (при поступлении патогенов) активирует перечисленные клетки, побуждает их секретировать провоспалительные цитокины, усиливает экспрессию костимулирующих молекул, что обеспечивает активацию Т-клеток и развитие иммунного ответа. В наименьшей степени эти различия сказываются на синтезе IgA

которые в этой ситуации не вырабатываются макрофагами и другими клетками врожденного иммунитета. Напротив, на них действуют супрессорные факторы, вырабатываемые покоящимися клетками — макрофагами (простагландин E2) и эпителиальными клетками (TGFβ, TSLP). Это обуславливает приобретение дендритными клетками толерогенной активности и мембранного фенотипа, характеризуемого слабой экспрессией молекул МНС и костимулирующих молекул CD80 и CD86. Толерогенные дендритные клетки секретируют не IL-12, как иммуногенные дендритные клетки, а IL-10 — цитокин, подавляющий клеточный иммунный ответ, хотя и способствующий развитию гуморального иммунного ответа. Ключевые события в формировании толерогенных дендритных клеток происходят в пейеровых бляшках, где, как правило, эти клетки впервые взаимодействуют с антигенами, поступающими через М-клетки. При отсутствии пейеровых бляшек формирования оральной толерантности не происходит.

Такие дендритные клетки в обычном ритме поступают в лимфу и доставляются в региональные лимфатические узлы. В процессе миграции не происходит усиления экспрессии костимулирующих молекул CD80, CD86 и других и не индуцируется синтез IL-12. В результате при контакте толерогенных дендритных клеток с CD4<sup>+</sup> Т-клетками в тимусзависимых зонах лимфоузлов не происходит активации Т-клеток, их последующей пролиферации и дифференцировки в Т-хелперы. Напротив, индуцируется анергия Т-лимфоцитов, часто приводящая к их ускоренной гибели. Одновременно с этим происходит развитие регуляторных Т-клеток. Результат этих процессов — индукция иммунологической толерантности (неотвечаемости) к антигенам, фрагменты которых доставлены в лимфоузел дендритными клетками.

Этот механизм чрезвычайно важен для поддержания толерантности к антигенам пищи и симбиотических микроорганизмов. Последние экспрессируют РАРР, однако, вероятно, их набор отличается от такового у патогенов, в результате чего при взаимодействии с клетками иммунной системы преобладающими оказываются толерогенные эффекты. Этот аспект толерантности организма к антигенам симбионтов пока до конца не выяснен. Нарушение толерантности к антигенам пищи и симбионтов, помимо аутоиммунной патологии, вызывает ряд заболеваний, обусловленных нарушением толерантности к таким внешним антигенам, не связанным с патогенностью. При срыве толерантности к пищевым антигенам развивается пищевая аллергия, обусловленная повышенной активностью Th2-клеток и IgE<sup>+</sup> В-клеток. К некоторым пищевым антигенам (например, глютену) формируется особотяжелая форма непереносимости. Нарушение толерантности к антигенам комменсалов приводит к развитию различных форм воспалительных заболеваний кишечника. При преобладании активации Th1-клеток с повышенной выработкой IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  развивается болезнь Крона, при гиперактивации Th2-клеток с повышенной выработкой IL-4 и IL-13 — язвенный колит.

Если через слизистые оболочки поступают патогены или их РАРР-содержащие продукты, клетки реагируют на такие антигены на ином фоне, формируемом клетками врожденного иммунитета (см. раздел 2.2). Распознавание РАРР макрофагами приводит к их активации, секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов. Это влечет за собой эмиграцию лейкоцитов из кровотока и другие проявления воспалительной реакции. Эпителиальные клетки реагируют сходным образом и становятся дополнительным источником IL-1 $\beta$  и других провоспалительных цитокинов. Выработка супрессорных факторов макрофагами и эпителиальными клетками, наоборот, ослабляется. Такой ход событий предопределяет активацию дендритных клеток, а затем их миграцию из барьерных тканей в региональные лимфатические узлы.

Аналогичный выбор между индукцией анергии и активацией клеток иммунной системы с последующим иммунным ответом в меньшем объеме осуществляется в слизистой оболочке дыхательных путей при поступлении аэроантигенов. При стимуляции лимфоидной ткани респираторного тракта в отсутствие воспалительного фона индуцируется анергия Т-клеток и системная иммунологическая толерантность к аэрогенным антигенам.

Так, аэрогенное введение растворимого белка овальбумина вызывает развитие толерантности к этому антигену. Нарушение толерантности к аэрогенным антигенам приводит к формированию респираторной формы аллергии — более частой патологии, чем пищевая аллергия.

#### 4.3.2.3. Иммунологически привилегированные органы

Понятие «иммунологически привилегированные органы» введено П. Медаваром (*P. Medawar*) для обозначения органов, при трансплантации в которые чужеродных тканей не происходит их отторжения при условии, если не происходит васкуляризации трансплантата. «Классические» иммунологически привилегированные органы — внутренние камеры глаза, головной мозг, семенники, яичники, волосяные фолликулы, а также беременная матка. Первоначально природу иммунологической привилегии однозначно связывали с наличием гематотканевого барьера, отсутствием лимфатического дренажа, т.е. с изоляцией органа от иммунной системы в связи исключением афферентного звена иммунных процессов. Позже выяснилось, что изоляция не является абсолютной, и в обеспечении иммунологической привилегированности участвуют другие механизмы, в том числе активные (табл. 4.6).

Само существование иммунопривилегированных зон объясняют необходимостью предотвращения воспалительной реакции, сопутствующей иммунным процессам и нередко повреждающей органы сильнее патогенов. Если такое повреждение органов особенно нежелательно (органы размножения, центральная нервная система и т.д.), они «снабжаются» иммунологическими привилегиями.

**Таблица 4.6.** Составляющие иммунологических привилегий и их механизмы

Эффекты	Место действия	Природа	Механизмы
Изоляция	Местное	Пассивная	Тканевой барьер, отсутствие лимфооттока
Иммуносупрессия	Местное	Активная	Дефицит антигенпрезентирующих клеток, растворимые и клеточные супрессорные факторы
Иммунорегуляция	Системное	Активная	Системная толерантность, регуляторные Т-клетки

В понятие изоляции включается наличие тканевого барьера, образованного в разных случаях эндотелиальными, мезотелиальными или эпителиальными клетками. Иногда барьер достаточно труднопроницаем. Например, в камеры глаза не проникают даже красители с молекулярной массой порядка 350 Да. Другая сторона изоляции — отсутствие лимфатического оттока. Таким образом, в иммунную систему не поступает информация об антигенах, присутствующих в привилегированных зонах. Тщательный анализ показал, что, несмотря на реальное наличие барьера, изоляция никогда не бывает полной, и в популяции Т-лимфоцитов присутствуют клетки, не только способные распознавать антигены, характерные для изолированных органов, но и пролиферировать в ответ на это распознавание.

Среди локальных иммуносупрессорных факторов следует назвать прежде всего цитокины (TGF $\beta$ , IL-10), гормоны и нейропептиды (соматостатин, кальцитонин, меланоцитстимулирующий гормон, АКТГ). В этих тканях обычно активны белки контроля системы комплемента, ответственные за быструю инактивацию компонентов комплемента. Среди клеточных факторов иммуносупрессии наиболее важно наличие в привилегированных органах достаточного числа естественных регуляторных Т-клеток. Иммуносупрессия обусловлена также низким содержанием АПК, экспрессирующих молекулы МНС-II.

Наиболее своеобразное проявление активной формы изоляции иммунопривилегированных органов — экспрессия на клетках тканевых барьеров молекул, передающих сигналы к развитию апоптоза — FasL и TRAIL. Fas-лиганд индуцирует апоптоз через связывание с Fas-рецептором, CD95, который присутствует на большинстве активированных лимфоцитов, включая эффекторные Т-клетки. Аналогичным действием обладает TRAIL, передающий летальный сигнал через рецептор DR5. Таким образом, даже если в силу проницаемости барьеров происходит сенсibilизация иммунной системы против антигенов изолированного органа и образовавшиеся цитотоксические Т-клетки мигрируют в этот орган, в момент преодоления тканевого барьера они получают сигнал через FasL или TRAIL и подвергаются апоптозу.

Поскольку все перечисленные механизмы не гарантируют полной иммунологической изоляции, существует дополнительный — системный уровень защиты, состоящий в ограничении иммунного ответа при возникновении условий для его развития. Такую ситуацию можно смоделировать, инъецируя чужеродный антиген, например, в переднюю камеру глаза. При этом развивается «усеченная» форма иммунного ответа, состоящая в заведомо ослабленной гиперчувствительности замедленного типа, формировании антител, не связывающих комплемент (IgG2, IgG4, IgA) и образовании адаптивных регуляторных Т-клеток.

При этом в организме системная иммунологическая толерантность к антигенам иммунопривилегированных органов отсутствует (прежде всего благодаря изолированности органа от иммунной системы). С этим и связана опасность развития аутоиммунных процессов, рассматриваемая как «плата» за привилегии. Для развития аутоиммунных процессов необходимо сочетание нарушения тканевого барьера с развитием локального воспаления, порождающее активацию клеток врожденного иммунитета, включая АПК, молекулами, несущими PAMP. Такая активация приводит к усилению экспрессии молекул МНС-II, костимулирующих молекул и к секреции цитокинов, направляющих иммунный ответ по Th1- и Th17-зависимым путям (см. раздел 3.5.3).

Таким образом, современная трактовка иммунопривилегированных зон предполагает наряду с наличием барьеров, создающих механическую изоляцию от иммунной системы, многочисленные активные, в том числе системные факторы, обеспечивающие локальную иммуносупрессию. Эти факторы комплексно защищают данную зону организма от деструктивных иммунных процессов, направленных против патогенов, но не от деструктивных аутоиммунных процессов.

В настоящее время проявляется тенденция к расширенному толкованию понятия «иммунологически привилегированные зоны». В них включают, например, слизистые оболочки кишечника, в которых иммунный ответ запускается избирательно против патогенов, но не против комменсалов и антигенов пищи. Другой пример расширенной трактовки этого понятия — причисление к иммунопривилегированным зонам опухолей, поскольку ответ на их антигены блокируется сложным комплексом механизмов (см. раздел 4.1.2.4). Наконец, к иммунологически привилегированным «органам» относят развивающийся плод.

#### **4.3.2.4. Иммунологические взаимоотношения матери и плода**

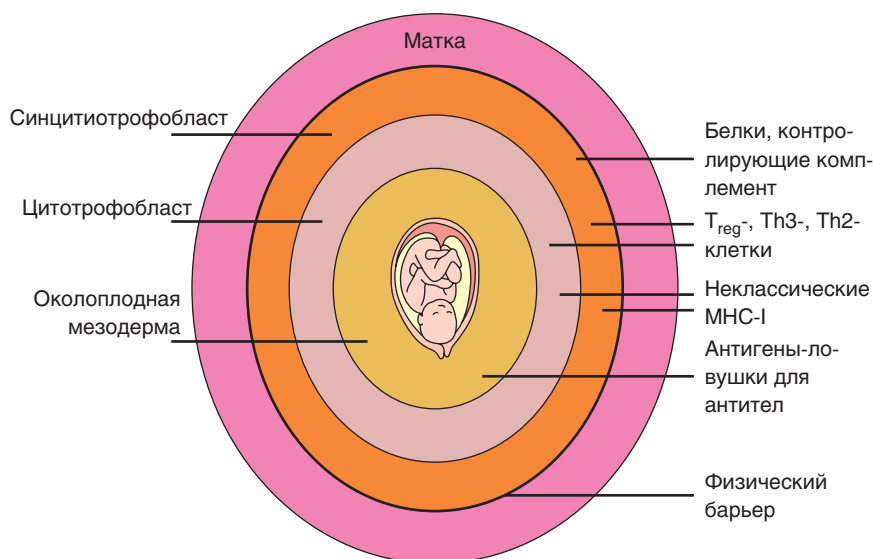
Плод генетически, а следовательно и иммунологически, чужероден организму матери из-за наличия в его геноме отцовских генов. Таким образом, он фактически представляет аллотрансплантат, который в соответствии с законами иммунологии должен быть отторгнут. Однако сам факт существования плацентарных животных свидетельствует о том, что в данном случае непреложные законы иммунологии каким-то образом удается обойти. Более того, судя по осложнениям, возникающим при беременности сингенным плодом (такое возможно в экспериментах с генетически чистыми линиями животных), генетические различия матери и плода даже благоприятствуют нормальному развитию беременности.

Различия между матерью и плодом по генам гистосовместимости играют важную роль, о чем свидетельствуют данные о зависимости размера плаценты от степени таких различий. При развитии сингенного плода плацента имеет минимальный объем, по мере усиления различий по генам гистосовместимости ее размер увеличивается, а при предварительной иммунизации самки антигенами полового партнера размер плаценты плода превышают нормальный.

Предположение о слабой экспрессии в тканях плода антигенов гистосовместимости в силу «иммунологической незрелости» было довольно быстро отвергнуто, поскольку обнаружено, что в тканях плода антигены МНС экспрессируются уже на ранних стадиях эмбриогенеза. В конечном счете общепринятым стало представление о плоде как своеобразном иммунологически привилегированном органе. Природа этой привилегированности до сих пор до конца не раскрыта, но очевидно, что она совершенно уникальна, хотя и полностью вписывается в известные иммунологические закономерности. В значительной степени привилегированное положение плода обусловлено структурой плаценты и наличием или отсутствием в ней иммунологически значимыми факторов (рис. 4.19).

#### ***Особенности экспрессии антигенов гистосовместимости в трофобласте***

Одним из важнейших механизмов защиты плода от атак со стороны иммунной системы матери признают наличие барьера в виде трофобласта (части плаценты, относящейся к организму плода), не экспрессирующего молекулы МНС. Отсутствие в нем молекул МНС-II не вызывает удивления, поскольку их тканевое распределение ограничено. Однако молекулы МНС-I экспрессируются всеми ядродержащими клетками организма, и их отсутствие на клетках трофобласта привлекает особое внимание.



**Рис. 4.19.** Факторы, противостоящие отторжению плода, в оболочках плаценты. Схематично представлена локализация в различных слоях плаценты факторов, предотвращающих развитие реакции отторжения плода как аллотрансплантата

Молекулы МНС-I — HLA-A и HLA-B отсутствуют на клетках внешней оболочки — синцитиотрофобласта, а также на клетках ворсинчатого цитотрофобласта. Молекулы HLA-C на клетках трофобласта экспрессируются. Биологический смысл этого «исключения из правила» пока неясен. В трофобласте выявлены особенности транспорта цитозольных пептидов, препятствующие их встраиванию в молекулы МНС, без чего невозможно формирование стабильной молекулы МНС-I. Таким образом, механизмы, препятствующие экспрессии молекул МНС-I на клетках трофобласта, связаны с посттранскрипционным уровнем формирования макромолекул. Показано, что экспрессия молекул МНС-I на клетках трофобласта блокирована настолько надежно, что не индуцируется даже при действии интерферонов.

В то же время на клетках цитотрофобласта, особенно ворсинчатого, выявлены «неклассические» молекулы МНС-I, относимые к подклассу Ib — HLA-E и HLA-G, в меньшей степени — HLA-F. Для этих молекул характерен ограниченный полиморфизм и, по-видимому, они не участвуют в презентации антигенов. Зато их распознают ингибиторные молекулы NK-клеток, а также  $\gamma\delta$ T-клеток и некоторых других лимфоцитов: молекулу HLA-G распознают рецепторы LILRB1, а HLA-E — рецепторы CD94/NKG. Распознавание обуславливает генерацию сигналов, блокирующих цитолитическую активность лимфоцитов и другие проявления их активности. В результате альтернативного сплайсинга формируется несколько изоформ молекул HLA-G; изоформы 1–4 связаны с мембранами, изоформы 5–7 секретируются в среду и также выявляются в плаценте. Спектр клеток трофобласта, вырабатывающих растворимую форму HLA-G, шире спектра клеток,

экспрессирующих мембранную форму этой молекулы. Как мембранные, так и растворимые (особенно G5) изоформы молекулы HLA-G способны блокировать активность лимфоцитов, несущих соответствующие рецепторы, прежде всего естественных киллеров. Зарегистрировано подавление под влиянием HLA-G способности цитотоксических лимфоцитов секретировать IFN $\gamma$  и усиливать секрецию TGF $\beta$ .

Таким образом, важный механизм, предотвращающий отторжение плода как аллогенного трансплантата — особый характер экспрессии молекул MHC-I на клетках трофобласта (отсутствие экспрессии классических молекул MHC, представляющих антигенный пептид, и экспрессия или секреция молекул, блокирующих активность естественных киллеров), что предотвращает сенсibilизацию организма матери антигенами плода и обеспечивает блокаду естественных киллеров.

Тем не менее, есть многочисленные свидетельства того, что до иммунной системы матери доходят иммуногенные сигналы от плода, о чем свидетельствует накопление в сыворотке рожавших женщин антител против HLA и других антигенов плодов, причем уровень и разнообразие этих антител возрастает с увеличением числа беременностей. Признаки сенсibilизации к антигенам плода проявляются и на Т-клеточном уровне. Однако эта сенсibilизация в норме не приводит к развитию реакции отторжения. Это обуславливает необходимость рассмотрения состояния различных звеньев иммунной системы матери, а также околоплодных оболочек — как материнских, так и плодных. Нет сомнений, что некоторые особенности иммунологической реактивности матери обусловлены эндокринными перестройками. Прогестерон, хорионический гонадотропин и другие гормоны, уровень которых повышается при беременности, способствуют сдерживанию реакций, направленных на отторжение плода, однако эффект гормонов явно недостаточен для сохранения беременности. MHC-несовместимым плодом, и большинство факторов сдерживания формируется в процессе морфогенеза плаценты в соответствии с законами функционирования и регуляции иммунной системы.

#### ***Клетки врожденного иммунитета в плаценте***

Макрофаги присутствуют в плодных и материнских компонентах плаценты. На долю этих клеток приходится 10–20% лейкоцитов, содержащихся в децидуальной оболочке, где выявляют активированные формы макрофагов, однако синтез ими провоспалительных цитокинов IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8 ограничен. Эти цитокины имеют несомненные потенции к повреждению и отторжению плода. Они играют ключевую роль в нарушении беременности, вызванной инфекциями.

Дендритные клетки присутствуют в материнской части плаценты. Они представлены незрелыми и зрелыми миелоидными дендритными клетками. Преобладающий функциональный вариант — клетки DC2-типа, ответственные за индукцию анергии Т-лимфоцитов. На дендритных клетках, как и на макрофагах, обнаружены молекулы ILT2 и ILT4, выступающие в качестве рецепторов молекул HLA-G. Дендритные клетки и макрофаги плаценты активно поглощают клетки неворсинчатого трофобласта, подвергающиеся

апоптозу, что рассматривают как этап индукции иммунологической толерантности матери к антигенам плода, унаследованным от отца. Наконец, для АПК плаценты, прежде всего дендритных, характерен высокий уровень активности индолил-2,3-дезоксигеназы. Как известно, этот фермент катализирует превращение триптофана в N-формилкинуренин, который затем превращается в кинуренин. При этом формируется микроокружение, дефицитное по триптофану, — аминокислоте, лимитирующей биосинтез белка. Такое микроокружение характерно для участков локальной иммуносупрессии.

Содержание НК-клеток в децидуальной оболочке достигает 20–30% от числа клеток костномозгового происхождения. Практически всю популяцию образуют НК-клетки фенотипа CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>+</sup>. Иногда их выделяют в особую субпопуляцию маточных НК-клеток (uNK). Выше уже было отмечено (см. раздел 2.4.1), что клетки с таким фенотипом активно секретируют цитокины, прежде всего IFN $\gamma$ , но обладают ограниченной цитолитической активностью. Проявлению активности естественных киллеров способствует экспрессия на клетках плода и трофобласта стрессорных молекул MICA и MICB, служащих индукторами активации НК-клеток, при отсутствии на них классических молекул МНС-I. Однако активность НК-клеток в трофобласте блокируется неклассическими молекулами HLA-G и HLA-E, экспрессируемыми клетками трофобласта, а также растворимыми формами этих молекул. Аналогичной, хотя и менее выраженной функцией обладают  $\gamma\delta$ T-клетки, содержание которых в трофобласте существенно повышено (до 25% против 2–3% в кровотоке). Однако роль  $\gamma\delta$ T-, как и NKT-клеток, в плаценте связана, скорее всего, со сдерживанием реакции отторжения, поскольку этим клеткам свойственна регуляторная функция, активно проявляемая ими в слизистых оболочках.

#### ***Особенности дифференцировки Т-клеток в организме беременных и в плаценте***

Содержание Т-лимфоцитов в децидуальной оболочке достаточно высоко в начальный период после ее формирования, но к концу беременности их содержание снижается до 5–8% от числа клеток костномозгового происхождения. Значительная часть этих клеток (до 30%, против 5–8% в нормальной крови) экспрессирует мембранные молекулы HLA-DR, т.е. находится в активированном состоянии. Т-клетки представлены как CD8<sup>+</sup>, так и CD4<sup>+</sup> лимфоцитами. Несмотря на отсутствие экспрессии молекул МНС-I на клетках трофобласта, среди CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов есть клетки, специфичные к антигенам плода, т.е. потенциальные киллеры, способные повредить ткани плода. Их проникновение в плод предотвращается с помощью механизма, проявляющегося при защите иммунологически привилегированных зон (см. выше): клетки трофобласта экспрессируют молекулы семейства TNF, способные индуцировать апоптоз клеток, несущих соответствующие рецепторы. Так, на клетках трофобласта обнаружены молекулы FasL, TRAIL, способные через взаимодействие соответственно с рецепторами Fas- (CD95) и DR-5 вызывать апоптоз эффекторных Т-клеток. Кроме того, активность Т-клеток подавляется в связи с дефицитом триптофана в микроокружении, о формировании которого говорилось выше.

Как известно, субпопуляции хелперных Т-лимфоцитов определяют направление развития иммунного ответа, которое обычно соответствует потребностям организма. При реакции на аллогенный трансплантат (в качестве аналога которого можно рассматривать плод) преобладает их дифференцировка в Th1-клетки — продуценты  $IFN\gamma$ . При беременности на системном уровне соотношение субпопуляций Т-хелперов изменяется незначительно и при этом выявляют лишь некоторое предпочтение дифференцировки в Th2-клетки в ущерб Th1- и Th17-хелперам. В децидуальной оболочке плаценты Th1-клеток практически нет (вероятно, вследствие блокады их дифференцировки в региональных лимфатических узлах), тогда как Th2-клетки присутствуют, и их дифференцировка в региональных лимфатических узлах полностью сохранена. О реальной опасности Th1-клеток и их продуктов для вынашивания плода свидетельствуют данные экспериментов с введением в плаценту мышей предварительно индуцированных Th1-клеток: это приводит к выкидышу. Аналогичное введение Th2-клеток такого эффекта не вызывает. Решающую роль в реализации такого действия Th1-клеток играет секретируемый ими  $IFN\gamma$ , введение которого само по себе вызывает прерывание беременности.

Уже давно постулировали защитную роль супрессорных клеток, которые должны развиваться или аккумулироваться в плаценте. Данные, напрямую подтверждающие эти представления, получены после открытия естественных регуляторных Т-клеток. Содержание  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  клеток (регуляторные Т-лимфоциты) в циркулирующей крови беременных достигает максимума во II триместре беременности. После родов содержание этих клеток уже не отличается от нормы. Содержание функционально активных регуляторных  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  Т-клеток возрастает также в децидуальной оболочке, т.е. в зоне непосредственного контакта с тканями плода: на их долю приходится 14% от числа децидуальных  $CD4^+$  Т-лимфоцитов (в норме в периферической крови — около 5%). Развитию регуляторных Т-клеток в плаценте способствуют толерогенные дендритные клетки. При самопроизвольном выкидыше содержание регуляторных Т-клеток в плаценте существенно ниже. Накопление в плаценте регуляторных Т-лимфоцитов не происходит у мышей, генетически предрасположенных к развитию спонтанных аборт, причем перенос им  $CD4^+ CD25^+$  Т-клеток от нормальных сингенных животных предотвращает аборт.

Помимо естественных регуляторных клеток иммунопротективную роль в плаценте играют индуцированные (адаптивные) регуляторные Т-лимфоциты типов Th3 и Tr1. Эти клетки секретируют супрессорные цитокины IL-10 и TGF $\beta$ , подавляющие активность Th1-клеток и их цитокинов. Дополнительную регуляторную роль играют естественные регуляторные Т-клетки типов NKT и  $\gamma\delta T$ , о которых уже говорилось.

Таким образом, динамика численности субпопуляций Т-лимфоцитов свидетельствует о предотвращении проникновения в плаценту или развития в ней Th1-клеток, агрессивных в отношении плода, и накоплении естественных регуляторных клеток, предупреждающих развитие реакции отторжения.

***В-клетки, гуморальный иммунитет и система комплемента***

Исходное содержание В-клеток в децидуальной оболочке невелико (как и в кровотоке матери). Оно существенно возрастает в процессе беременности, достигая 13% в поздние сроки. Уже упоминалось о разнообразном спектре антител, в том числе направленных против молекул HLA (особенно I класса), — «следа» предшествующих беременностей. Развитию гуморального иммунного ответа, в том числе в зоне контакта матери и плода, способствует наличие Th2-клеток. Полагают, что подобно тому, как это происходит при иммунологических реакциях на аллотрансплантат или опухоль, антитела не только не играют существенной деструктивной роли, но даже предохраняют клетки плода от повреждения факторами клеточного иммунитета.

Широко известный и, возможно, единственный пример повреждающей роли антител, синтезируемых в организме матери и направленных против антигенов плода, — анти-Rh-антитела, вызывающие гемолитическую болезнь новорожденных (см. раздел 4.5.2.1). Пока трудно сказать, почему среди огромного множества антигенов, различных у плода и матери, именно резус-антигены (особенно D) не только оказываются иммуногенными, но и определяют деструктивный эффект гуморального иммунитета. Вероятно, одна из причин — высокая чувствительность эритроцитов, на которых локализуется этот антиген к комплементзависимому лизису. Особое место этого антигена среди эритроцитарных аллоантигенов, по-видимому, обусловлено его наибольшей иммуногенностью.

Систему комплемента, безусловно, нужно рассматривать в ряду потенциальных эффекторных факторов повреждения плода, особенно если учесть синтез антител, способствующих проявлению его активации по классическому пути на клетках плода. Серьезный барьер для транспорта антител и активации комплемента — трофобласт. В клетках трофобласта активно функционирует система контроля и инактивации комплемента: на них повышен уровень экспрессии молекул CD46, CD59, фактора DAF, относящихся к этой системе.

Материал, приведенный выше, свидетельствует о том, что, несмотря на наличие трофобластного барьера, изолирующего МНС-несовместимый плод от иммунной системы матери, существует реальная возможность сенсibilизации матери антигенами плода. Для предотвращения этого в плаценте реализуются разнообразные защитные механизмы, пресекающие развитие иммунных атак. Среди таких механизмов особенно нужно выделить механизмы, направленные против синтеза провоспалительных и Th1-цитокинов, способствующих отторжению чужеродных тканей. Напротив, выработка их антагонистов — супрессорных и Th2-цитокинов — поддерживается. Наконец, первостепенную роль в защите плода играет целая система регуляторных Т-клеток, мобилизуемых в зону контакта плода и матки или формирующихся местно. Эти клетки активно блокируют проявления иммунной агрессии против плода.

В результате, хотя при беременности происходят разнообразные иммунные процессы, свидетельствующие о распознавании иммунной системой

матери антигенов плода, эти процессы не являются деструктивными. Более того, определенная степень иммунной активации даже благоприятна для поддержания беременности. Среди иммунологических причин выкидышей наряду с факторами, обусловленными тканевой несовместимостью, фигурирует отсутствие или недостаточная выраженность антигенных различий, в первую очередь различий по системе МНС. Акт родов имеет в своей основе (наряду с гормональными) факторы иммунологической природы, в первую очередь, снятие запретов на иммунную реакцию отторжения вследствие быстрого снижения содержания регуляторных Т-клеток. Поэтому в механизме родов определенная роль принадлежит иммунологическим механизмам отторжению несовместимых тканей.

#### 4.4. АУТОИММУННАЯ ПАТОЛОГИЯ

*Аутоиммунными заболеваниями* называют патологические процессы, основой которых служит самоподдерживающийся иммунный ответ на собственные антигены организма, что приводит к повреждению клеток, экспрессирующих эти аутоантигены. Аутоиммунные процессы развиваются при нарушении механизмов развития и поддержания аутоотолерантности.

Само по себе присутствие в организме аутоантител и аутореактивных клонов Т-лимфоцитов еще не означает наличие патологического процесса. Так, у всех людей в сыворотке присутствуют малые количества «естественных» аутоантител, которые в силу слабого сродства к антигенам и ограниченности эффекторных функций не способны вызвать повреждение тканей. Следовательно, в основе аутоиммунной патологии лежат только те формы иммунного ответа на собственные антигены, которые могут повреждать клетки, несущие аутоантиген, и вызывать иные нарушения тканевого гомеостаза.

Аутоиммунным процессам свойственны общие черты:

- основа аутоиммунных заболеваний — иммунные процессы. Все закономерности развития иммунного ответа находят отражение в патогенезе этих заболеваний. Факторы, подавляющие иммунный ответ, ослабляют проявления этих патологий, а иммуностимуляторы, наоборот, усиливают аутоиммунный процесс;
- проявления аутоиммунных процессов во многом определяются локализацией аутоантигена в организме: если он содержится только в определенном органе, поражение имеет локализованный характер, затрагивая соответствующий орган; при широкой распространенности аутоантигенов в организме развивается системный процесс;
- проявления аутоиммунных заболеваний зависят также от характера иммунных механизмов, преобладающих при ответе на аутоантиген. Это может быть преимущественно клеточная реакция, состоящая в формировании цитотоксических Т-лимфоцитов или провоспалительных Т-клеток, активирующих макрофаги, или гуморальная реакция, проявляющаяся в выработке аутоантител, способных привлекать клеточные (фагоциты) и гуморальные (комплемент) эффекторные факторы;

- в связи с невозможностью удаления аутоантигена из организма (т.е. его персистированием) аутоиммунные процессы всегда имеют затяжной характер с признаками самоподдержания.

#### 4.4.1. Иммунопатогенез аутоиммунных заболеваний

##### 4.4.1.1. Причины нарушения аутоотолерантности

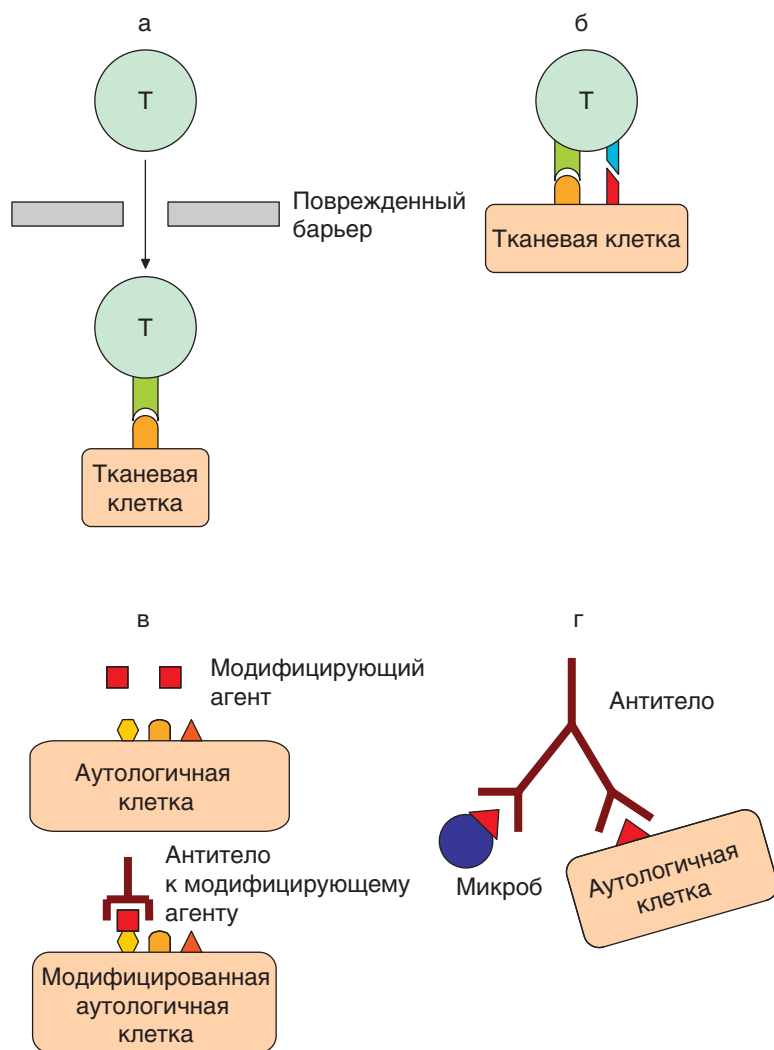
К развитию аутоиммунной патологии может привести нарушение любого из процессов, обеспечивающих неотвечаемость на собственные антигены: элиминации клонов аутоспецифических лимфоцитов в процессе их развития, периферической анергии выживших аутоспецифических клонов, снижение активности регуляторных Т-клеток, а также возрастание уровня антигенов, концентрация которых исходно была ниже уровня, необходимого для распознавания иммунной системой (табл. 4.7, рис. 4.20).

**Таблица 4.7.** Основные формы аутоиммунных заболеваний

Преобладающий тип иммунных механизмов	Органоспецифические заболевания	Системные заболевания
Цитотоксический Т-клеточный	Инсулинзависимый сахарный диабет, язвенный колит	Нет
Клеточный (Th17/Th1-зависимый)	Тиреоидит Хашимото, рассеянный склероз, вульгарная пузырчатка, первичный билиарный цирроз	Ревматоидный артрит
Гуморальный (Th2-зависимый), связанный с аутоантителами	Тяжелая миастения, токсический зоб (базедова болезнь), аутоиммунная гемолитическая и пернициозная анемии, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура	Системная красная волчанка, системная склеродермия
Смешанный или точно не установленный тип	Микседема, симпатическая офтальмия	Синдром Шегрена, дерматомиозит

#### *Нарушение процессов отрицательной селекции, повышающее выживаемость аутоспецифических клонов*

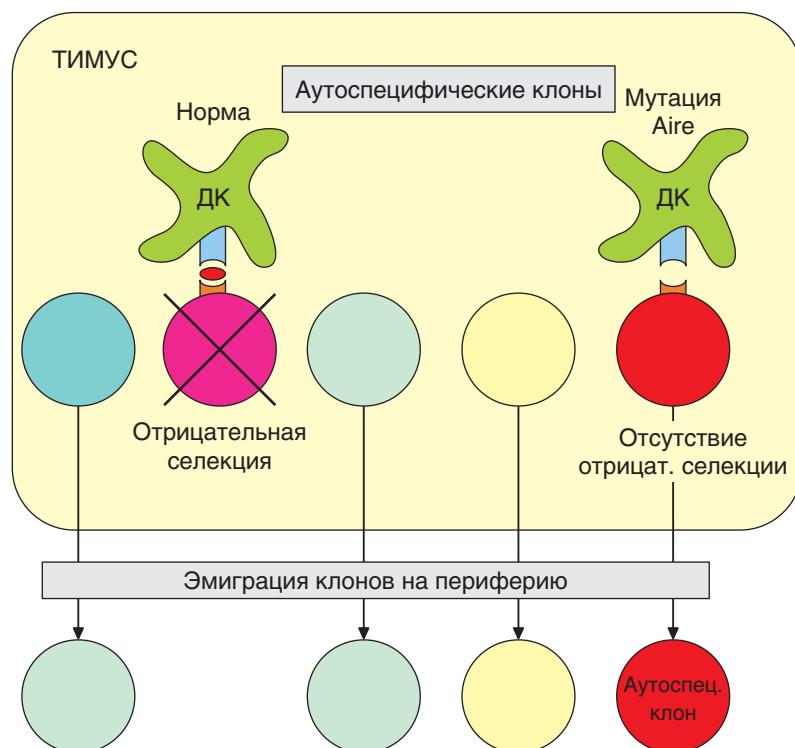
Хотя этот механизм индукции аутоотолерантности традиционно считают базовым, существуют многочисленные свидетельства «проскальзывания» аутоспецифических клонов, в особенности Т-лимфоцитов, в периферический отдел иммунной системы. Это может произойти случайно (развивающийся лимфоцит не встречает дендритную или эпителиальную клетку, несущую аутоантиген, при встрече он не получает летальный сигнал в результате дефекта иммунного синапса и т.д.) или в результате отсутствия конкретного аутоантигена в центральном лимфоидном органе. Несмотря на реальную возможность такого «ускользания», активность этих клеток



**Рис. 4.20.** Механизмы индукции аутоиммунных процессов. Приведены наиболее изученные варианты возникновения аутоиммунных процессов: а — повреждение барьеров; б — экстраординарная экспрессия костимулирующих молекул; в — модификация аутоантигена; г — антигенная мимикрия

подавляется другими механизмами сохранения ауто толерантности и лимфоциты, избежавшие при дифференцировке отрицательной селекции, редко служат основой аутоиммунной патологии.

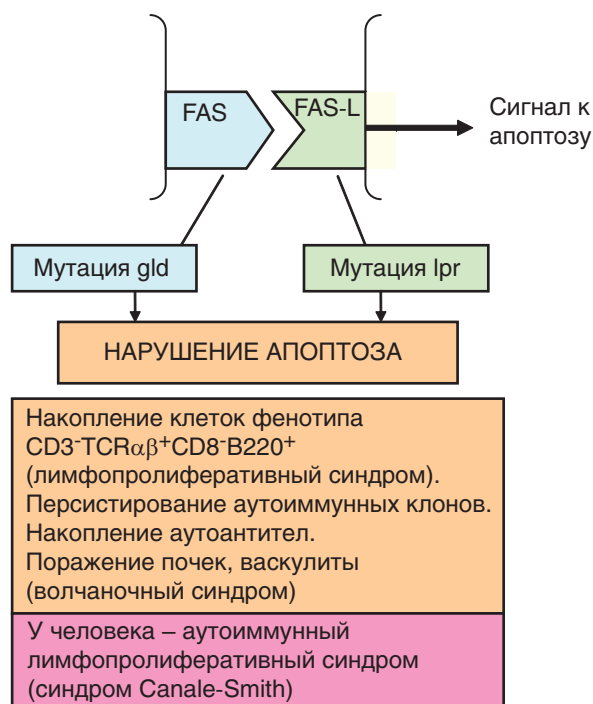
Положение меняется при глубоких, генетически детерминированных нарушениях процесса отрицательной селекции. Наиболее яркий пример таких нарушений — патология, вызываемая мутацией гена *AIRE*, ответственного за эктопическую экспрессию в тимусе органоспецифических антигенов



**Рис. 4.21.** Аутоиммунные процессы, вызванные мутацией гена *AIRE*. При мутации гена *AIRE* в периферический отдел иммунной системы поступает значительное количество клонов Т-клеток, способных распознавать органоспецифические антигены нелимфоидных органов и при дополнительных условиях (воспаление и т.д.) повреждать клетки, на которых они экспрессированы

(см. раздел 3.2.3.4). Поскольку при этом в тимусе отсутствует «представительство» периферических тканей в виде специфичных для них антигенов, элиминации клонов тимоцитов, несущих TCR, специфичный к этим антигенам, не происходит. Это служит основой развития *APECED* (*Autoimmune polyendocrinopathy, candidiasis, ectodermal dystrophy*) — полиспецифического аутоиммунного процесса с преимущественным поражением эндокринных желез и дистрофией органов эктодермального происхождения (рис. 4.21). Эта патология, детально изученная на мышах, описана и у человека (см. раздел 4.7.1.5).

Другой пример нарушений элиминации, затрагивающих не только ее центральный, но и периферический (гибель анергических клеток) механизмы — последствия различных мутаций, приводящих к выпадению элементов сигнальных путей, ответственных за индукцию апоптоза. Чаще всего эти мутации затрагивают ген *Fas* (CD95), несколько реже — ген *FasL*, еще реже — гены внутриклеточных молекул, передающих сигналы от *Fas*, а также гены каспазы 8 и каспазы 10. У мышей подобные нарушения изучены на примере мутаций *lpr* (мутация *Fas*) и *gld* (мутация *FasL*) (рис. 4.22). Эти мутации четко проявляются на фоне генетического окружения мышей



**Рис. 4.22.** Последствия мутации генов, контролирующих факторы рецепторного апоптоза. Мутации генов *Fas*, *FasL*, а также ряда сигнальных молекул и каспаз приводят к сходным результатам, состоящих в усилении лимфопролиферации и активации аутоспецифических клонов лимфоцитов

линии MRL. Фенотипические проявления этих мутации одинаковы. Они находят отражение в обозначениях мутаций: *lpr* — от *lymphoproliferation* (лимфопролиферация) и *gld* — от *generalized lymphoproliferative disease* (генерализованное лимфопролиферативное заболевание). Действительно, клиническая картина заболеваний мышей, обусловленных этими мутациями, состоит в доброкачественной (неопухоловой) гиперпролиферации, особенно сильно затрагивающей кишечник и печень, в сочетании с волчаночным нефротическим синдромом. У мышей выявляют разнообразные аутоантитела и клоны активированных Т-лимфоцитов. Не вполне ясна природа Т-клеток фенотипа  $CD3^{+}CD4^{-}CD8^{-}B220^{+}$  (т.е. Т-клеток, лишенных корецепторов, но несущих маркер В-лимфоцитов — B220), накапливающихся преимущественно в печени. У человека эквивалент этих синдромов — X-сцепленный лимфопролиферативный синдром (см. раздел 4.7.1.5).

#### **Нарушение периферической аутоотолерантности**

Естественные мутации, обуславливающие развитие аутоиммунной патологии на основе нарушения анергии аутоспецифических лимфоцитов в периферическом звене аутоотолерантности, не описаны. В то же время некоторые манипуляции на уровне генов позволяют спровоцировать этот тип нарушений в эксперименте на животных. Наиболее прямой подход —

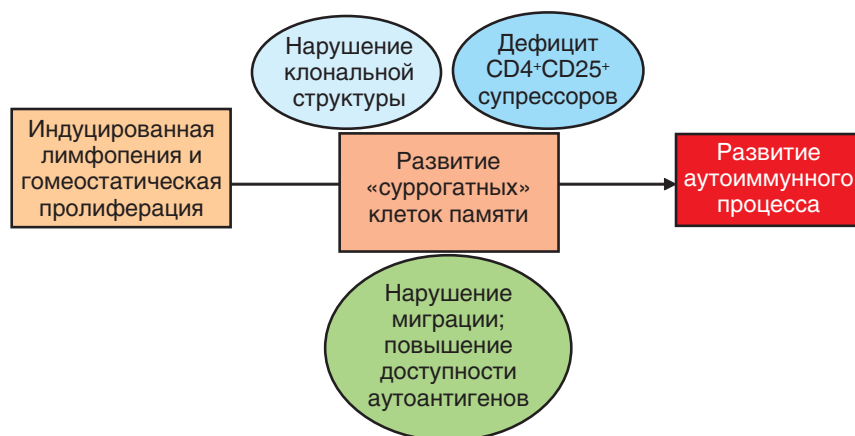
органоспецифическая трансфекция генов МНС-II совместно с генами ко-стимулирующих молекул (например, CD80) в клетки эндокринных органов (в типичном варианте — в  $\beta$ -клетки поджелудочной железы). Следствие этой трансфекции — индукция аутоиммунного поражения этих клеток. В данном случае создают ситуацию, при которой клетки, не относящиеся к иммунной системе (в приведенном примере — панкреатические островковые  $\beta$ -клетки), приобретают свойства АПК и презентруют собственный антиген CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам соответствующих аутоспецифических клонов. В результате вместо анергии, формируемой в отсутствие костимуляции, развивается полноценный цитотоксический иммунный ответ, что приводит к разрушению  $\beta$ -клеток-мишеней.

Вероятно, аналогичная ситуация складывается на фоне воспаления органов. В условиях выработки провоспалительных цитокинов, особенно IFN $\gamma$ , происходит эктопическая индукция экспрессии МНС-II и костимулирующих молекул с воспроизведением вышеописанной ситуации. Есть основания предполагать, что этот вариант, связанный с эктопической экспрессией костимулирующих молекул, является самым распространенным механизмом развития органоспецифических аутоиммунных процессов.

К этому типу иммунопатогенеза следует отнести поражения, свойственные аутоиммунным процессам, индуцируемым экспериментально путем иммунизации животных органоспецифическими антигенами в полном адьюванте Фрейнда. Адьювант создает условия для активации АПК, обеспечивающих эффективную презентацию этих антигенов (которые до того иммунная система «не замечала», иногда в результате их изоляции). Иммунизация аутоантигенами в полном адьюванте Фрейнда служит основным подходом для индукции экспериментальных аутоиммунных процессов. Так вызывают развитие аутоиммунного энцефаломиелита (для иммунизации обычно используют основной белок миелина), аутоиммунного тиреоидита (иммунизируют тиреоглобулином), сахарного диабета I типа, ревматоидного артрита и т.д.

К варианту аутоиммунных процессов, обусловленных нарушением ауто-толерантности в периферическом отделе иммунной системы, можно отнести несколько вариантов аутоиммунной патологии, в основе которых лежит неадаптивное формирование клеток памяти. Известно, что стимуляция клеток памяти происходит по «облегченному» варианту и, по сравнению с активацией наивных лимфоцитов, меньше зависит от костимуляции. В качестве АПК в этом случае могут выступать не только профессиональные АПК, но и любые другие клетки, в том числе эпителиальные или эндотелиальные.

Неадаптивное формирование клеток памяти может осуществляться при поликлональной стимуляции лимфоцитов, особенно Т-клеток. При действии неспецифических мутагенов бактериального происхождения (бактериальных эндотоксинов и т.д.), а также суперантигенов (экзотоксинов, вирусных суперантигенов) происходят активация и пролиферация клеток, принадлежащих к различным клонам — при действии суперантигенов это исключительно Т-лимфоциты. Среди стимулированных могут оказаться клоны, специфичные к аутоантигенам. Как и при любой активации лимфоцитов, при поликлональной стимуляции определенная часть лимфоци-



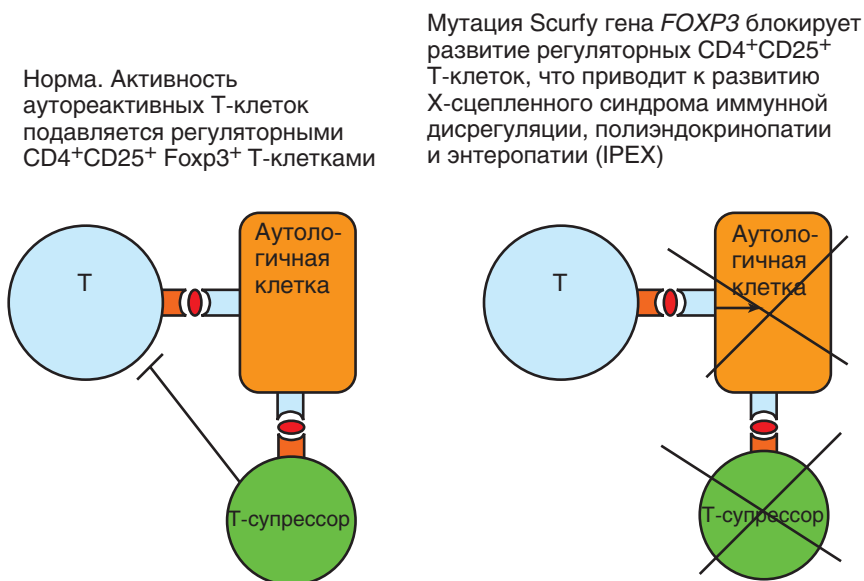
**Рис. 4.23.** Гомеостатическая пролиферация Т-лимфоцитов как основа развития аутоиммунных процессов. Механизмы развития аутоиммунных процессов под влиянием гомеостатической пролиферации до конца не выяснены. Вероятно, основную роль играет изменение путей рециркуляции Т-лимфоцитов, в результате чего аутоспецифические клетки могут контактировать с клетками-мишенями. Важную роль играет нарушение баланса субпопуляций и, возможно, клонов Т-лимфоцитов, приводящее к дефициту регуляторных Т-клеток

тов дифференцируется в клетки памяти. Рестимуляция таких клонов под влиянием презентации им аутоантигенов происходит значительно легче, чем наивных Т-клеток. Среди отвечающих клонов могут быть клоны «молчащих» аутоспецифических клеток, приобретшие свойства эффекторных клеток и способные вызвать повреждение собственных тканей.

Сходный механизм лежит в основе аутоиммунных процессов, сопровождающих регенерацию лимфоидной ткани (рис. 4.23). При регенерации Т-лимфоцитов, опосредованной гомеостатической пролиферацией (см. раздел 3.4.2.6), формирующиеся клетки отличаются от наивных Т-лимфоцитов — они приобретают свойства клеток памяти, в том числе способность мигрировать в нелимфоидные органы. Фактически это вариант поликлональной реакции лимфоцитов без активации, но с формированием клеток памяти. Как и в предыдущем варианте, среди таких «суррогатных» Т-клеток памяти могут оказаться аутоспецифические клетки, инициирующие аутоиммунный процесс. Развитию аутоиммунных процессов в данной ситуации способствует отставание регенерации регуляторных Т-клеток от предшественников эффекторных Т-клеток. Факт повышения частоты аутоиммунных процессов после действия ионизирующей радиации давно известен.

#### ***Недостаточность регуляторных Т-клеток***

Этот вариант иммунопатогенеза аутоиммунных процессов можно четко смоделировать мутациями, обуславливающими дефекты развития естественных регуляторных Т-клеток. Чаще всего эти мутации затрагивают ген *FOXP3* (рис. 4.24). У мышей известна мутация *sc* (*scurfy*), фенотипически



**Рис. 4.24.** Аутоиммунные процессы, вызванные мутацией гена *FOXP3*. Дефицит регуляторных Т-лимфоцитов, вызванный мутацией гена дифференцировочного фактора *FOXP3*, и у мышей, и у человека приводит к фатальному развитию полиспецифических аутоиммунных процессов

проявляющаяся полиспецифическими аутоиммунными поражениями эндокринных органов, кишечника и других органов. У человека описана рецессивная мутация этого гена, сцепленная с X-хромосомой, вызывающая сцепленный с X-хромосомой синдром дисрегуляции иммунитета, полиэндокринопатии, энтеропатии — IPEX-синдром (*Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*) (см. раздел 4.7.1.5).

Фенотипически сходно проявляются мутации, затрагивающие гены, которые кодируют целый ряд факторов, относящихся к иммунорегуляции. Подобные изменения наблюдают при мутации или искусственном выключении генов *IL-2* (необходим для развития регуляторных Т-клеток),  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей его рецептора, а также *TGF $\beta$*  (этот цитокин индуцирует образование регуляторных Т-клеток на периферии; он же выделяется адаптивными регуляторными Т-клетками), *CTLA-4* и *PD-1* (мембранные молекулы регуляторных Т-лимфоцитов, участвующие в реализации их функций). Во всех случаях патогенез поражения состоит в ослаблении функции регуляторных Т-клеток различной природы.

#### **Преодоление игнорирования антигенов и нарушение их изоляции**

Давно установлено, что нарушение барьеров, изолирующих иммунологически привилегированные органы от иммунной системы, приводит к их аутоиммунному поражению. Классический пример такой патологии — симпатическая офтальмия: воспаление, развивающееся в одном глазу, обычно вследствие травмы, имеет аутоиммунную компоненту, которая вызывает поражение другого, нетравмированного глаза. Аналогичную природу имеют

аутоиммунные орхиты и некоторые аутоиммунные поражения центральной нервной системы. Антигены изолированных органов не способны обеспечить формирование периферической ауто толерантности, что и сказывается на развитии данной формы аутоиммунного поражения.

Вариант развития аутоиммунной патологии на основе преодоления игнорирования аутоантигенов (с элементами, свойственными аутоиммунной патологии забарьерных органов) выявляют при росте некоторых нейтральных опухолей. Антигены, в норме очень слабоэкспрессированные в тканях, к тому же изолированные от иммунной системы, при росте опухоли появляются в количестве, достаточно большом для индукции иммунного процесса. Он проявляется в развитии структурных и функциональных поражений соответствующих звеньев нервной системы, которые сопутствуют росту опухоли.

#### ***Аутоиммунные процессы, обусловленные перекрестными реакциями***

К описанной выше патогенетической группе относят варианты индукции иммунного ответа на чужеродные антигены, перекрестно реагирующие с аутоантигенами. На перекрестной реактивности основано развитие аутоиммунных процессов при инфицировании патогенами, имеющими общие или перекрестно реагирующие эпитопы с собственными тканями организма. Наиболее широко известный пример этого процесса — перекрестная реактивность полисахарида стрептококка и антигенов эпителиальных тканей человека. Структуру эпитопа группоспецифического полисахарида стрептококков группы А определяет главным образом концевой моносахарид D-N-ацетилглюкозамин. Антитела, специфичные к нему, взаимодействуют с эпитопами антигенов, имеющих совсем другую химическую природу — с некоторыми цитокератинами эпителиальных клеток человека. Это приводит к поражению тканей, экспрессирующих соответствующий кератин, при инфицировании стрептококками группы А. Известно много других примеров подобного сродства. Так, антитела к антигенам пневмококков реагируют с антигенами почек и сердца человека. Аутоиммунное поражение миокарда при болезни Чагаса, вызываемой *Trypanosoma cruzi*, обусловлено перекрестно реагирующими антителами. Аутоантитела, выявляемые при язвенном колите, взаимодействуют с некоторыми штаммами *Escherichia coli*. Перекрестная реактивность при развитии аутоиммунных процессов может вовлекать идиотипическую сеть: антитела к антигенам микроорганизмов могут нести идиотоп, перекрестно реагирующий с антиканцевыми антителами и лимфоцитарными рецепторами.

Другой вариант аутоиммунного ответа, основанного на перекрестной реактивности, связан с химической модификацией аутоантигенов. Чаще всего это происходит при приеме лекарственных средств, реагирующих с собственными белками организма и выступающих в качестве гаптенов при индукции аутоиммунных процессов. Часть образующихся антител может быть направлена против эпитопов, формирующихся в молекуле аутологичного белка в результате связывания с гаптеном. Эти антитела и обуславливают перекрестную реакцию с интактным белком.

Известно много примеров такой лекарственной аутоаллергии. При связывании  $\alpha$ -метил-ДОФА с поверхностью эритроцитов развивается аутоим-

мунная гемолитическая анемия, при которой мишенью становится антиген D (резус). Прием с лечебной целью прокаинамида вызывает развитие системной аутоагрессии вплоть до волчаночного синдрома. Лечение изониазидом может вызвать образование антиядерных антител с клиническими проявлениями в виде полиартрита.

#### 4.4.1.2. Генетические аспекты аутоиммунной патологии

Роль наследственных факторов в развитии аутоиммунных процессов демонстрируют результаты близнецового и семейного анализов. Так, частоты конкордантности наличия или отсутствия заболевания сахарным диабетом 1-го типа у однояйцовых близнецов составляют 35–50%, а у разнояйцовых — 5–6%. Особенно богатый материал накоплен об ассоциации аутоиммунных заболеваний с HLA-комплексом. Некоторые аутоиммунные заболевания (опосредованные цитотоксическими Т-клетками) ассоциированы с молекулами МНС-I. Наиболее высоки величины относительного риска (отношение частоты заболеваемости у лиц, несущих данный аллель и лишенных его) для ассоциации заболеваемости анкилозирующим спондилартритом и аллелем HLA-B27 — 87,4%. С тем же аллелем тесно связана заболеваемость острым передним увеитом (относительный риск — 10%).

Чаще, хотя и не со столь высоким относительным риском, проявляются ассоциации аутоиммунных заболеваний с аллелями HLA II класса. Для рассеянного склероза, ревматоидного артрита, аутоиммунного токсического зоба, тиреоидита Хашимото, СКВ ассоциация с молекулами HLA варьирует от 3 до 6%, для синдрома Гудпасчера она составляет 16% (с HLA-DR2). В ряде случаев установлено, что первоначально обнаруженная ассоциация заболеваемости с аллелями HLA-DR на самом деле опосредована связью с аллелями HLA-DQ. Это относится прежде всего к сахарному диабету типа I. В большинстве случаев у здоровых людей кавказоидной расы позицию 57 в молекуле DQβ1 занимает остаток аспарагиновой кислоты, тогда как при инсулинзависимом сахарном диабете ее занимают остатки валина, серина или аланина. Аналогичную закономерность прослеживают у мышей: остаток аспарагиновой кислоты характерен для мышей линий, не склонных к аутоиммунным заболеваниям, а остаток серина — для мышей линии NOD (*Non-obese diabetic*) — линии с высоким уровнем спонтанной заболеваемости сахарным диабетом типа I.

Природа ассоциаций аутоиммунных процессов с молекулами МНС-II понятна. Она такова же, как в случаях МНС-контроля любого иммунного ответа: чем выше сродство пептидсвязывающей щели молекул HLA к иммунным пептидам данного конкретного аутоантигена, тем больше риск развития иммунного ответа на этот пептид, т.е. аутоиммунного процесса.

Ассоциациями с комплексом МНС не исчерпываются связи развития аутоиммунных заболеваний с определенными генами. Например, заболеваемость ревматоидным артритом ассоциирована с аллелями *HLA-DRB1* и *HLA-DRB4*; в то же время развитие этого заболевания сцеплено с генами *PTPN22*, (кодирует внутриклеточную тирозинфосфатазу 22), *CIITA* (детерминирует уровень экспрессии молекул МНС-II) и *PADI4* (кодирует пептидил-аргининдеиминазу 4, осуществляющую посттранскрипционную модификацию белков, заменяя аргинин на цитрулин). Ген *PTPN22* ассоциирован

также с аутоиммунным поражением щитовидной железы. У человека и мыши идентифицировано около 20 генов, сцепленных с заболеваемостью сахарным диабетом типа I. Среди этих генов — *CTLA4*, *IL2*, *IL1*, *IL4*, *TCRA*, *TCRB*, *Ins* и т.д. Обращает на себя внимание наличие в этом списке генов цитокинов, цепей TCR, супрессорных факторов, инсулина.

Помимо генетических факторов большую роль в чувствительности к аутоиммунным заболеваниям играют эндокринные факторы и пол. Большинство аутоиммунных заболеваний чаще развивается у женщин, чем у мужчин (СКВ — в 10–20 раз чаще, рассеянный склероз — в 10 раз, аутоиммунные заболевания щитовидной железы — в 4–5 раз). В то же время МНС-I-зависимые аутоиммунные заболевания, наоборот, чаще развиваются у мужчин.

#### 4.4.1.3. Иммунологические механизмы повреждения при аутоиммунных процессах

Давно установлена связь развития аутоиммунных заболеваний с воспалительным процессом, а также перенесенными инфекционными заболеваниями. В этих случаях может происходить эктопическая экспрессия молекул МНС, что провоцирует презентацию аутоантигенов «молчащим» аутоспецифическим клонам.

Известно, что стимуляция через TLR способствует развитию иммунного ответа по Th1-пути. До недавнего времени считалось общепризнанным, что Th1-ориентация иммунного ответа благоприятствует развитию Т-клеточных органоспецифических аутоиммунных процессов, тогда как Th2-ориентация — развитию системных аутоиммунных процессов с преобладанием гуморальных иммунных факторов (например, СКВ).

Однако недавно было обнаружено, что развитие Т-клеточных аутоиммунных процессов, прежде всего аутоиммунного энцефаломиелита и ревматоидного артрита, контролирует субпопуляция Th17-клеток. Первые сведения на этот счет были получены в опытах с исключением гена TGFβ. Несмотря на то что при этом создаются условия для растормаживания аутоиммунных клонов и происходит усиление пролиферации Т-лимфоцитов, было выявлено блокирование развития аутоиммунного энцефаломиелита. Позже было показано, что TGFβ, наряду с IL-6, индуцирует дифференцировку Th17-клеток. Усиление образования Th17-клеток, синтезирующих IL-17 и IL-22, служит основным фактором, способствующим развитию аутоиммунного поражения ряда органов. Среди провоспалительных цитокинов, участвующих в патогенезе аутоиммунного воспаления, наибольшая роль принадлежит IL-6. Очевидно, это также обусловлено его способностью стимулировать дифференцировку Th17-клеток. Несмотря на то, что цитокины, продуцируемые Th1-клетками, подавляют развитие Th17-клеток, было обнаружено, что при аутоиммунных процессах Т-клетки одновременно продуцируют IL-17 и IFNγ. Роль последнего в качестве провоспалительного фактора общеизвестна.

Один из основных эффекторных механизмов, реализуемых при органоспецифических аутоиммунных процессах, — цитотоксический механизм, обусловленный активностью цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Он лежит в основе поражения β-клеток поджелудочной железы при инсулинзависимом

сахарном диабете. Цитотоксический механизм обуславливает локализованный тип поражения. Это связано с механизмом действия цитотоксических Т-лимфоцитов, индуцирующих апоптоз отдельных клеток. Как известно, клетка, вступающая на путь апоптоза, фагоцитируется еще до полной ее гибели, что предотвращает «загрязнение» межклеточного пространства внутриклеточными молекулами. В то же время поглощение макрофагами клеток-мишеней способствует поддержанию аутоиммунного процесса за счет презентации аутоантигенов другим  $CD8^+$  Т-клеткам.

Воспалительный тип иммунного ответа, связанный с активностью Th17- и особенно Th1-клеток (или их продукта  $IFN\gamma$ ), сопряжен с активацией макрофагов, выработкой ими активных форм кислорода, оксида азота, а также других субстанций, обладающих не только бактерицидной, но и цитотоксической активностью в отношении клеток организма. Не менее существенно выделение активированными макрофагами провоспалительных цитокинов, обуславливающих лизис костной и хрящевой ткани, размножение клеток соединительной ткани (формирование паннуса при ревматоидном артрите), а также развитие сосудистых проявлений, свойственных воспалительной реакции. Воспалительная симптоматика определяет клинические проявления многих аутоиммунных заболеваний. Иммунное воспаление, лежащее в основе многих аутоиммунных процессов, укладывается в картину гиперчувствительности замедленного типа [IV тип по классификации Р. Кумбса (*R. Coombs*) и П. Джелла (*P. Gell*) — см. далее].

При преобладании гуморального аутоиммунного ответа (при системных аутоиммунных заболеваниях) развитие процесса идет под преобладающим контролем Th2-клеток и картину иммунного поражения определяют реакции, вызываемые антителами. Основной патогенный потенциал этого процесса связан с образованием аутоантител классов IgG1 и IgG3, т.е. классов, благодаря особенностям строения Fc-области обладающих максимальной способностью привлекать различные эффекторные механизмы к реализации своего действия (в первую очередь комплемент, фагоциты и естественные киллеры). Один из 3 основных механизмов реализации эффекта аутоантител состоит в цитотоксическом действии (цитотоксический тип гиперчувствительности — II тип по Coombs и Gell).

Второй важнейший механизм реализации повреждающего эффекта антител обусловлен не их действием на клетки (прямым или опосредованным через другие клетки), а последствиями формирования свободных иммунных комплексов, которые при избыточном образовании не успевают элиминироваться макрофагами и откладываются в участках тканей, экспрессирующих Fc-рецепторы (в частности на базальных мембранах, стенках сосудов и др.) С помощью тех же участков (распознаваемых Fc-рецепторами) антитела привлекают и активируют макрофаги. В результате развивается локальное воспаление. Формируется иммунокомплексная патология (тип III по Coombs и Gell).

Третий механизм действия антител обусловлен эффектами, возникающими при взаимодействии антитела с клеткой-мишенью. Аутоантитела, реагирующие с молекулами поверхности клеток, могут оказывать как блокирующее, так и стимулирующее действие (в зависимости от особенностей молекулы-мишени и связанных с ней сигнальных путей). Так, при микседеме

аутоантитела к рецептору тиреотропного гормона, взаимодействуя с ним, блокируют его эффект, что выражается в гипотиреозидизме. При диффузном токсическом зобе (базедова болезнь) образуются аутоантитела к другим эпитопам той же молекулы, действующие подобно тиреотропному гормону, в результате чего развивается гипертиреозидизм. Поскольку этот эффект достигается накоплением аутоантител, а не тиреотропного гормона, при этом не срабатывает механизм отрицательной обратной связи, состоящий в подавлении выработки этого гормона в гипофизе и гипоталамусе.

#### 4.4.2. Аутоиммунные заболевания

Аутоиммунные процессы составляют основу группы заболеваний, также называемых аутоиммунными. Эта группа, объединяемая направленностью иммунных процессов против собственных клеток и тканей, гетерогенна по механизмам, степени распространенности и проявлениям. Различают органоспецифические (локальные) и системные аутоиммунные заболевания. В каждой из этих групп действуют различные эффекторные иммунопатологические механизмы, хотя в целом для системной патологии более характерно преобладание гуморальных факторов повреждения, а для локальных — Т-клеточных (особенно цитотоксических). Степень распространенности (локальная, системная) заболеваний и их связь с различными механизмами иммунного поражения представлена в табл. 4.8.

**Таблица 4.8.** Различия между органоспецифическими и системными аутоиммунными заболеваниями

Характеристика	Органоспецифические заболевания	Системные заболевания
Механизмы срыва аутоотолерантности	Нарушение периферической аутоотолерантности (воспаление, поликлональная стимуляция), дефицит регуляторных Т-клеток	Дефекты отрицательной селекции, стимуляция через рецепторы врожденного иммунитета и т.д.
Доступные концентрации аутоантигенов	Низкие	Обычно высокие
Органоспецифичность аутоантител	Есть	Нет
Преобладающий тип иммунопатологии (по Coombs и Gell)	IV	III
Характерные сочетания клинических синдромов	Аутоиммунное воспаление органов	Волчаночный синдром с гломерулонефритом, полиартрит
Экспериментальное моделирование	Введение аутоантигена в полном адьюванте Фрейнда	Линии животных с соответствующими генетическими дефектами

Основные закономерности реализации эффекторных аутоиммунных механизмов рассмотрены выше. Последствия описанных процессов для организма определяются функцией пораженного органа или ткани и их уникальностью. Типичное последствие — нарушение функции соответствующих органов или клеток. Наиболее ярко это проявляется при инсулинзависимом сахарном диабете, при котором происходит деструкция продуцирующих инсулин  $\beta$ -клеток островков Лангерганса. Дефицит этого гормона вызывает изменения метаболизма, а они формируют развивающуюся вследствие этого клиническую картину. В других случаях (токсический зоб) регистрируется, наоборот, усиление эндокринной функции щитовидной железы, и клиническую картину определяет избыток тиреоидных гормонов. При аутоиммунных процессах с преобладанием воспалительной составляющей именно воспаление определяет клиническую картину с болевой симптоматикой и нарушением функций органов. Наконец, генерализованное поражение соединительной ткани, типичное, например, для СКВ, вызывает глубокие нарушения гомеостаза, неуклонно приводящие к гибели организма.

В соответствии с доминированием иммунологических факторов в патогенезе аутоиммунных заболеваний основу их лечения составляет сдерживание иммунологических процессов с помощью иммунодепрессивной терапии (использование глюкокортикоидов, цитостатических препаратов, а также использование противовоспалительных лекарственных средств, включая антицитокиновую терапию — см. раздел 4.8.3.1).

Рассмотрим очень кратко наиболее важные примеры аутоиммунных заболеваний с преимущественным акцентом на особенностях их иммуннопатогенеза.

#### 4.4.2.1. Органоспецифические аутоиммунные заболевания

##### *Инсулинзависимый сахарный диабет типа I*

Это одно из самых распространенных и тяжелых аутоиммунных заболеваний (выявляют у 5–10% населения). Инсулинзависимый сахарный диабет типа I — хроническое заболевание, основу которого составляет разрушение  $\beta$ -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы. Это обуславливает возникновение дефицита инсулина, что приводит к гипергликемии, кетоацидозу и другим нарушениям метаболизма. В развитии заболевания большую роль играет генетическая предрасположенность и инфекционные факторы (вирусы, токсины). Природа аутоантигенов при этом заболевании твердо не установлена. Основные «кандидаты» на эту роль — декарбоксилаза глутаминовой кислоты и белок р40.

Главный фактор иммунного поражения — аутоспецифические цитотоксические Т-лимфоциты. Дендритные клетки захватывают аутоантигены, высвобождаемые из  $\beta$ -клеток, и презентуют их  $CD4^+$  Т-лимфоцитам, которые дифференцируются в  $Th1$ -клетки и начинают синтезировать  $IFN\gamma$ , в свою очередь активирующий макрофаги. Одновременно дендритные клетки презентуют аутоантиген  $CD8^+$  Т-клеткам. Эти Т-лимфоциты пролиферируют под влиянием IL-2 (основной его источник —  $Th1$ -клетки) и дифференцируются в цитотоксические Т-лимфоциты, которые и вызыва-

ют повреждение поджелудочной железы. Цитотоксические Т-лимфоциты вызывают цитолиз  $\beta$ -клеток по перфориновому механизму и путем индукции Fas-зависимого апоптоза. О важной роли Th1-зависимого механизма поражения  $\beta$ -клеток с участием макрофагов свидетельствует тот факт, что в отсутствие макрофагов повреждение  $\beta$ -клеток, обусловленное сенсibilизацией Т-клеток, значительно ослабляется. Макрофаги выделяют активные формы кислорода и азота, а также другие субстанции, цитотоксические для  $\beta$ -клеток. Даже IL-1 $\beta$ , синтезируемый макрофагами, является цитотоксическим агентом для  $\beta$ -клеток, экспрессирующих рецепторы для этого цитокина. При сахарном диабете типа I выявляют антитела к различным антигенам, в том числе к инсулину, однако их патогенетическая роль не установлена.

Другой вариант сахарного диабета — инсулиннезависимый сахарный диабет (сахарный диабет типа II) развивается, как правило, в пожилом возрасте. Его основой является образование антител к рецепторам для инсулина. Таким образом, в этом случае нарушается восприятие сигнала от инсулина при неизменной продукции этого гормона. Естественно, что в этом случае применение препаратов инсулина для лечения неэффективно.

#### *Аутоиммунные заболевания щитовидной железы*

Характерные проявления аутоиммунной органоспецифической патологии — поражение щитовидной железы в трех основных формах: тиреоидит Хашимото, первичная микседема и тиреотоксикоз (базедова болезнь, или болезнь Грейвса). Из этих заболеваний два первых сопровождаются гипотиреозом, а последнее — гипертиреозом.

Все они, как правило, сопровождаются увеличением щитовидной железы — формированием зоба. При тиреотоксикозе в качестве аутоантигена выступают мембранные рецепторы клеток для тиреотропного гормона. Связывание с ними аутоантител вызывает активацию клеток (что вообще не является редкостью при действии антител на рецепторы). Аутоантиген при тиреоидите Хашимото — внутриклеточный белок тиреоглобулин. Нередко определяются единичные нуклеотидные замены в кодирующем ее гене. Некоторые из этих замен ассоциированы с развитием аутоиммунного поражения железы. При микседеме в качестве аутоантигенов могут выступать различные белки поверхности клетки и цитоплазмы, в том числе коллоидный антиген СА2. Аутоантитела при этих заболеваниях подавляют образование и секрецию гормонов, а гипертрофия железы связана с увеличением размера клеток.

#### *Рассеянный склероз*

Это хроническое аутоиммунное демиелинизирующее заболевание с разнообразной неврологической симптоматикой.

Согласно аутоиммунной теории, ключевое событие в патогенезе рассеянного склероза — срыв аутоотолерантности к антигенам миелина и активация аутореактивных Т-клеток, распознающих его эпитопы. Возможный механизм — молекулярная мимикрия вирусных антигенов под антигены миелина, что ведет к перекрестной реакции вирусспецифических Т-клеток на аутоантигены, особенно на фоне недостаточности регуляторных Т-клеток и других контрольных механизмов. В результате происходит активация

преимущественно  $CD4^+$  Т-лимфоцитов по Th1-типу.  $CD8^+$  Т-клетки также участвуют в патогенезе рассеянного склероза. Активированные аутореактивные Т-клетки проникают через посткапиллярные венулы в периваскулярные пространства ЦНС. Цитокины, вырабатываемые аутореактивными Th1-клетками ( $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ ), активируют клетки эндотелия и резидентные периваскулярные макрофаги. Хемокины, продуцируемые комплексом активированных клеток, способствуют привлечению из кровотока дендритных клеток, моноцитов/макрофагов, Т-клеток и В-клеток.  $IFN\gamma$ , секретируемый Th1-лимфоцитами, активирует макрофаги и микроглию, вырабатывающие миелинотоксические субстанции. Все это ведет к развитию воспаления, демиелинизации и повреждению аксонов. В соответствии с нейродегенеративной теорией, аутоиммунный компонент присоединяется на поздних этапах заболевания на изменение антигенной структуры клеток (особенно олигодендроцитов), обусловленные их дегенеративным повреждением под влиянием персистирующей вирусной инфекции ЦНС.

Основное морфологическое проявление рассеянного склероза — бляшки, формирующиеся в нервной ткани. Развитая форма бляшек (острые активные бляшки) представляет собой периваскулярные муфты, образованные мигрирующими из посткапиллярных венул Т-лимфоцитами, активированными макрофагами и клетками микроглии. Развитие бляшек в тканях головного мозга сопровождается разрушением миелина. Иногда бляшки исчезают, но вместо ремиелинизации происходит формирование астроглиального рубца.

### ***Ревматоидный артрит***

Хроническое аутоиммунное заболевание нескольких суставов, характеризующееся воспалением синовиальной оболочки и приводящее к разрушению хряща и кости. Заболевание выявляют у 1% населения Земли. Женщины болеют в 2–3 раза чаще мужчин. Основа патогенеза ревматоидного артрита — аутоиммунные процессы клеточного и гуморального типа. Индукторами аутоиммунного процесса могут быть бактерии, вирусы, суперантигены. Ведущий морфологический признак ревматоидного воспаления — гиперплазия синовиальной оболочки (паннус), интенсивный рост которой приводит к разрушению кости и хряща. В синовиальной ткани выявляют Т-клетки, макрофаги и дендритные клетки, плазмодиты. В синовиальной жидкости содержится много нейтрофилов, а также большое количество иммунных комплексов и провоспалительных цитокинов.

Аутоиммунный гуморальный ответ при ревматоидном артрите складывается из синтеза ревматоидного фактора (РФ), а также антител к коллагену II, цитруллиновым белкам и ряду других аутоантигенов. РФ представляет собой анти-IgG-антитела изотипов IgM (естественные антитела), IgA и IgG (индуцированные патогенные антитела). Небольшие по размерам димеры IgG-РФ проникают в сустав, локализуются в синовиальной ткани и могут образовывать иммунные комплексы, активирующие систему комплемента и индуцирующие образование цитокинов мононуклеарными клетками в синовиальной ткани. Ревматоидный фактор выявляют у 70–80% больных ревматоидным артритом. Он играет роль не в инициации, а в

прогрессировании патологического процесса. Патогенетически значимыми считают антитела к цитруллиновым белкам — протеинам, в которых произошла посттрансляционная замена С-концевого аргинина на цитруллин (при участии фермента пептидиларгининдеиминазы-4). Эти антитела обнаруживают у 60–70% больных ревматоидным артритом; у здоровых лиц и при других заболеваниях они отсутствуют. Путем введения цитруллиновых белков лабораторным животным удается вызвать экспериментальный аутоиммунный артрит. Пептиды, содержащие цитруллин, хорошо встраиваются в антигенсвязывающий желобок молекулы HLA-DRB1, с экспрессией гена которой ассоциирована заболеваемость ревматоидным артритом. Цитруллиновые белки способны индуцировать как Т-клеточный, так и гуморальный иммунный ответ.

Среди клеток иммунной системы в патогенезе ревматоидного артрита наибольшую роль играют  $CD4^+$  Т-клетки, синтезирующие провоспалительные цитокины, которые активируют макрофаги, нейтрофилы и другие клетки. Синовиальные фибробласты и макрофаги могут быть активированы через TLR экзогенными (пептидогликан и др.) и эндогенными (продукты распада клеток, белки теплового шока, цитруллиновые белки) молекулами. Существенный вклад в разрушение сустава вносят активные формы кислорода и ферменты лизосом, выделяемые нейтрофилами и макрофагами.

### ***Болезнь Аддисона***

Болезнь Аддисона — аутоиммунный процесс, ведущий к разрушению коры надпочечников, недостаточной продукции глюкокортикоидов, минералокортикоидов и половых гормонов. Она часто сопровождается другими аутоиммунными заболеваниями: пернициозной анемией, тиреоидитом, сахарным диабетом типа I. При аутоиммунном полиэндокринном синдроме болезнь Аддисона сочетается с гипопаратиреоидизмом и хроническим слизисто-кожным кандидиазом.

### ***Псориаз***

Дендритные клетки доставляют потенциальные аутоантигены (белки кератиноцитов) в региональный лимфатический узел и активируют  $CD4^+$  Т-клетки, тем самым индуцируя развитие иммунного ответа. Активированные лимфоциты, дифференцируясь в Th1-хелперы, приобретают кожный лимфоцитарный антиген (CLA) и хемокиновые рецепторы (CCR4, CCR10), что определяет их миграцию в кожу. Параллельно дифференцируются цитотоксические  $CD8^+$  Т-лимфоциты, также мигрирующие в кожу.  $CD4^+$  Т-клетки мигрируют преимущественно в дерму, а  $CD8^+$  Т-клетки — в эпидермис. В коже Т-лимфоциты контактируют с дендритными клетками и клетками Лангерганса и под их влиянием продуцируют  $TNF\alpha$  и  $IFN\gamma$ , от которых в значительной степени зависит иммунопатологическая картина поражения кожи. В повреждении ткани участвуют цитотоксические Т-клетки, а также нейтрофилы. Изменения в очагах повреждения складываются из нарушения базальной мембраны и десмосом кератиноцитов, а также восстановительных процессов под влиянием ростовых факторов, секретируемых кератиноцитами и активированными Т-клетками. При этом может формироваться порочный круг, обуславливающий необратимый характер патологического процесса.

**Витилиго**

Основа заболевания — локальная депигментация кожи. Дерма в участках депигментации инфильтрирована  $CD8^+$  и, в меньшей степени,  $CD4^+$  Т-клетками, экспрессирующими молекулу хоминга для кожи — CLA. Эти Т-клетки активированы: они экспрессируют HLA-DR и CD25, синтезируют  $IFN\gamma$ .  $CLA^+$  цитотоксические Т-лимфоциты распознают антигены меланоцитов (в особенности Melan-A/MART1) и способны вызывать цитоллиз этих клеток. Эндотелиоциты и кератиноциты в зоне поражения также активированы и экспрессируют молекулы ICAM-1, что способствует миграции лимфоцитов, которые выявляются в зоне повреждения кожи, в местах исчезновения меланоцитов. У больных витилиго выявляют также аутоантитела к аутоантигенам меланоцитов и ферментам, участвующим в синтезе меланина, которые могут вызывать комплементзависимый лизис, а также опосредовать антителозависимый NK-клеточный лизис меланоцитов. Специфический лизис меланоцитов цитотоксическими Т-лимфоцитами и, возможно, антителами считают основным механизмом развития витилиго.

**Миастения гравис**

Аутоиммунное заболевание, опосредованное аутоантителами к ацетилхолиновому рецептору никотинового типа (AChR). Этот рецептор обеспечивает передачу нервного импульса с двигательного нерва на поперечно-полосатые мышцы. Нарушение нервномышечной передачи обуславливает симптоматику заболевания — выраженную мышечную слабость вплоть до нарушения работы диафрагмы, приводящую к нарушению дыхания. Помимо антител к названному рецептору, при миастении гравис выявляют антитела к актину, миозину. У 70% больных выявляют аномалии в тимусе и развитие в нем опухолей. Важную роль в индукции аутоиммунного процесса играют миоидные клетки тимуса, несущие на поверхности AChR.

**Болезнь Крона**

Болезнь Крона — тяжелое аутоиммунное заболевание тонкой кишки, характеризующееся трансмуральным воспалением с образованием лимфоидных агрегатов и гранул из синцития и эпителиоподобных клеток. У части больных выявляют точечные мутации в гене *NOD2*, что нарушает передачу сигнала через этот рецептор. В норме сигналы, генерируемые при взаимодействии NOD-2 с мурамилдипептидом бактерий, ингибируют сигналы от связывания пептидогликанов с мембранным рецептором TLR-2. Функциональная инактивация NOD-2 обуславливает чрезмерную выраженность передачи сигнала через TLR-2, что определяет интенсивное развитие воспаления с повреждением слизистой оболочки тонкой кишки провоспалительными цитокинами (в частности,  $IFN\gamma$ ). Кроме того, дефект гена *NOD2* приводит к ослаблению синтеза дефензинов эпителиальными клетками кишечника и клетками Панета, что благоприятствует размножению патогенов.

**4.4.2.2. Системные аутоиммунные заболевания****Склеродермия**

Мультисистемное аутоиммунное заболевание, характеризующееся фиброзом, пролиферативно-облитерирующими микроангиопатиями, пора-

жением кожи и внутренних органов (легких, сердца, почек, органов пищеварения) с аутоиммунной природой нарушений. Первым происходит поражение сосудов, приводящее к ишемии, повреждению эндотелия и тромбозу. Активированные тромбоциты выделяют тромбоцитарный ростовой фактор — PDGF (*Platelet-derived growth factor*), вызывающий дифференцировку и пролиферацию фибробластов, что служит основой для последующего развития фиброза. IL-4 и IL-13, секретируемые Th2-клетками, а также TGFβ, продуцируемый активированными макрофагами, усиливают образование коллагена. Развивается склероз соединительной ткани и облитерация сосудов.

При склеродермии выявляют антинуклеарные антитела и антитела к белкам соединительной ткани (топоизомеразе, фибриллину-1), вносящие вклад в развитие склероза и фиброза. Так, антитела к фибриллину-1 активируют фибробласты, усиливают экспрессию компонентов внеклеточного матрикса, включая металлопротеазы, способствуют выходу TGFβ из депо. Все это благоприятствует развитию фиброза.

Среди цитокинов, вырабатываемых в очаге поражения, наибольшую патогенетическую роль играют TGFβ, упомянутые Th2-цитокины и хемокин MCP-1, привлекающий фибробласты. Th1-цитокины (IFNγ, TNFα), наоборот, ингибируют фиброгенез. Таким образом, склеродермия — заболевание с преобладанием фиброгенного фактора TGFβ и Th2-цитокинов, способствующих развитию аутореактивных В-клеток к синтезу аутоантител.

### ***Синдром Шегрена***

Хроническое аутоиммунное заболевание, поражающее слезные, слюнные и околоушные железы, а позже — мышечную ткань, сосуды, почки, нервную систему. Названные экзокринные железы инфильтрируются активированными Т- и В-лимфоцитами. Главную роль в дисфункции этих желез играют аутореактивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки. В поликлональной активации В-клеток важную роль играет цитокин BAFF. Патогенетическая роль аутоантител не установлена, но их определение используют в диагностике заболевания.

### ***Системная красная волчанка (СКВ)***

Тяжелое аутоиммунное системное заболевание, сопровождающееся высокой смертностью. Этиология СКВ неизвестна. Вероятнее всего, заболевание обусловлено сочетанием разнообразных этиологических факторов (прежде всего вирусной инфекции) с кофакторами, такими как гормональный дисбаланс с преобладанием эстрогенов (более 90% больных СКВ — женщины), ультрафиолетовым излучением и др.

Основой патогенеза СКВ служат множественные иммунологические расстройства, взаимосвязанные и взаимно усиливающие друг друга, среди которых не удастся выделить ведущий фактор. Для иммунопатогенеза СКВ характерно преобладание аутоиммунных воспалительных процессов. Наиболее яркое проявление иммунологических нарушений — образование аутоантител к множеству (более 100) аутоантигенов, среди которых доминируют аутоантитела к двуспиральной ДНК (выявляют у 95% больных). Взаимодействие аутоантител с аутоантигенами приводит к формированию иммунных комплексов. При дефиците комплемента, свойственно-го СКВ, элиминация комплексов, содержащих мало C3b, замедляется.

Взаимодействие иммунных комплексов с Fc-рецепторами типа FcγRIIA (CD32) на поверхности В-клеток является одним из факторов активации В-лимфоцитов.

Другой патогенетический механизм СКВ связан с усилением апоптоза, вызванным экспрессией рецепторов и лигандов, ответственных за запуск этого процесса. Апоптотические клетки фагоцитируются окружающими клетками, что приводит к накоплению в фаголизосомах большого количества нуклеосом. Распознавание ДНК в фаголизосомах рецепторами TLR-9 (особенно в плазмощитоидных дендритных клетках), индуцирует запуск сигнальных путей, приводящих к экспрессии IFNα. Значительная стимуляция выработки этого цитокина вносит вклад в развитие иммунологического дисбаланса (в частности, усиленную дифференцировку Th2-клеток), что тоже способствует гиперактивации В-лимфоцитов. Наконец, повышению активности В-клеток способствует усиление выработки фактора BAFF дендритными клетками и макрофагами. О ведущей роли гиперактивации В-клеток в патогенезе СКВ свидетельствует положительный эффект лечения, направленного на элиминацию этих клеток (например, применение ритуксимаба — моноклональных антител анти-CD20). Активация Т-клеток усиливается вследствие усиленной экспрессии костимулирующей молекулы CD40 на дендритных клетках, В-лимфоцитах и некоторых других клетках микроокружения. Активация по аналогичному механизму миелоидных клеток сопровождается усиленной выработкой TNFα и IL-1β, что вызывает и поддерживает воспалительные процессы.

При СКВ выявляют аутоантитела к фосфолипидам, кардиолипину и другим липидным факторам. С накоплением этих антител связывают развитие антифосфолипидного синдрома, характерного для СКВ. Однако основным проявлением патологии при СКВ, обычно приводящим к смерти, служит поражение почек — волчаночный нефрит. Основа этого повреждения — васкулит, возникающий при отложении в сосудах клубочков иммунных комплексов (гиперчувствительность III типа). Причиной волчаночного нефрита может быть прямое повреждающее действие аутоантител, реагирующих с антигенами почки (гиперчувствительность типа II). Аутоиммунный васкулит служит основой также для поражения легких (пневмонит), суставов, кожи и слизистых оболочек. Таким образом, СКВ — полиэтиологическое и полипатогенетическое заболевание, однако все компоненты патогенеза в той или иной степени восходят к активации В-клеток и усиленной выработке аутоантител, прежде всего к двуспиральной ДНК с последующим формированием иммунных комплексов и повреждением тканей.

## 4.5. ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Под гиперчувствительностью понимают неадекватно сильное проявление иммунных процессов, способное вызвать повреждение тканей организма.

До настоящего времени востребована классификация гиперчувствительности, предложенная П. Джеллом (*P. Gell*) и Р. Кумбсом (*R. Coombs*) в 1969 г., несмотря на ее ограниченность и неполное соответствие современным представлениям об иммунопатологических механизмах нарушений, вызванных гиперчувствительностью (табл. 4.9, рис. 4.25).

Таблица 4.9. Основные типы реакции гиперчувствительности (по P. Gell, R. Coombs, 1969)

Показатель	Тип I	Тип II	Тип III	Тип IV
Название реакции	Анафилактическая (гиперчувствительность немедленного типа)	Цитотоксическая	Иммунокомплексная	Гиперчувствительность замедленного типа
Антиген	Растворимый, обычно экзогенный	Связан с поверхностью клетки	Внеклеточный, растворимый	Растворимый, презентуется антигенпрезентирующими клетками
Распознающая структура	IgE-антитела	Антитела субтипов IgG1, IgG3	Обычно — IgG-антитела	TCR
Эффекторный механизм	Выброс активных молекул тучными клетками	Комплемент-зависимый цитолиз	Реакция на отложение иммунных комплексов	Клеточноопосредованная реакция (эффекторы — макрофаги)
Срок развития реакции	Ранняя фаза — 5–30 мин, поздняя фаза — от 2 ч до 2 сут	2–5 ч	3–8 ч	24–48 ч
Примеры	Атопическая бронхиальная астма, аллергический ринит, поллиноз, атопический дерматит, анафилактический шок, крапивница и др.	Гемолитическая анемия, агранулоцитоз, тромбоцитопения, некоторые формы миокардитов	Иммунокомплексный гломерулонефрит, системная красная волчанка, узелковый периартериит	Контактный дерматит, некоторые формы лекарственной аллергии, реакции на туберкулин, ревматоидный артрит, гранулемы при шистосоматозе

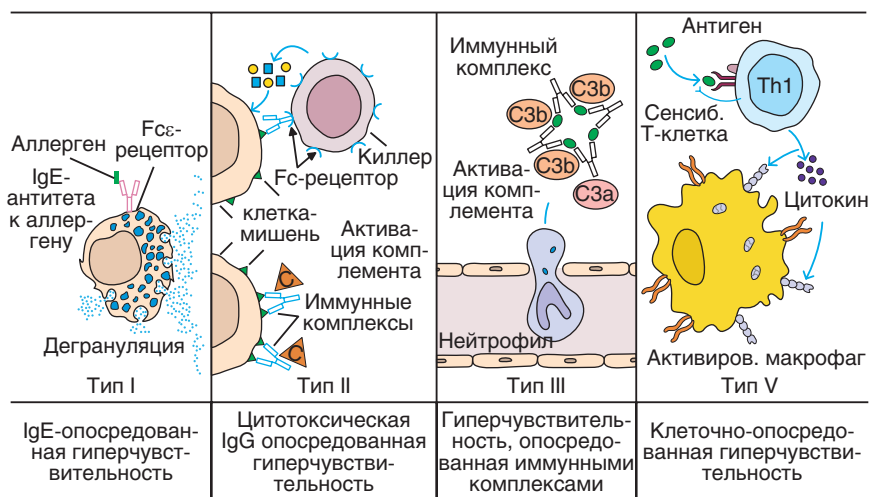


Рис. 4.25. Основные типы гиперчувствительности (классификация P. Gell и R. Coombs)

В соответствии с этой классификацией выделяют 4 основных типа реакций гиперчувствительности:

- 1-й тип — **гиперчувствительность немедленного типа**. Обусловлена освобождением активных субстанций из тучных клеток, сенсibilизированных IgE-антителами, при связывании ими аллергена.
- 2-й тип — **гиперчувствительность, обусловленная цитотоксическим эффектом** антител, вовлекающих комплемент или эффекторные клетки.
- 3-й тип — **иммунокомплексная реакция**. Обусловлена провоспалительным действием растворимых иммунных комплексов.
- 4-й тип — **гиперчувствительность замедленного типа**. Связана с активностью провоспалительных Т-лимфоцитов и активируемых ими макрофагов, а также цитокинов, секретируемых названными клетками.

#### 4.5.1. Аллергия немедленного типа (гиперчувствительность I типа)

Под аллергией понимают неадекватную по интенсивности реакцию на повторное введение молекул, называемых аллергенами. Повышенную чувствительность к повторному парентеральному введению препаратов для вариоляции, проявлявшуюся в виде сыпи и эритемы, впервые описал Р. Суттон (*R. Sutton*) в 1790 г. В 1902 г. Ш. Рише (*C. Richet*) и Ж. Портье (*G. Portier*) описали **анафилактический шок**, развившийся при повторной инъекции собакам экстрактов из шупалец морских актиний. Введенный ими термин «анафилаксия» (от лат. *ana phylaxis*) переводится как «противозащита». Термин «аллергия» предложил К. Пирке (*C. Pirquet*) в 1906 г. (от лат. *allos ergon* — «другое действие»). Решающий вклад в раскрытие механизмов аллергии внесло установление природы **реагинов** — аллергических антител. К. Ишизака (*K. Ishizaka*) в 1966 г. установил, что они относятся к классу IgE. Беспрецедентный рост частоты аллергических заболеваний (до 10–30% населения) привлек к аллергологии всеобщее внимание и сделал ее самым клинически востребованным разделом иммунологии.

##### 4.5.1.1. Общая схема развития и проявления аллергических процессов

Аллергические процессы состоят из двух фаз: **сенсibilизации** и проявления аллергических реакций. Обе фазы запускаются введением особой разновидности антигенов — **аллергенов**.

Сенсibilизация состоит в индукции гуморального иммунного ответа, обязательной составляющей которого должно быть образование антител класса IgE. IgE-антитела фиксируются на поверхности тучных клеток, экспрессирующих высокоаффинные рецепторы FcεRI, с которыми эти антитела взаимодействуют. При развитии сенсibilизации какие-либо проявления аллергии отсутствуют.

**Аллергические реакции** развиваются быстро (в течение минут) в ответ на введение в организм вещества, с которыми могут взаимодействовать IgE-антитела, фиксированные на тучных клетках. Это может быть аллерген, использованный для сенсibilизации или перекрестно-реагирующие аллергены. Выделяют 3 стадии развития аллергической реакции немедленного типа:

- **иммунологическую** (фаза иммунных реакций);
- **патохимическую** (фаза биохимических реакций);

— **патофизиологическую** (фаза патологических реакций, определяющих внешние проявления аллергии).

На первой стадии аллерген взаимодействует с рецепторами FcεRI на поверхности тучных клеток, при этом происходит перекрестное сшивание комплексов антитело—рецептор и запуск активирующего сигнала в тучную клетку. На следующей (патохимической стадии) происходит дегрануляция тучных клеток, сопровождающаяся выбросом гистамина и других активных субстанций, содержащихся в гранулах, и последующим синтезом эйкозаноидов. Ответ клеток окружающих тканей (сосудистого эндотелия, гладких мышц, слизистых оболочек, желез, нервных окончаний) составляет патофизиологическую фазу и непосредственно участвует в формировании немедленной аллергической реакции.

Ранняя (немедленная) фаза гиперчувствительности развивается в первые минуты после воздействия аллергена. Она может прекратиться быстро — в пределах часа. Ранние проявления аллергических реакций зависят от пути поступления аллергена и локализации патологического процесса. Различают системные и местные аллергические реакции.

Для системных реакций характерны 2 разновидности — анафилактический шок и крапивница. Анафилактический шок в эксперименте на морских свинках воспроизводят после предварительной сенсибилизации животного антигеном. Введение разрешающей дозы (обычно внутривенное) через 10–20 сут после сенсибилизации вызывает быструю реакцию, развивающуюся в пределах нескольких минут. Она проявляется беспокойством, взъерошиванием шерсти, затрудненным дыханием, кашлем, почесыванием, мочеиспусканием. Затем животное погибает или через 15–20 мин симптоматика проходит. В основе наблюдаемых эффектов лежит расширение сосудов, повышение их проницаемости, падение кровяного давления, спазм гладкой мускулатуры под влиянием гистамина и других молекул, выделяемых тучными клетками. Анафилактический шок может развиваться и у человека, например, при введении лекарственных средств на фоне сенсибилизации к ним или при укусах и ужалении насекомыми.

**Крапивница** обычно развивается в ответ на контакт аллергена с кожей или слизистыми оболочками. Она проявляется в развитии кожной реакции (гиперемия, сыпь, волдыри) с зудом.

Местные проявления, чаще всего затрагивают слизистые оболочки, кожу и бронхи. На коже формируются волдыри и сыпь. При поражении слизистых оболочек преобладает повышенная продукция слизи и секретов, в бронхах развивается спазм гладкой мускулатуры. Описано несколько вариантов воспроизведения местных проявлений аллергии. **Реакция Праустница—Кюстнера:** людям-добровольцам внутрикожно вводят сыворотку больных аллергией, а через 24–48 ч на это место наносят аллерген; при этом развивается кожная реакция в виде эритемы или волдыря. **Феномен Овери:** морским свинкам, предварительно сенсибилизированным яичным альбумином, внутривенно вводят этот же белок вместе с синькой Эванса; вследствие местного повышения проницаемости сосудов и выхода из него краски происходит прокрашивание участка кожи, вовлеченного в реакцию. **Реакции Шульца—Дейла (*in vitro*):** при действии аллергена на фрагмент

кишечника или рога матки, полученных от сенсибилизированной свинки, происходит сокращение гладкой мускулатуры.

В основе местных проявлений аллергии лежат несколько процессов.

- Местное расширение сосудов. Оно проявляется быстро и обусловлено действием гистамина и других преобразованных факторов, несколько позже — эйкозаноидов (особенно LTC<sub>4</sub>). Видимое проявление — покраснение.
- Повышение проницаемости сосудов. Его причина состоит в сокращении сосудов под действием гистамина, лейкотриенов и фактора агрегации тромбоцитов (PAF). Приводит к развитию отека, способствует экстравазации клеток крови. Локальное нарушение проницаемости с формированием лейкоцитарных экссудатов и геморагий составляет основу кожных высыпаний. Скопление жидкости в субэпидермальном пространстве — морфологическая основа волдырей.
- Спазм гладкой мускулатуры, в особенности бронхов. Спазм вызывают эйкозаноиды (лекотриены C<sub>4</sub> и D<sub>4</sub>, простагландин D<sub>2</sub>, PAF), в меньшей степени гистамин. Проявление — астматический приступ (приступ бронхоспазма).
- Гиперпродукция слизи (носовой, бронхиальной) и других секретов (например, слез). Вызывается лейкотриенами. Сопутствует бронхоспазму или служит самостоятельным проявлением аллергической реакции. Аналогичные явления в кишечнике вызывают диарею.
- Раздражение нервных окончаний, приводящее к развитию зуда и боли. За развитие зуда отвечает гистамин, а за возникновение боли — тромбоксан A<sub>2</sub>. Кинины тоже вовлечены в эти процессы.

Аллергическая реакция не ограничивается только ранней фазой. Стимуляция тучных клеток и Т-лимфоцитов приводит к секреции ими цитокинов, привлекающих из кровотока в очаг поражения эозинофилы, базофилы и нейтрофилы. Эти клетки (прежде всего эозинофилы) отвечают за развитие отложенной фазы аллергической реакции. Ее проявления — отек с уплотнением ткани, покраснение, боль. Поздняя фаза аллергической реакции отражает развитие особой формы воспаления — аллергического воспаления. Это воспаление вызывается клетками, привлекаемыми из кровотока цитокинами, секретируемыми в очаге аллергии тучными клетками и Th2-лимфоцитами. Значительный вклад в развитие поздней фазы аллергии немедленного типа вносят цитокины, секретируемые мигрирующими клетками.

При хроническом течении аллергических процессов под влиянием аллергического воспаления и цитокинов (в особенности IL-13) происходит перестройка тканей в очаге поражения — ремоделирование. Особенно характерны эти процессы для бронхиальной астмы. Они состоят в атрофии, истончении эпителиального слоя с одновременной гипертрофией соединительнотканного и мышечного слоя слизистой оболочки. Эти изменения усугубляют и стабилизируют нарушение функции бронхов.

#### 4.5.1.2. Аллергены

Аллергенами называют вещества, которые при первом поступлении в организм вызывают образование антител класса IgE, а при последующем вве-

дении — дегрануляцию тучных клеток, сенсibilизированных IgE-антителами. Фактически аллергены — это разновидность антигенов. Структурные признаки аллергенов, т.е. особенности молекул, определяющие их аллергенность, строго не определены. Обычно аллергены являются полипептидами или белками с молекулярной массой 5–15 кДа. Они могут иметь самую разнообразную структуру: известно более 120 семейств белков, к которым могут принадлежать аллергены. Проявлению аллергенности благоприятствует наличие протеазной активности (например, у клещевых аллергенов домашней пыли), способность взаимодействовать с липидами (например, у пищевых антигенов растительного и животного происхождения) и различными другими лигандами, а также способность проникать через тканевые барьеры и обеспечивать перекрестное сшивание молекул IgE, связанных с рецепторами FcεRI. Проявлению аллергенности молекул способствует их введение в низких дозах, поступление в организм через слизистые оболочки и т.д. Получены рекомбинантные формы белковых аллергенов, однако их аллергенная активность, как правило, ниже, чем у естественных аллергенов. К аллергенам относят также низкомолекулярные вещества (например, лекарственные), проявляющие свое действие, образуя комплексы с белками организма.

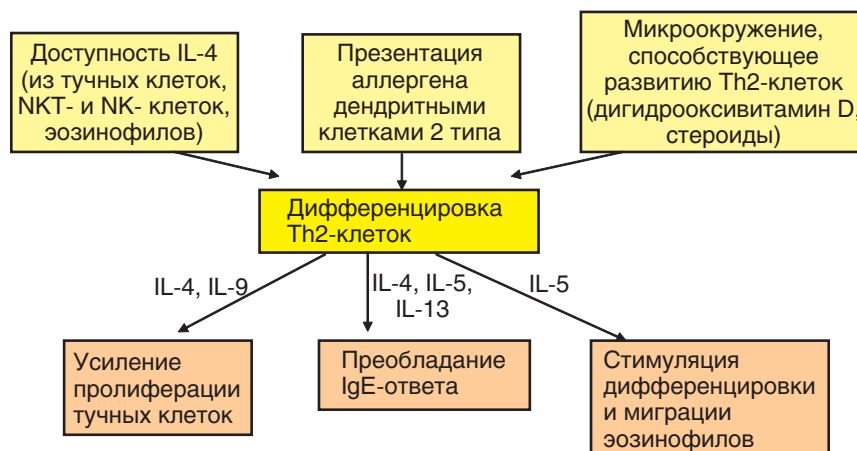
Удовлетворительные классификации аллергенов отсутствуют. По происхождению их можно разделить на аллергены животного, растительного происхождения, микробные и синтетические, по путям поступления в организм — на ингаляционные (аэроаллергены), пищевые, инъекционные. Иногда выделяют лекарственные аллергены, которые по происхождению могут быть природными (из микроорганизмов — антибиотики) или синтетическими. Характерные примеры — аллергены клещей рода *Dermatophagoides*, содержащихся в домашней пыли, аллергены пыльцы амброзии, березы (аэроаллергены), перхоти животных, яда насекомых. Для сокращенного обозначения аллергенов растительного и животного происхождения используют формулу, включающую название рода (3 первые буквы), вида [четвертая (строчная) буква] и порядковый номер, иногда с уточнением изоформы. Например, *Amb a 1* — аллерген 1 из *Ambrosia artemisiifolia*, *Der p 2* — аллерген 2 из клеща *Dermatophagoides pteronyssinus*.

#### 4.5.1.3. Индукция аллергического иммунного ответа

Под аллергическим иммунным ответом следует понимать Th2-зависимый гуморальный иммунный ответ, при котором образуются антитела IgE-класса. Аллергический иммунный ответ служит предпосылкой развития аллергических реакций (при условии повторного поступления аллергена).

##### *Th2-зависимый иммунный ответ как основа аллергии*

Т-клеточный контроль аллергического ответа характеризуется доминирующим влиянием Th2-клеток на его развитие (рис. 4.26). При развитии первичного ответа на аллергены факторами, благоприятствующими формированию Th2-ответа, служат условия микроокружения дендритных клеток, поглощающих аллерген в слизистых оболочках. Наиболее существенно при этом отсутствие классических воспалительных стимулов, приводящих в формированию дендритных клеток типа DC1, а также действие на дендритные клетки IL-10, продуцируемого тучными клетками. В результате формиру-



**Рис. 4.26.** Th2-контроль развития аллергии немедленного типа. Условия, благоприятствующие Th2-ответу, его продукты (цитокины) и проявления

ются дендритные клетки типа DC2 — продуценты IL-4 (а не IL-12, как при воспалительном иммунном ответе). DC2-клетки мигрируют в региональный лимфатический узел и, презентуя антиген CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам в присутствии IL-4, направляют их развитие по линии Th2-клеток. Недавно выявлены особенности «аллергических» Th2-клеток, главная из которых состоит в секреции наряду с классическими Th2-цитокинами провоспалительного цитокина TNFα. Для развития таких клеток необходима секреция цитокина TSLP (*Thymic stromal lymphopoietin*) эпителиальными клетками слизистых оболочек и кожи. Он индуцирует экспрессию костимулирующей молекулы OX40L на дендритных клетках — индукторах Th2-лимфоцитов. Костимуляция через рецептор этой молекулы OX40, экспрессируемый Т-клетками, и обеспечивает дифференцировку аллергических Th2-клеток.

При последующем поступлении аллергена его презентация дендритными клетками DC2 или В-лимфоцитами Т-клеткам памяти может происходить на месте, обычно в слизистых оболочках. В этом случае в еще большей степени проявляется эффект микроокружения, способствующего дифференцировке Th2-клеток: наличие источников IL-4 (цитокина, который служит основным индуктором Th2-ответа), присутствие стероидов, благоприятствующих дифференцировке Th2-клеток (дигидрооксивитамина D) и т.д. В качестве источника IL-4, необходимого для запуска дифференцировки Th2-клеток, выступают тучные клетки, NK- и NKT-клетки, а также эозинофилы, если они присутствуют в микроокружении. Перечисленные выше условия наиболее полно реализуются в слизистых оболочках, служащих оптимальным местом развития и реализации аллергических реакций немедленного типа.

#### **Аллергические IgE-антитела**

Главная особенность гуморального иммунного ответа на аллергены — более существенный вклад IgE-антител, чем при неаллергическом иммунном ответе. Переключение С-генов иммуноглобулинов на ген Сε, кодирующий

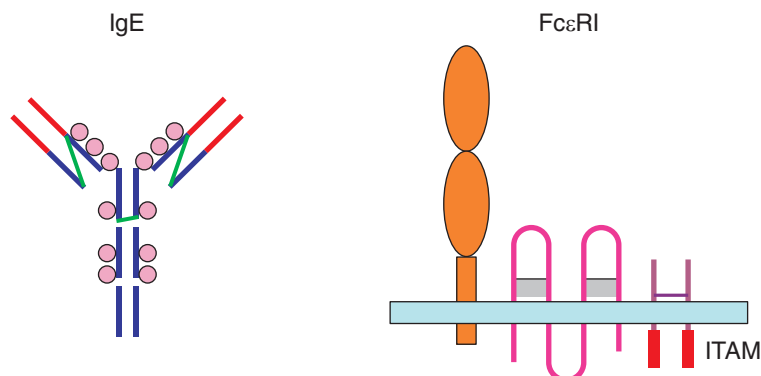


Рис. 4.27. Схема строения молекул IgE и FcεRI

изотип IgE, происходит по обычному механизму (см. раздел 3.2.4.3). Выбор гена Cε обусловлен действием IL-4. Переключение осуществляется или одноэтапно (с гена Cμ на ген Cε) или через стадию переключения на ген Cγ4, которое также контролируется IL-4. Происходит сближение V- и Cε-генов путем формирования петли ДНК, в которую попадают все гены, локализованные между V- и Cε-генами, с последующим ее вырезанием. Тандем генов V и Cε транскрибируется с образованием мРНК состава VCε с последующей трансляцией H-цепи IgE.

IgE — 8S мономерный иммуноглобулин (т.е. его молекула содержит 2 тяжелые ε- и 2 легкие цепи) с молекулярной массой 190 кДа (рис. 4.27). Характерные особенности структуры ε-цепи — наличие четырех C-доменов (вместо трех в γ- и α-цепях), обеспечивающее большее пространство для взаимодействия с Fc-рецептором, а также более сильное гликозилирование C-доменов (до 12% углеводов в составе молекулы, 6 сайтов гликозилирования вместо 1–5 в других иммуноглобулинах). Молекула IgE чувствительна к прогреванию при 56 °С, крайним значениям кислотности (pH <6 и pH >11), восстановлению β-меркаптэтанолом. Вовлечение IgE в развитие аллергии обусловлено наличием в домене Cε3 участка связывания для рецептора FcεRI. Некоторый вклад в связывание IgE с FcεRI вносит дополнительный сайт, расположенный в домене Cε4.

Концентрация IgE в сыворотке крови здорового человека ниже, чем любых других иммуноглобулинов. Она колеблется в пределах 85–350 нг/мл, тогда как при аллергических заболеваниях она может быть на порядки выше. Для определения IgE используют иммуноферментный и радиоиммунный тесты, причем обычно определяют содержание IgE, специфичного к конкретным аллергенам. Содержание IgE выражают в международных единицах — 1 МЕ = 2,42 нг IgE. IgE отсутствует в сыворотке крови новорожденных, но начиная с 3 мес его концентрация постепенно нарастает, достигая уровня взрослых только к 10 годам. Содержание IgE в секретах выше, чем в сыворотке крови (особенно много его в молозиве). Большинство IgE секретируют лимфоидные клетки слизистых оболочек. Сывороточный IgE имеет короткий срок жизни — 2,5 сут.

Выработку IgE контролируют регуляторные факторы. Наиболее специфичен для антител данного изотипа контроль, осуществляемый при участии низкоаффинных Fcε-рецепторов (CD23). Этот рецептор экспрессируют В-лимфоциты, а при аллергии — также Т-клетки и моноциты. Под влиянием IL-4 В-клетки и моноциты начинают продуцировать молекулу CD23 в растворимой форме. Взаимодействуя с молекулой CD21 рецепторного комплекса В-лимфоцитов, CD23 запускает сигнал (через тирозинкиназу Lyn, связанную с цитоплазматической частью CD19), способствующий переключению синтеза иммуноглобулинов на IgE, пролиферации IgE<sup>+</sup> В-клеток и секреции ими IgE. Выработку IgE стимулируют также Th2-цитокины IL-5 и IL-6.

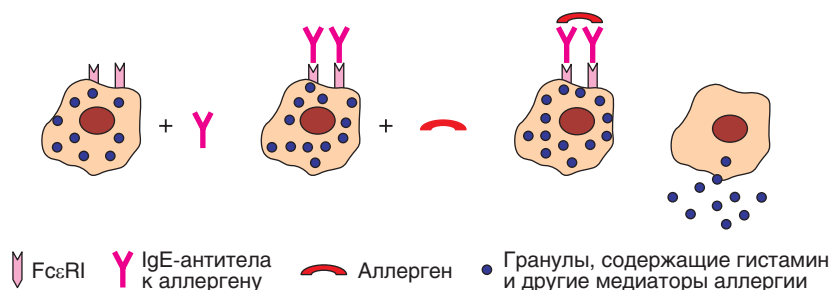
#### 4.5.1.4. Механизмы реализации аллергических реакций

В основе всех событий, происходящих в сенсибилизированном организме при повторном поступлении аллергена, лежит реакция тучных клеток на связывание аллергена с антителами, фиксированными на их поверхности (рис. 4.28).

##### Тучные клетки и аллергия

Подробная характеристика тучных клеток дана ранее (см. раздел 2.1.4). Их очень много в барьерных тканях, особенно в слизистых оболочках. В развитии тучных клеток, помимо основного фактора SCF, участвуют цитокины, секретируемые Th2-лимфоцитами и самими тучными клетками — IL-4, IL-3, IL-9, IL-10. Тучные клетки участвуют в запуске воспалительной реакции и выступают в качестве эффекторных клеток в защите от макропаразитов. При патологии они оказываются основными эффекторными клетками аллергических реакций немедленного типа. Участие тучных клеток в развитии таких реакций многообразно. В частности, они вносят важный вклад в формирование фона, благоприятствующего развитию Th2-зависимого иммунного ответа и привлечение дополнительных эффекторов аллергии (комплекс секретируемых ими цитокинов близок таковому Th2-клеток и включает IL-4, IL-5, IL-10 и другие Th2-цитокины). Однако наиболее значимо для реализации основного события аллергической реакции — выброса гистамина и других активных молекул — наличие на поверхности этих клеток рецепторов FcεRI и способность тучных клеток отвечать дегрануляцией на перекрестное связывание этих рецепторов (см. рис. 4.28).

Рецепторы FcεRI охарактеризованы выше (см. раздел 2.3.4.2.). Они содержат цепи трех типов — α-цепь, связывающую IgE-антитела, β-цепь (4-кратно пронизывающую мембрану) и сигнальную γ-цепь, структурно родственную ζ-цепи TCR и подобно ей содержащую 3 активационные последовательности ITAM (см. рис. 4.27). Связывание с рецептором свободных молекул IgE-антител, возможное благодаря высокому сродству их Fc-части к рецептору ( $K_d = 10^{-10}$  М), не вызывает реакции со стороны тучных клеток. Реакция возникает при перекрестном сшивании рецепторов благодаря бивалентности аллергена. Только в этом случае происходят конформационные изменения α-цепи, улавливаемые связанной с ней тирозинкиназой Lyn, которая при этом фосфорилируется и активируется. Под влиянием этой



**Рис. 4.28.** Центральная роль тучных клеток в механизмах немедленной реакции гиперчувствительности. На рисунке представлена роль в развитии аллергии тучных клеток, IgE-антител и аллергена

киназы сигнал передается на  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепи. В последней фосфорилируются все 3 ITAM. Это необходимо для передачи сигнала тирозинкиназе Syk, что аналогично передаче активационного сигнала в лимфоцитах. Как известно, ключевое событие передачи сигнала в Т-клетке — взаимодействие  $\zeta$ -цепи рецептора (имеющей 3 участка ITAM) и киназы ZAP-70, относящейся к семейству Syk; в В-клетке происходят сходные события, в которых участвует киназа Syk.

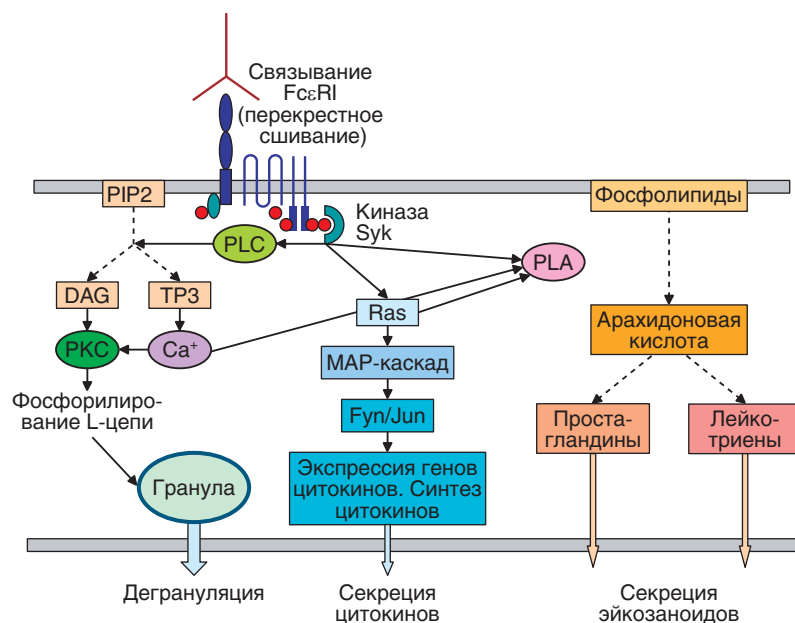
На следующем этапе активации (как и при активации лимфоцитов) участвует ряд ферментов, ГТФаз и малых ГТФ-связывающих белков, а затем происходит разделение единого сигнального пути на 3 ветви, приводящие к разным результатам, которые обеспечивают реализацию основных последствий действия аллергена.

Один из ферментов, активируемых тирозинкиназой Syk, —  $\gamma$ -изоформа фосфолипазы C (PLC $\gamma$ ). Она катализирует расщепление фосфатидилинозитол дифосфата на диацилглицерол и инозитол-3-фосфат (см. раздел 3.5.2.1). При этом в тучных клетках происходит повышение внутриклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и активация протеинкиназы C. Этот фермент фосфорилирует L-цепи миозина и участвует в других процессах, обуславливающих реакцию сократительных элементов цитоскелета и приводящих к выбросу гранул — дегрануляции.

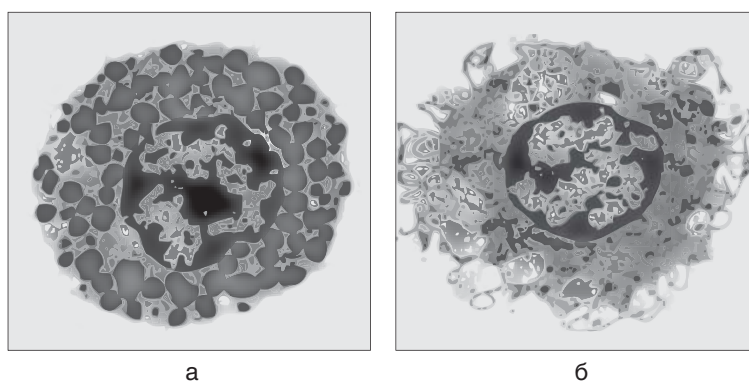
Другой фермент, активирующийся под влиянием киназы Syk (при участии белка Ras и ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , накапливающихся при реализации параллельных сигнальных путей) — фосфолипаза A2 (PLA2). Действуя на фосфорилхолин, она катализирует синтез арахидоновой кислоты, из которой образуются эйкозаноиды (см. раздел 2.5.4), секретируемые вскоре после дегрануляции. Наконец, запуск Ras-зависимого MAP-каскада приводит к формированию транскрипционного фактора AP-1, включающего гены цитокинов (рис. 4.29).

#### *Дегрануляция тучных клеток, действие преобразованных факторов и эйкозаноидов*

Дегрануляция — типовая реакция тучных клеток, их ответ на стимуляцию. Изменения морфологии клеток, связанные с дегрануляцией, представлены на рис. 4.30. Причиной дегрануляции может быть не только связывание аллергена с комплексом IgE/FcεRI, но и другие воздействия,



**Рис. 4.29.** Сигнальные пути и процессы, ответственные за осуществление реакций гиперчувствительности немедленного типа. Через рецептор FcεRI в клетку поступает сигнал, реализуемый в виде нескольких сигнальных каскадов. Результаты проявляются в разное время: сначала происходит дегрануляция тучных клеток, затем — синтез эйкозаноидов и еще позже — секрeция цитокинов. Эти факторы определяют последовательную смену процессов, формирующих аллергическую реакцию



**Рис. 4.30.** Тучные клетки: а — покоящаяся; б — подвергшаяся дегрануляции. Микрофотографии

приводящие к росту внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . К ним относят связывание анафилатоксинов (например, C5a) с рецепторами тучных клеток, влияние кальциевых ионофоров и фармакологических агентов (например, холинергических), повышающих уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле.

Быстрота развития аллергии немедленного типа обусловлена наличием в гранулах преобразованных факторов, которые проявляют свое действие немедленно после выхода в межклеточное пространство (табл. 4.10). Гранулы тучных клеток содержат вазоактивные амины, включая главный из них — гистамин, а также пептидогликаны — хондроитинсульфаты А и С и гепарин (их соотношение варьирует между субпопуляциями тучных клеток), ферменты (протеазы, дегидрогеназа, пероксидаза, РНКазы, гисти-динкарбоксилаза и кислые гликозамингликаны).

**Таблица 4.10.** Характеристика факторов, содержащиеся в гранулах тучных клеток (первичных медиаторов аллергии)

Фактор	Химическая природа	Эффекты
Гистамин	Амин, метаболит гистидина	Расширение и повышение проницаемости сосудов, спазм гладкой мускулатуры, усиление секреции слизи, раздражение нервных окончаний (зуд)
Гепарин	Пептидогликан	Расширение и повышение проницаемости сосудов, спазм гладкой мускулатуры
Серотонин	Амин, метаболит триптофана	Расширение и повышение проницаемости сосудов, спазм гладкой мускулатуры
Химаза, триптаза	Белки	Протеолиз, усиление секреции слизи, ремоделирование эпителия
Хемотаксический фактор эозинофилов	Белок	Хемотаксис эозинофилов
Хемотаксический фактор нейтрофилов	Белок	Хемотаксис нейтрофилов

Главный эффекторный фактор ранней фазы гиперчувствительности немедленного типа — гистамин (см. раздел 2.5.3). Он действует на клетки, экспрессирующие рецепторы для этого амина.  $H_1$ -рецепторы представлены на гладких мышцах и эндотелии сосудов, что обеспечивает два главных эффекта гистамина — спазм гладкой мускулатуры бронхов и расширение сосудов с повышением проницаемости капилляров. С действием гистамина связано также усиление секреции слизи и ощущение зуда, характерного для аллергических реакций. Через  $H_2$ -рецепторы нейтрофилов и лимфоцитов реализуются регуляторные эффекты гистамина.

Гепарин и другие пептидогликаны также обуславливают основные проявления ранней фазы аллергической реакции — расширение сосудов, повышение их проницаемости и спазм гладкой мускулатуры, но выраженность их эффектов слабее, чем у гистамина. Протеазы (химаза и триптаза) вызывают иные эффекты, характерные для более поздней фазы аллергической реакции, — они обуславливают локальный протеолиз, усиление секреции слизи, ремоделирование эпителия.

Вторая волна выделения активных молекул активированными тучными клетками (табл. 4.11) связана с секрецией эйкозаноидов (см. рис. 4.29).

Эйкозаноиды — липидные метаболиты, производные арахидоновой кислоты, служащие медиаторами аллергических реакций. Их подробная характеристика представлена выше (см. раздел 2.5.4). К активным участникам аллергических реакций относят лейкотриены LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> и простагландин D<sub>2</sub> (в меньшей степени E<sub>2</sub>, F<sub>α2</sub> и I<sub>2</sub>), а также тромбоксан TxA<sub>2</sub>. Для большинства перечисленных эйкозаноидов клетками-мишенями служат эндотелиальные клетки сосудов, гладкие мышцы, особенно бронхиальные, а также клетки слизистых желез, тромбоциты и нейтрофилы. Действуя через рецепторы, эти факторы, прежде всего лейкотриены, расширяют сосуды (тромбоксан суживает их) и повышают их проницаемость, вызывают спазм гладких мышц (основной эффект — бронхоспазм), стимулируют выделение слизи, вызывают хемотаксис нейтрофилов. Среди эффектов лейкотриенов доминирует их действие на гладкие мышцы бронхов: они обуславливают реализацию медленной фазы бронхоспазма. Простагландины (особенно простагландин E<sub>2</sub>) оказывают иммунорегуляторное (преимущественно супрессирующее) действие. Тромбоксан A<sub>2</sub> вызывает агрегацию тромбоцитов с освобождением из них ферментов и других активных факторов, способствующих пролиферации лимфоцитов.

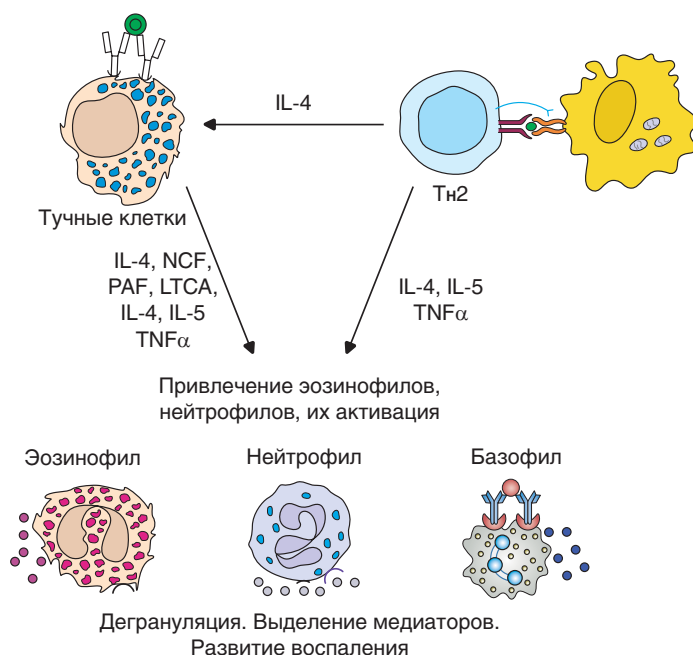
**Таблица 4.11.** Гуморальные факторы, высвобождаемые эффекторными клетками аллергии

Группа факторов	Тучные клетки	Эозинофилы
Предобразованные факторы	Гистамин, гепарин, хондроитинсульфат, серотонин, протеазы	Главный основной белок (MBP), катионный белок эозинофилов (ECP), пероксидаза эозинофилов (EPO), нейротоксин эозинофилов (EDT)
Быстро синтезируемые факторы	Лейкотриены (LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> ), простагландины (D <sub>2</sub> ), тромбоксаны, фактор, активирующий тромбоциты (PAF)	Лейкотриены (LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> ), простагландины (E), фактор, активирующий тромбоциты (PAF)
Медленно синтезируемые факторы	IL-5, GM-CSF, TNFα, IL-8	IL-3, IL-5, GM-CSF, TGFβ

#### ***Поздняя фаза аллергии немедленного типа***

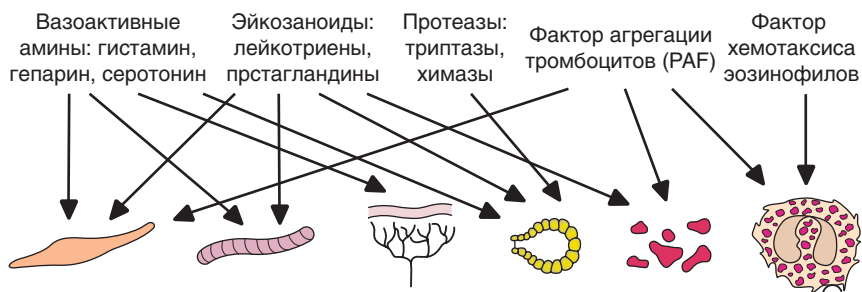
Отложенная фаза немедленной гиперчувствительности развивается позже 4–6 ч после действия аллергена (рис. 4.31). Как сказано выше, она обусловлена привлечением из циркуляции крови эозинофилов, базофилов и нейтрофилов цитокинами, синтезируемыми тучными клетками и Th2-лимфоцитами, — IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, а также хемокинами. Названные цитокины и гуморальные продукты мигрирующих клеток, в первую очередь эозинофилов, определяют характерные черты этой фазы развития аллергической реакции.

Активация мигрирующих клеток провоспалительными цитокинами, хемокинами, анафилатоксинами и другими факторами, присутствующими в очаге аллергического поражения, приводит к их дегрануляции и секреции ими цитокинов (рис. 4.32). Основные факторы, выделяемые эозинофила-



**Рис. 4.31.** Клеточные и гуморальные факторы отложенной фазы аллергической реакции. Цитокины, секретируемые тучными клетками и Th2-лимфоцитами, привлекают в очаг поражения лейкоциты — эозинофилы, базофилы и нейтрофилы. Эти клетки определяют в основном проявления отложенной фазы аллергии немедленного типа

#### Медиаторы:



#### Мишени:

Гладкие мышцы      Мелкие кровеносные сосуды      Окончания чувствительных нервов      Слизистые железы      Тромбоциты      Эозинофилы

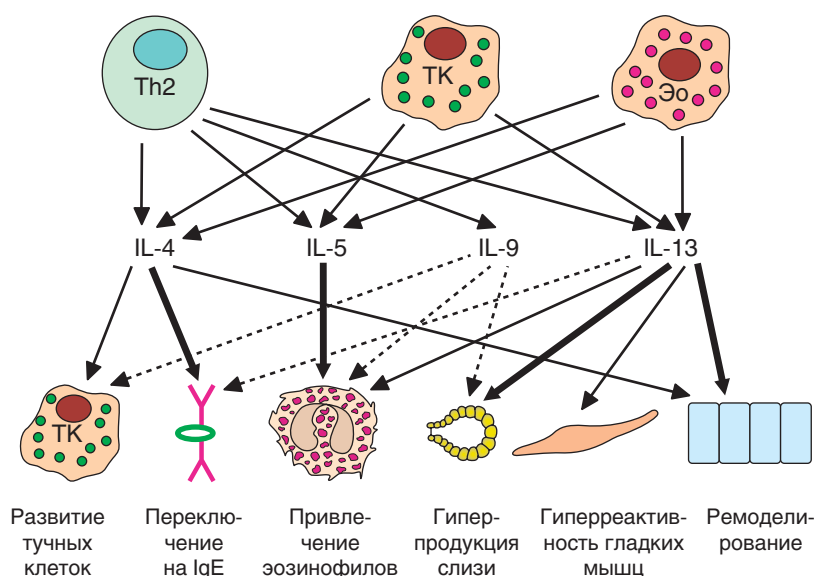
#### Эффекты:

Сокращение      Расширение, повышение проницаемости      Зуд      Секреция слизи      Агрегация      Миграция, активация

**Рис. 4.32.** Гуморальные факторы аллергии и их клетки-мишени. Комплекс проявлений аллергии немедленного типа почти полностью определяется гуморальными факторами, выделяемыми клетками — эффекторами аллергии

ми — главные компоненты их специфических гранул: главный щелочной белок (МВР), эозинофильный катионный белок (ЕСР), эозинофильная пероксидаза (ЕРО) и нейротоксин эозинофилов (EDN) (см. раздел 2.1.3). Эти факторы играют важную роль в защите от гельминтов, однако их действие при аллергии изучено неполно. Установлено, что МВР стимулирует тучные клетки и базофилы и вносит вклад в формирование гиперреактивности бронхов. Все вышеперечисленные белки эозинофилов в силу своей цитотоксичности участвуют в повреждении тканей в очаге поражения. Эозинофилы продуцируют также эйкозаноиды, прежде всего LTC4 и PAF.

Спектр цитокинов, выделяемых эозинофилами и базофилами, сходен с таковым тучных клеток и включает типичные Th2-цитокины (рис. 4.33). Среди них патогенетическую роль в реализации отложенной фазы аллергических реакций играют 4 вышеупомянутых цитокина — IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13. Их эффекты сильно перекрываются, однако между ними есть и определенное «разделение труда». Так, IL-4, играющий ключевую роль в подготовке аллергических процессов (синтез IgE, развитие тучных клеток), на этапе поздних проявлений играет меньшую роль, участвуя в ремоделировании слизистых оболочек. IL-5 служит главным фактором привлечения эозинофилов. На этапе поздних проявлений аллергии основная роль принадлежит IL-13, который обуславливает ремоделирование слизистых оболочек, усиливает секрецию слизи, поддерживает повышенную активность гладких мышц бронхов. IL-9 выступает в качестве вспомогательного фактора в большинстве упомянутых процессов.



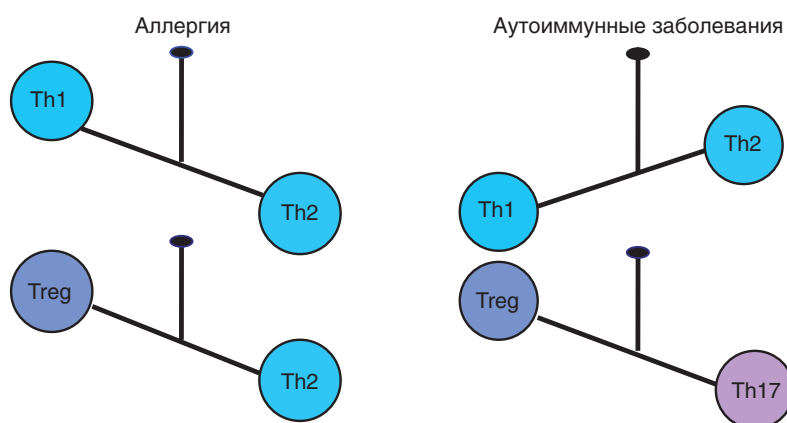
**Рис. 4.33.** Ключевые цитокины аллергических процессов, их клетки-продуценты и клетки-мишени. Цитокины, секретируемые эффекторными клетками аллергии, отвечают за ряд ключевых проявлений аллергии и связанных с ней заболеваний. Th2 — Th2-клетки; ТК — тучные клетки; Эо — эозинофилы

IL-5, IL-4 и IL-13, а также гуморальные факторы и белки из гранул эозинофилов определяют развитие местной воспалительной реакции по типу «эозинофильного воспаления», патогенетически отличающегося от классического «макрофагального» воспаления. Этот тип воспаления лежит в основе аллергических заболеваний — бронхиальной астмы, аллергического ринита, атопического дерматита. Общим индуцирующим фактором для обоих типов воспаления служит фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), секретируемый при аллергии Th2-лимфоцитами и тучными клетками.

#### 4.5.1.5. Роль нарушения баланса субпопуляций Т-клеток

Предпосылкой развития аллергических процессов служит преобладание функциональной активности Th2-клеток и их влияния на иммунологические процессы при сниженной активности Th1-клеток. Однако прогрессирование аллергических заболеваний, особенно на фоне присоединения бактериальных инфекций, часто сопровождается повышением активности Th1-клеток и даже их превалированием над активностью Th2-лимфоцитов. Чаще всего этот сдвиг обусловлен действием бактериальных суперантигенов, главной мишенью которых служат Th1-клетки. Такие изменения реализуются при прогрессировании атопического дерматита и бронхиальной астмы.

Развитию аллергических реакций благоприятствует также ослабление функциональной активности регуляторных Т-клеток, что послужило основанием для заключения, что ведущую роль в иммунопатогенезе аллергии нарушения баланса играют не столько Th1- и Th2-клетки, сколько Th2-клетки и регуляторные Т-лимфоциты (рис. 4.34). О вовлечении естественных регуляторных Т-клеток в патогенез аллергических процессов свидетельствует наличие в симптомокомплексе, развивающемся при их отсутствии (IPЕХ-синдроме), аллергических нарушений — экземы, пищевой аллергии, эозинофилии, повышенного уровня IgE.



**Рис. 4.34.** Нарушение баланса субпопуляций Т-клеток при аллергии и аутоиммунных заболеваниях. Нарушение физиологического баланса некоторых субпопуляций Т-клеток рассматривают как основу патогенеза аллергических и аутоиммунных заболеваний



велико. К ним относят ген *Сε*, кодирующий синтез константных доменов ε-цепи и, следовательно, молекулы IgE — основного эффектора аллергии немедленного типа. В этот список входит несколько генов, кодирующих Th2-цитокины (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), непосредственно участвующие в реализации аллергических реакций, а также SCF, определяющий развитие тучных клеток. Гены, кодирующие транскрипционные факторы GATA-3 и STAT6, тоже относятся рассматриваемой группе, что обусловлено ключевой ролью этих факторов в дифференцировке Th2-клеток. Среди генов предрасположенности к аллергии есть и гены *MHC* класса II. Обуславливая ответ на конкретные антигены, они в большей степени, чем другие гены, ассоциированы с аллергическим ответом на индивидуальные аллергены.

Впечатляющий рост частоты аллергических заболеваний позволяет с уверенностью говорить о вкладе внешних факторов в предрасположенность к аллергическим заболеваниям. В настоящее время популярна «гигиеническая теория», объясняющая роль цивилизационных факторов в распространении аллергических заболеваний. Ее суть состоит в следующем. В природных популяциях и в человеческих сообществах с низким уровнем экономического и культурного развития большой вклад в становление иммунной системы и формирование ее реактивности вносит воздействие микробной флоры, в том числе микрофлоры слизистых оболочек. Этот вклад проявляется в «провоспалительной» ориентации иммунных процессов, основой которых является преобладание эффекта дендритных клеток типа DC1, являющихся продуцентами IL-12, а также Т-хелперов типа Th1 — продуцентов IFNγ. При высоком уровне гигиены, когда воздействие микроорганизмов минимально, возникает дефицит этих стимулов и развивается склонность к развитию иммунных процессов по Th2-зависимому типу. В норме эти процессы предназначены преимущественно для борьбы с макропаразитами. Однако цивилизованные общества успешно справились с этой формой биологической агрессии. Поэтому Th2-зависимые процессы проявляются в извращенной — аллергической форме реагирования на антигенные стимулы, не сопряженные с классическим воспалением. Эта концепция, несмотря на многочисленные возражения, остается самым распространенным теоретическим обоснованием наблюдаемого глобального феномена избирательного распространения аллергопатологии в развитых странах.

#### 4.5.1.7. Аллергические заболевания

Аллергопатология весьма часто проявляется в виде острых реакций на действие аллергенов, например, в ответ на прием лекарственных средств или пищи, на ужаление и укусы насекомых, вдыхание аллергенов домашней пыли и т.д. Эти реакции манифестируют, как уже говорилось, в виде местных проявлений, обусловленных как путем поступления аллергена, так и локализацией тканей/органов-мишеней (что связано с сосредоточением в них тучных клеток, высокой проницаемостью барьеров, и т.д.). Эти проявления могут быть представлены в виде реакции кожи (сыпь, волдыри) или слизистых оболочек (повышенная секреторная активность, в бронхах — бронхоспазм, в пищеварительном тракте — кишечные расстройства). Они могут проявляться на системном уровне в виде анафилактического шока (табл. 4.12).

**Таблица 4.12.** Системные и местные клинические проявления аллергии

Заболевания и синдромы	Аллерген	Путь поступления	Вторичные клетки-мишени	Проявления
<b>Системные</b>				
Анафилактический шок	Сыворотка, лекарственные средства, яды насекомых	Парентеральный (особенно внутривенный)	Эндотелий сосудов, клетки крови	Расширение сосудов, повышение их проницаемости, выпот жидкой части крови в ткани, гипотония
Крапивница	Пищевые продукты, яды насекомых	Подкожный, <i>per os</i>	Эндотелий сосудов, клетки крови	Гиперемия, волдыри, кожная сыпь, эритема, зуд
<b>Преимущественно местные</b>				
Аллергический ринит и конъюнктивит	Пыльца	Ингаляционный	Эндотелий сосудов, эпителий слизистых оболочек	Гиперемия слизистых оболочек, гиперпродукция слизи и других секретов, насморк
Бронхиальная астма	Пыльца, пыль и другие аэро-аллергены	Ингаляционный	Гладкие мышцы и эпителий бронхов, эндотелий сосудов	Бронхоспазм, усиление продукции слизи, хроническое воспаление бронхов
Атопический дерматит	Лекарственные средства и красители	Контактный, <i>per os</i>	Эпидермис, эндотелий сосудов	Хроническое воспаление кожи
Пищевая аллергия	Пищевые продукты	<i>Per os</i>	Энтероциты, гладкие мышцы, эндотелий сосудов	Диарея, тошнота, рвота, крапивница, возможен анафилактический шок
Отек Квинке	Лекарственные средства, яды насекомых	Парентеральный, <i>per os</i>	Эндотелий сосудов	Отек лица и шеи

**Сенная лихорадка**

В качестве особого заболевания рассматривают сенную лихорадку, причиной которой служит аллергия к пыльце. В основе патогенеза сенной лихорадки лежат реакции, подобные описанным выше. В результате непостоянного действия причинного фактора (сезонное пыление растений) заболевание

проявляется в определенные временные интервалы, четко ограниченные сезоном пыления. Типичное проявление сенной лихорадки — усиленное выделение носовой слизи и слезотечение, развитие риноконъюнктивита.

### ***Аллергический ринит***

В отличие от сенной лихорадки, при аллергическом рините действие аллергенов проявляется систематически, вне временных ограничений вследствие их постоянного присутствия в окружении пациента (домашняя пыль, перхоть или шерсть домашних животных и др.). Основное проявление аллергического ринита — хронический насморк, постоянная заложенность носа. Аллергический ринит часто переходит в бронхиальную астму.

### ***Атопическая бронхиальная астма***

Атопическая форма бронхиальной астмы — наиболее частое и тяжелое аллергическое заболевание. Именно быстрый рост заболеваемости бронхиальной астмой в первую очередь определяет социальную значимость проблемы расширения аллергопатологии. Бронхиальная астма представляет собой в первую очередь воспалительное заболевание бронхов. В связи с особенностями строения лимфоидной ткани, ассоциированной с бронхами (высокое содержание тучных клеток и гуморальных факторов, определяющих Th2-ориентацию иммунных процессов), локальное воспаление обычно приобретает характер Th2-зависимого процесса с преобладанием эозинофильной инфильтрации и преимущественной секрецией Th2-цитокинов (IL-4, IL-5, IL-13). Главное проявление этого сдвига — склонность к развитию бронхоспазма как реакции на действие аэроаллергенов. В силу хронического воспалительного характера заболевания в его патогенезе ведущая роль принадлежит не столько тучным клеткам и продуктам их дегрануляции, сколько факторам поздней фазы аллергических реакций немедленного типа, ассоциированным с эозинофильной инфильтрацией. Выделяющиеся при этом цитокины и другие гуморальные факторы определяют важный патогенетический процесс — формирование гиперреактивности бронхов. Со временем повышается восприимчивость гладкой мускулатуры бронхов к действию различных факторов (не всегда специфических аллергенов), при этом развивается спастическая реакция. Следующий этап прогрессирования бронхиальной астмы связан с процессом ремоделирования слизистой оболочки. Атрофия эпителиального слоя и гипертрофия соединительной ткани и мышечного слоя бронхов способствуют сужению их просвета, делают менее надежным эпителиальный барьер и дополнительно повышают реактивность гладких мышц. В связи с ослаблением барьерной функции эпителия бронхов часто происходит присоединение инфекционного поражения. Под его влиянием иммунные процессы в бронхах могут приобретать черты Th1-зависимости. Несмотря на создание широкого арсенала средств, позволяющих контролировать заболевание, оно остается тяжелой инвалидизирующей патологией и способствует присоединению эмфиземы и воспалительного поражения интерстициальной ткани легких.

### ***Атопический дерматит***

Атопический дерматит — главная форма аллергопатологии, затрагивающей кожу. Это хронический процесс, основанный на аллергическом

воспалении. При атопическом дерматите происходит инфильтрация дермы эозинофилами и другими клетками, привлекаемыми при аллергическом воспалении. В очагах поражения присутствуют также тучные клетки, Т-лимфоциты (преимущественно  $CD4^+$  Т-клетки), секретирующие IL-4, IL-5 и IL-13. Реакция тучных клеток сопровождается их дегрануляцией и освобождением гистамина, что служит основой для одного из главных симптомов заболевания — кожного зуда. При атопическом дерматите поражается эпителиальный слой кожи, который подвергается атрофическим и дегенеративным изменениям. Дерма гипертрофирована и инфильтрирована клетками аллергического воспаления, прежде всего эозинофилами и тучными клетками. В связи с повреждением эпидермиса, обусловленным как его атрофией, так и механическим повреждением (расчесы), к дерматиту часто присоединяются инфекционные поражения кожи. Они служат важным фактором переключения иммунных процессов на Th1-зависимый путь. На поздних стадиях атопический дерматит имеет смешанную иммунологическую основу в связи с сочетанным действием продуктов Th1- и Th2-клеток.

#### 4.5.1.8. Принципы лечения аллергических заболеваний

##### *Принципы лекарственной терапии аллергических заболеваний*

В основу современной терапии аллергических заболеваний положено воздействие на главные звенья патогенеза, связанные с реализацией аллергических реакций (но не с предшествующим этапом сенсибилизации). Основные группы препаратов и механизмы их действия представлены в табл. 4.13. Главные антиаллергические средства — антигистаминовые препараты, действующие на  $H_1$ -рецепторы (основной тип рецепторов, через которые реализуется действие гистамина). Поскольку контроль за многими аллергическими реакциями, особенно реакцией гладкой мускулатуры, осуществляется с участием вегетативной нервной регуляции, для лечения бронхиальной астмы применяют также агонисты  $\beta_2$ -адренорецепторов и блокаторы мускариновых холинергических рецепторов. Сходный эффект оказывает теofilлин (ингибитор фосфодиэстеразы цАМФ), повышающий, подобно  $\beta_2$ -агонистам, уровень внутриклеточного цАМФ. Особую группу образуют антагонисты лейкотриенов — важнейшей группы медиаторов реакции гладкой мускулатуры бронхов. Используют также лекарственные вещества, подавляющие высвобождение аллергических медиаторов из тучных клеток. Широко применяют глюкокортикоиды, которые обладают противовоспалительным действием, подавляют синтез гистамина и повышают уровень внутриклеточного цАМФ. В связи с отрицательными последствиями системного использования глюкокортикоидов в настоящее время более широкое применение получили локальные пути воздействия этими гормонами (в виде спреев, мазей и т.д.).

Благодаря созданию широкого и разнообразного набора противоаллергических лекарственных средств удается контролировать течение даже очень тяжелых аллергических процессов (например, бронхиальной астмы). Однако эти средства, действующие на стадии реализации аллергических эффектов, не способны устранить глубинные причины патологического процесса, обусловленные особенностями их иммунологической основы.

**Таблица 4.13.** Принципы лекарственной терапии аллергических заболеваний и применяемые препараты

Группы препаратов	Принцип действия	Препараты
Антигистаминовые	Блокируют $H_1$ -рецепторы гладких мышц. Расслабляют гладкие мышцы бронхов	Первое поколение (обладают седативным эффектом, подавляют активность вегетативной нервной системы) — дифенгидрамин, хлоропирамин, диметинден. Второе поколение (лишены указанных выше эффектов) — фексофенадин, лоратадин, цетиризин, эбастин, левоцетризин
Агонисты $\beta_2$ -адренорецепторов	Связываются с $\beta_2$ -адренорецепторами. Расслабляют гладкую мускулатуру бронхов	Короткодействующие (для снятия спазма) — сальбутамол, фенотерол®. Пролонгированного действия (для профилактики) — салметерол, формотерол
Антагонисты мускарина	Блокируют мускариновые холинэргические рецепторы	Ипратропина бромид
Антагонисты лейкотриенов	Подавляют синтез лейкотриенов и их действие на рецепторы. Расслабляют гладкую мускулатуру бронхов	Ингибиторы 5-липоксигеназы — zileuton, блокаторы рецепторов лейкотриенов — зафирлукаст, монтелукаст
Метилксантины	Повышение уровня цАМФ за счет подавления активности фосфодиэстеразы. Бронходилатация	Теofilлин
Глюкокортикоиды	Подавляют образование гистамина, усиливают образование цАМФ. Подавляют воспаление	Беклометазон, будесонид, дексаметазон, флутиказон, мометазон
Блокаторы высвобождения медиаторов	Блокируют выброс медиаторов тучными клетками	Кромалин®, недокромил

**Принципы специфического лечения и биотерапии аллергических заболеваний**  
(табл. 4.14)

Наиболее радикальный подход к предупреждению развития аллергических реакций — аллергенспецифическая иммунотерапия, основанная на десенсибилизации пациентов. Впервые она была использована в 1911 г. Ее суть состоит в повторном введении (обычно подкожном) постепенно возрастающих доз аллергена, к которому организм сенсibilизирован. Клинический успех иммунотерапии проявляется в ослаблении алерго-

логической симптоматики и сезонного подъема уровня аллергенспецифических IgE-антител. Лабораторные показатели эффективности десенсибилизации: ослабление реактивности пациента в аллергических тестах (включая кожный прик-тест), повышение титра специфических IgG-антител в сыворотке крови (в этом случае они выполняют функцию блокирующих антител), а также IgG- и IgA-антител в слюне; характерная динамика аллергенспецифических IgE-антител — сначала подъем их концентрации в течение нескольких месяцев, затем — прогрессирующее снижение. В тканях уменьшается содержание тучных клеток. Ослабевает аллергенспецифическая пролиферация Т-клеток *in vitro*, содержание Th2-цитокinov в сыворотке крови и тканях, и Th1-цитокinov в крови. Повышается содержание регуляторных Т-клеток и концентрация IL-10. При успехе специфической иммунотерапии достигается длительный клинический эффект, однако полного излечения не происходит, что диктует необходимость повторения курсов лечения. К достоинствам метода относят приостановку прогрессирования аллергических процессов и расширения спектра аллергенов, а также снижение дозы фармакологических препаратов, применяемых больными. Описаны осложнения специфической иммунотерапии вплоть до летального исхода в результате анафилактического шока. Тяжелые осложнения достаточно редки и обычно связаны с нарушением схемы лечения.

**Таблица 4.14.** Принципы биотерапии аллергических заболеваний

Группы препаратов	Ожидаемый эффект	Принцип действия
Аллергены	Десенсибилизация. Нормализация синтеза IgE	Специфическая десенсибилизация. Подавление синтеза IgE
Аллерговакцины (конъюгаты аллергенов с иммуномодуляторами)	Нормализация баланса Th1/Th2	Специфическая десенсибилизация. Нормализация баланса Th1/Th2
Моноклональные антитела к IL-4, IL-13, CD154, растворимые рецепторы, регуляторные клетки и их продукты (IL-10, TGFβ)	Подавление активности Th2-клеток	Подавление Th2-клеток и проаллергических цитокинов
Антитела к TNFα	Подавление воспаления, обусловленного TNFα	Связывание TNFα, секретируемого аллергическими Th2-клетками
Антитела к IgE	Снижение концентрации IgE	Связывание свободного IgE. Подавление его синтеза
Моноклональные антитела к рецепторам для IgE	Подавление активности тучных клеток	Блокада IgE-рецепторов
Моноклональные антитела к IL-5, IL-5R, CCR3	Подавление активности эозинофилов	Блокада эозинофилов и их продуктов

Механизмы проявления положительного эффекта не установлены. Определенная роль при этом принадлежит переключению Th2-типа иммунного ответа на Th1-тип. Однако более обосновано предположение об активации регуляторных Т-клеток, сдерживающих как Th2-, так и Th1-ответ на аллергены. Получены данные о повышении числа и активности естественных регуляторных Т-клеток при успешной иммунотерапии гиперчувствительности к белкам коровьего молока, клещевым аллергенам и некоторым (не всем испытанным) аллергенам пыльцы. Механизм активации регуляторных Т-клеток при специфической иммунотерапии не установлен. В настоящее время разрабатывают подходы для усиления эффективности аллергенспецифической иммунотерапии на основе модификации вводимого аллергена или добавления к нему агентов, способствующих переключению на Th1-ответ или повышению активности регуляторных Т-клеток. Такие препараты рассматривают как вариант аллерговакцин (см. раздел 4.8.3.3).

В настоящее время разрабатывают новые направления биотерапии аллергических заболеваний. Большинство из них основано на использовании средств связывания или инактивации эффекторных факторов аллергии. Использование с этой целью моноклональных антител к IL-4 и IL-13 дало ограниченные результаты, не соответствующие ожидаемым. Несколько более эффективны, но все-таки не оптимальны препараты на основе растворимых рецепторов для IL-4, моноклональных антител к IL-5 и его рецептору. Испытывают эффективность моноклональных антител к IgE и FcεRI. Пока наилучший результат был получен при применении моноклональных антител к TNFα.

## **4.5.2. Другие типы гиперчувствительности**

### **4.5.2.1. Цитотоксический тип гиперчувствительности (гиперчувствительность II типа)**

Иммунный цитолиз — главный иммунный эффекторный механизм этого типа гиперчувствительности. Его проявлениями являются варианты клеточного контактного цитолиза, который является основным механизмом реализации защитной активности цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллеров, но используется также нейтрофилами, макрофагами, γδТ- и NKT-клетками. Кроме того, существует несколько вариантов иммунного цитолиза, реализуемого с участием антител — комплементзависимый цитолиз, FcR-зависимый цитолиз, осуществляемый фагоцитами (в основном макрофагами) и естественными киллерами. К гиперчувствительности II типа относят патологические процессы, в основе которых лежит только цитотоксическая активность, связанная с антителами. Этот тип гиперчувствительности трактуют как цитотоксические реакции, вызываемые связыванием антител с поверхностью клеток-мишеней и привлечением к иммунным комплексам комплемента или эффекторных клеток, которые и обуславливают проявление данной формы цитотоксичности.

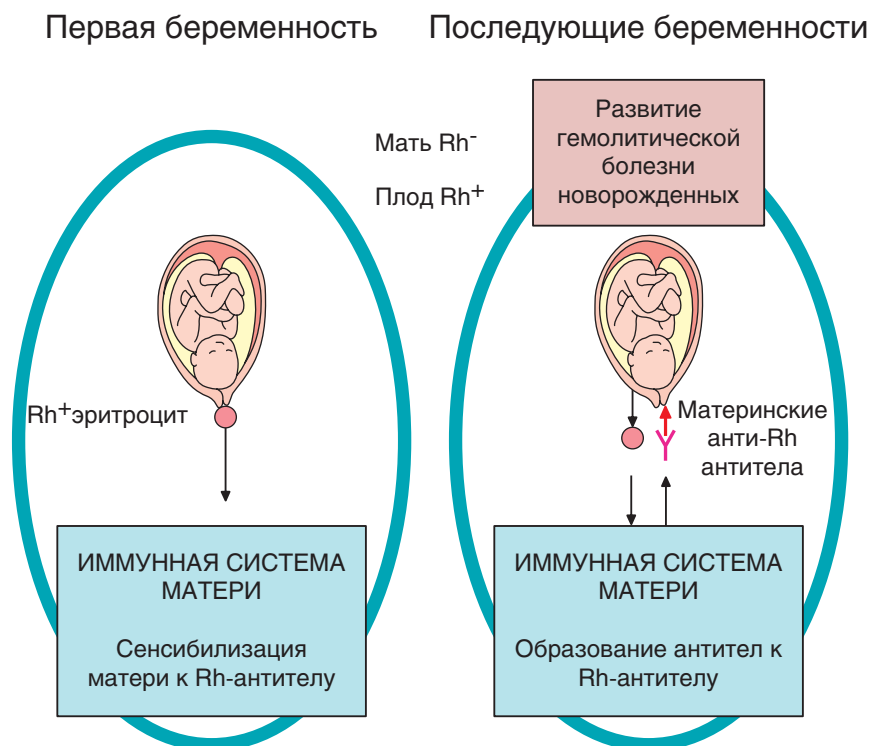
Выделяют 3 группы заболеваний, обусловленных гиперчувствительностью II типа:

- аллоиммунные гемолитические заболевания;
- гемолитические процессы, связанные с лекарственной гиперчувствительностью.

*Аллоиммунные гемолитические заболевания*

Эта группа заболеваний включает гемотрансфузионные осложнения и гемолитическую болезнь новорожденных. Иммунологические основы гемолиза, обусловленного несовместимостью по группам крови АВ0, рассмотрены выше. Они связаны с предсуществованием антител к отсутствующим групповым антигенам. Именно поэтому переливание несовместимых эритроцитов, связывающихся в кровяном русле с антителами, приводит к их массовому лизису и развитию осложнений в виде желтухи и повреждения тканей при отложении комплексов мембранных белков эритроцитов с антителами.

Резус-конфликтная гемолитическая анемия имеет несколько иную основу (рис. 4.36). Среди нескольких антигенов (C, D, E, c, d, e) системы «резус» антиген D — наиболее сильный и способен индуцировать выработку большого количества антител. Его кодирует доминантный ген **D**, рецессивным аллельным вариантом которого является ген **d**. Конфликтная ситуация, обусловленная несовместимостью по этим генам, проявляется не при гемотрансфузиях, а при беременности резус-отрицательной матери (с генотипом **dd**) резус-положительным плодом (генотипы **DD** и **Dd**). При первой беременности обычно не происходит никаких нарушений иммунной природы в организме матери и плода. Однако в ходе этой беременности вследствие



**Рис. 4.36.** Развитие гемолитической болезни новорожденных на основе резус-конфликта как проявление реакции гиперчувствительности II типа

проникновения эритроцитов плода в организм матери происходит ее сенсibilизация с индукцией анти-D-антител, преимущественно IgM-класса, практически не проникающих через плаценту. Вследствие формирования в иммунной системе матери клеток памяти при повторных беременностях реализуется иммунный процесс, имеющий патологические проявления. Реиммунизация D-антигеном вызывает образование иммунной системой матери большого количества IgG-антител (особенно IgG3), специфичных к D-антигену. Эти антитела проникают через плаценту и вызывают гемолиз эритроцитов плода и повреждение тканей, поскольку D-антиген экспрессируется и на них. Исход этой патологии — внутриутробная гибель плода или проявление гемолитической болезни новорожденного.

Введение резус-отрицательной матери готовых анти-D-антител IgG-класса подавляет образование иммунных анти-D-антител при сенсibilизации эритроцитами плода по механизму FcR-зависимой регуляции (см. раздел 3.6.6.3), что используется с профилактической целью. При сочетании резус-конфликта с аналогичными вариантами несовместимости по АВ0, сенсibilизация ослабляется, поскольку эритроциты плода, экспрессирующие антигены А или В, лизируются изогемагглютинидами, присутствующими в организме матери.

Другой пример патологии новорожденных, имеющей сходный механизм, — аллоиммунная тромбоцитопения новорожденных.

#### ***Аутоиммунная цитотоксическая патология***

Известны варианты аутоиммунной гемолитической анемии, различные по температурному оптимуму взаимодействия с эпитопом — тепловые и холодовые. При тепловых гемолитических анемиях антитела направлены против некоторых антигенов системы Rh (не D), при холодовых анемиях — против антигенов групп крови I и P. Цитотоксические антитканевые антитела выявляют при тиреоидите Хашимото (повреждают тироциты), болезни Гудпасчера (повреждают базальную мембрану почечных гломерул). Цитотоксические проявления, обусловленные Т-лимфоцитами, выявляют при сахарном диабете типа I и ряде других аутоиммунных заболеваний, рассмотренных в соответствующей главе (см. раздел 4.4.2.1).

#### ***Гемолитические проявления лекарственной сенсibilизации***

Постулируется возможность повреждения клеток в случае связывания с их поверхностью лекарств, антителами, специфичными к этим лекарствам. Достоверные сведения получены относительно случаев, обусловленных связыванием лекарственных средств с поверхностью клеток крови. Описана гемолитическая анемия, обусловленная сенсibilизацией к фенацетину и хлорпромазину, тромбоцитопеническая пурпура, вызываемая приемом лекарственных средств, и иммунный агранулоцитоз, индуцированный приемом аминофеназона и хинидина.

#### **4.5.2.2. Гиперчувствительность, связанная с иммунокомплексной патологией (гиперчувствительность III типа)**

В норме при взаимодействии поступающих извне антигенов и образующихся антител формируются иммунные комплексы, с которыми соединяются компоненты комплемента при его активации по классическому

пути. Комплексы взаимодействуют с рецепторами CR1 (CD35) эритроцитов. Такие эритроциты поглощаются макрофагами печени, что приводит к элиминации комплексов. При взаимодействии антител с антигенами клеточной мембраны патогенов или других чужеродных клеток происходит их опсонизация, также способствующая фагоцитозу этих клеток. Накопления иммунных комплексов в циркуляции и их отложения в тканях ни в первой, ни во второй ситуациях не происходит.

При повреждении системы элиминации иммунных комплексов (недостаточность функции фагоцитов или системы комплемента), длительном или слишком массивном поступлении антигена, а также при накоплении большого количества антител реализация описанных выше процессов нарушается. Наиболее важное событие в развитии иммунокомплексной патологии — формирование нерастворимых иммунных комплексов и их отложение в тканях. Переходу в нерастворимое состояние способствует избыток антител или недостаточность системы комплемента (связывание комплемента способствует сохранению комплексов в растворимой фазе). Иммунные комплексы чаще всего откладываются на базальных мембранах, а также на эндотелиальных клетках сосудов, что связано с наличием на их поверхности Fc-рецепторов. Отложение комплексов способствует развитию воспаления. Роль пусковых факторов воспаления в данном случае выполняют малые фрагменты компонентов комплемента C3a и C5a, образующиеся при активации комплемента. Перечисленные факторы, называемые также анафилотоксинами, вызывают изменения сосудов, свойственные воспалению, и привлекают к месту отложения комплексов нейтрофилы и моноциты, вызывая их активацию. Активированные фагоциты секретируют провоспалительные цитокины (IL-1, TNF $\alpha$ , IL-8 и др.), а также катионные белки, ферменты и другие активные молекулы, что обуславливает развитие полномасштабной воспалительной реакции. Повреждение клеток может быть вызвано также активацией комплемента и формированием мембраноатакующего комплекса. Еще один фактор повреждения — агрегация тромбоцитов, происходящая при внутрисосудистом формировании иммунных комплексов. Она приводит к формированию микротромбов и высвобождению вазоактивных молекул. Иммунокомплексная патология может быть обусловлена не только локальным отложением комплексов, но и системным действием циркулирующих иммунных комплексов. Для него характерно сочетание общей симптоматики с локальными воспалительными процессами в местах отложения комплексов.

### ***Феномен Артюса***

*Феномен Артюса* — это экспериментальная модель локальных повреждений, вызываемых отложением иммунных комплексов. Для его воспроизведения кроликам повторно с интервалом 5 сут вводят подкожно сыворотку крови лошадей. После очередного введения (при накоплении достаточного количества антител) в месте инъекции развивается выраженная реакция в виде отека, а после 6-го введения происходит формирование очага гиперергического воспаления с некрозом. Развитие реакции обусловлено формированием иммунных комплексов в месте введения антигена. Их отложение инициирует развитие васкулярно-некротической реакции с тромбозом

сосудов, стазом, геморрагиями, обильной инфильтрацией нейтрофилами, локальным некрозом. Наиболее важную роль в развитии реакции Артюса играют нейтрофилы, базофилы, тучные и эндотелиальные клетки. Вклад тучных клеток и базофилов в развитие реакции состоит в высвобождении активных молекул при дегрануляции (реакция на связывание иммунных комплексов и действие анафилактогенов) и синтезе эйкозаноидов. Активация нейтрофилов иммунными комплексами и анафилактогенами приводит к дегрануляции с выбросом ферментов, бактерицидных и провоспалительных факторов. Реакция клеток эндотелия обуславливает повышение проницаемости сосудов и эмиграцию лейкоцитов. Феномен может быть воспроизведен в пассивном варианте, когда кролику внутривенно вводят готовые антитела, а через 4–5 ч (время, необходимое для проникновения антигена в кожу) внутрикожно вводят антиген. Развивающаяся реакция феноменологически и морфологически не отличается от классического феномена Артюса.

Аналогичные процессы в легких лежат в основе проявлений разнообразных профессиональных заболеваний («легкие фермеров», «легкие меховщиков»), основой которых служит аллергический альвеолит, развивающийся при вдыхании органических продуктов жизнедеятельности сельскохозяйственных и лабораторных животных, спор грибов и др. Иммунокомплексная патология составляет основу некоторых проявлений аутоиммунных заболеваний, например, ревматоидного артрита, при котором иммунные комплексы образуются при связывании IgG с ревматоидным фактором — анти-IgG-антителами.

#### **Сывороточная болезнь**

Это заболевание развивается при повторном внутривенном введении высоких доз антигена (в исходном варианте — лечебной сыворотки с целью профилактики столбняка). На 6–7-е сутки после начала введения антигена в сыворотке появляются антитела, а очередное введение антигена (обычно через 8 сут после начала процедуры) приводит к быстрому формированию в сосудистом русле иммунных комплексов, в том числе нерастворимых. Наиболее выраженная патология развивается при преобладании в иммунных комплексах антигена (формулы комплексов —  $AG_2AT_1$ ,  $AG_3AT_2$ ,  $AG_4AT_3$ , где  $AG_n$  — отражает число молекул антигена в комплексе, а  $AT_n$  — число молекул антител). При этом наблюдают общие симптомы (лихорадка, сыпь, артралгия, генерализованная лимфаденопатия) и локальные проявления, зависящие от мест отложения иммунных комплексов: васкулит, артрит или нефрит при отложении комплексов соответственно на сосудистой стенке, в суставах и в почках.

Повторное введение антигена кроликам вызывает хронический гломерулонефрит. При воспроизведении эффекта важно, чтобы образующиеся иммунные комплексы были растворимы, имели промежуточные по величине размеры — достаточно малые, чтобы оставаться в растворе, и достаточно большие, чтобы «застревать» на эндотелиальной стороне базальной мембраны почечных гломерул. Отложение комплексов привлекает факторы воспаления, что приводит к повышению проницаемости капилляров и другим проявлениям гломерулонефрита.

Системная иммунокомплексная патология служит основой ряда аутоиммунных заболеваний, чему благоприятствует постоянное персистирование аутоантигенов в организме и самоподдерживающийся характер патологического иммунного ответа на них. Наиболее характерная и тяжелая форма иммунокомплексной аутоиммунной патологии — СКВ (см. раздел 4.4.2.2), при которой в качестве одного из основных антигенов выступает двуспиральная ДНК.

#### 4.5.2.3. Гиперчувствительность замедленного типа (гиперчувствительность IV типа)

Гиперчувствительность замедленного типа — единственный тип гиперчувствительности, непосредственную основу которого составляют клеточные, а не гуморальные механизмы. Ее прототип — реакция Манту — ответ сенсибилизированного организма на внутрикожное введение туберкулина. Туберкулиновая реакция была описана Р. Кохом (*R. Koch*) в 1890 г. Реакции этого типа развиваются медленнее, чем аллергические реакции немедленного типа и достигают максимальной выраженности через 24–48 ч после введения антигена. Проявлением реакции Манту служит гиперемизированная папула со слабым отеком, но выраженным уплотнением. В центре папулы может развиваться некроз. Морфологическая основа реакции — очаг воспаления с умеренно выраженными сосудистыми явлениями и наличием лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации (нейтрофилы могут присутствовать в очаге лишь временно).

Реакция гиперчувствительности замедленного типа лежит в основе одной из двух форм клеточного иммунного ответа — воспалительной, обусловленной  $CD4^+$  Т-клетками и их взаимодействием с макрофагами (см. раздел 3.6.1.2). Гиперчувствительность замедленного типа явилась одним из первых иммунологических процессов, на примере которых была осознана возможность развития антигенспецифического иммунного ответа, не связанного с выработкой антител, и аргументирована решающая роль лимфоцитов в качестве эффекторных клеток этой реакции. Именно для гиперчувствительности замедленного типа была впервые показана возможность адаптивного («приёмного») переноса иммунитета живыми лимфоцитами при невозможности его пассивного переноса с сывороткой.

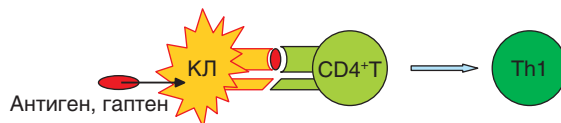
При экспериментальном воспроизведении гиперчувствительности замедленного типа для сенсибилизации вводят антиген внутрикожно (обычно в подушечку стопы) в полном адъюванте Фрейнда. Через 5–7 сут тоже локально вводят разрешающую дозу антигена (дозу, вводимую в сенсибилизированный организм и вызывающую ответную реакцию). Место первого и второго введения может не совпадать. В первые часы после этого развивается ранняя фаза реакции: инфильтрация места введения нейтрофилами, проходящее развитие аллергического воспаления в ответ на локальный выброс тучными клетками серотонина, который провоцируется сенсибилизированными  $CD4^+$  Т-клетками и их цитокинами. Через 24–72 ч реализуется вторая, основная фаза реакции, проявляющаяся инфильтрацией места введения антигена мононуклеарными клетками: на месте введения развивается очаг воспаления в виде папулы, которая затем затвердевает и некротизируется. Общая длительность процесса варьирует от 7 сут до нескольких недель.

Главный результат сенсибилизирующего воздействия — развитие иммунного ответа по воспалительному типу с формированием эффекторных Th1-клеток. Преимущественное вовлечение в процесс именно этих клеток определяется условиями презентации антигена. Обязательное добавление к антигену полного адьюванта Фрейнда обуславливает формирование «провоспалительных» условий в месте введения антигена, при которых клетки Лангерганса или другие дендритные клетки, захватившие антиген, дифференцируются в DC1-клетки. Презентация антигена CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам в региональном лимфатическом узле обеспечивает их клональную экспансию и дифференцировку в Th1-клетки. Экспрессируя хемокиновые рецепторы CXCR3, CCR5 и CCR2, эти клетки способны мигрировать в очаги воспаления. Именно поэтому при повторном введении антигена в полном адьюванте Фрейнда эффекторные Th1-клетки мигрируют в место введения и обеспечивают развитие эффекторной фазы гиперчувствительности замедленного типа. На этом этапе Th1-клетки взаимодействуют с макрофагами, поглотившими антиген, и активируют их при контактном взаимодействии через молекулу CD40 поверхности макрофага, а также с помощью гуморального механизма, опосредованного преимущественно IFN $\gamma$ . Активированный макрофаг выделяет цитокины, привлекающие эффекторные клетки в очаг поражения, а также активные молекулы — продукты окислительного взрыва и азотистого метаболизма, гидролазы и другие активные субстанции.

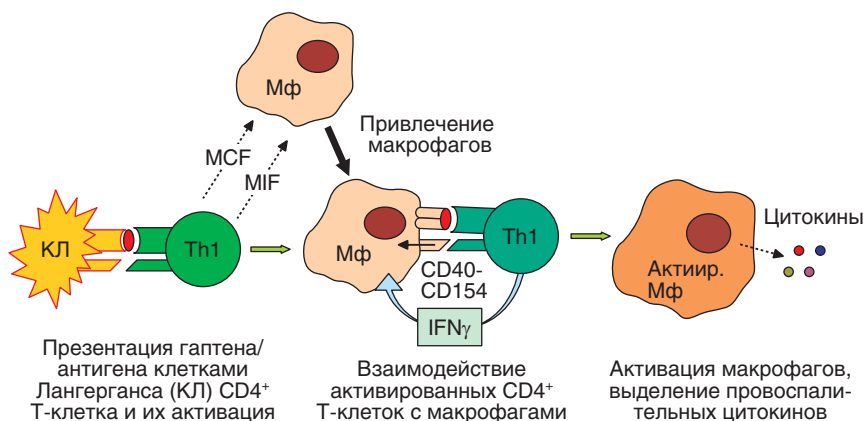
Процессы, сопровождающие сенсибилизацию к антигену, никак не проявляются макроскопически. Воспалительная реакция клеточного типа развивается лишь в ответ на повторное введение антигена. В то же время в эксперименте уже через 7 сут после введения антигена состояние сенсибилизации может быть перенесено сингенному реципиенту с клетками регионального лимфатического узла. Длительность состояния сенсибилизации — 20–30 сут. Эффект повторного введения антигена обусловлен именно сенсибилизированными Th1-клетками, а не Т-клетками памяти. Перенос Т-клеточного иммунитета к антигену с Т-клетками памяти (в более поздние сроки после сенсибилизации) обеспечивает развитие вторичного ответа на антиген, что феноменологически проявляется иначе, чем классическая гиперчувствительность замедленного типа. Таким образом, феномен гиперчувствительности замедленного типа представляет собой своеобразный «двухфазный» иммунный ответ (рис. 4.37). Описана возможность переноса состояния сенсибилизации с бесклеточным диализуемым (пептидным) фактором, экстрагируемым из лимфатических узлов — **фактором переноса**. Механизм действия фактора не выяснен, несмотря на длительную историю его изучения.

Вариантом гиперчувствительности замедленного типа является контактная гиперчувствительность. Ее основой служит связывание гаптенов (например, лекарственных средств, красителей), наносимых на кожу, с клетками Лангерганса и последующая цепь событий, практически идентичная описанным выше. В данном случае низкомолекулярное химическое соединение каким-то образом выполняет роль Т-клеточного эпитопа. Возможно, презентация таких молекул происходит с участием CD1. Реакция, сходная по проявлениям с гиперчувствительностью замедленного типа, развивается

## 1. Фаза сенсibilизации



## 2. Эффекторная фаза



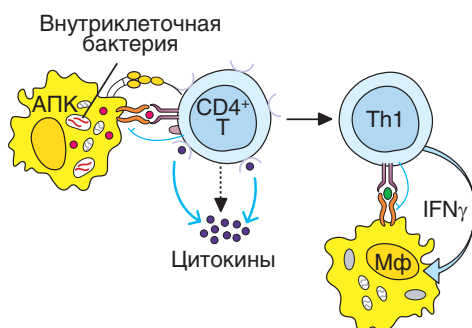
**Рис. 4.37.** Реакция замедленной гиперчувствительности (IV тип) и стадии ее развития. По механизмам развития замедленная гиперчувствительность совпадает с воспалительным типом иммунного ответа (см. рис. 3.110), только ее индуктивная и эффекторная фазы более четко разделены во времени

через 15–20 ч. Ее основой служит мононуклеарная инфильтрация с отеком эпидермиса и образованием микропузырьков в его клетках. В результате подобной реакции при хроническом действии антигена может развиваться **контактный дерматит** (рис. 4.38). Его могут вызвать такие вещества, как динитрохлорбензол, динитрофенол, парафенилендиамин, неомидин и даже металлы, например, никель.

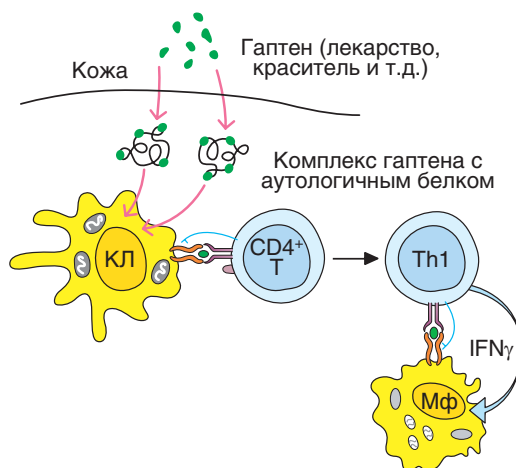
К разновидностям гиперчувствительности замедленного типа относят **реакцию Джонса–Мотта**, называемую также реакцией кожной базофильной гиперчувствительности. Она развивается в ответ на введение очень малых доз белковых веществ в сенсibilизированный организм и может предшествовать формированию антителозависимой реакции гиперчувствительности. Динамика ее такова же, как у классической гиперчувствительности замедленного типа. В основе реакции Джонса–Мотта также лежит ответ CD4<sup>+</sup> T-лимфоцитов. Ее главное отличие от гиперчувствительности замедленного типа — преобладание в клеточных инфильтратах базофилов, что связано с выработкой T-клетками цитокинов, привлекающих эти клетки.

Гиперчувствительность замедленного типа сопровождает иммунную защиту при ряде инфекций, в том числе при туберкулезе и проказе. Именно состояние гиперчувствительности придает иммунным процессам избыточность, определяющую их повреждающий характер. При этом нередко трудно определить, что в большей степени обуславливает патологию,

1. Реакция туберкулинового типа  
(микробная сенсibilизация)



2. Контактная сенсibilизация



**Рис. 4.38.** Особенности фазы сенсibilизации при гиперчувствительности замедленного типа, вызванной бактериальными антигенами и химическими агентами. Основное различие между механизмами сенсibilизации бактериальными антигенами и низкомолекулярными веществами (гаптенами) состоит в том, что дендритные клетки поглощают и процессируют бактериальные антигены так же, как это происходит с любыми внеклеточными молекулами, в то время как клетки Лангерганса поглощают гаптены только после образования ими комплекса с эндогенными белками. В обоих случаях главной эффекторной клеткой служит Т-хелпер типа Th1, а основной эффекторной молекулой —  $\text{IFN}\gamma$

наблюдаемую при таких инфекционных процессах — действие патогена или реакция на него иммунной системы. При названных инфекционных процессах повреждающая составляющая проявляется в резко выраженной пролиферации лимфоидных клеток, гиперактивации макрофагов, формировании гистологических структур типа гранулем (см. раздел 3.5.1.2) и т.д. Гиперчувствительность замедленного типа составляет основу ряда аутоиммунных процессов, например, псориаза.

## 4.6. ОПУХОЛИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ — ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ

Известны злокачественные новообразования, происходящие из всех разновидностей клеток иммунной системы. Наиболее распространены миелоидные лейкозы, традиционно изучаемые в рамках гематологии. В этом разделе будут рассмотрены злокачественные неопластические процессы, затрагивающие лимфоидные клетки, т.е. лимфопролиферативные процессы. При этом внимание будет сосредоточено на иммунологически значимых аспектах этой области онкологии. Классификация лимфопролиферативных процессов представлена в табл. 4.15.

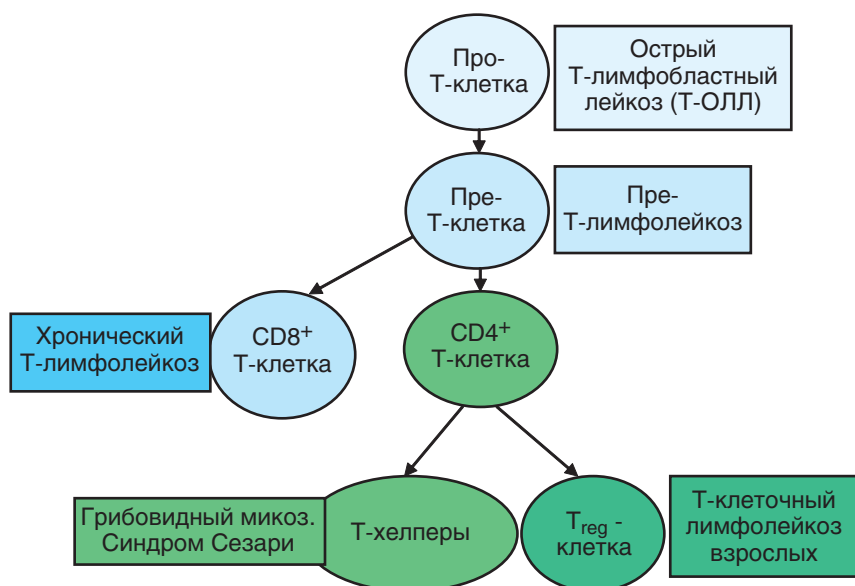
**Таблица 4.15.** Лимфопролиферативные заболевания и соответствующие им стадии развития лимфоцитов

Заболевание	Тип злокачественных клеток	Стадия развития, субпопуляция	Маркеры
<b>Лимфомы</b>			
Фолликулярная лимфома	В-клетки	Зрелые фолликулярные (В2-клетки)	CD19, CD20
Лимфома Беркита	В-клетки	Зрелые В-клетки	То же
Диффузные лимфомы	В-клетки	Зрелые В-клетки	То же
Множественная миелома	В-клетки	Плазматические клетки	CD138
Фунгоидный микоз	Т-клетки	Зрелые CD4 <sup>+</sup> Т-клетки	CD3, CD4, CLA
Синдром Сезари	Т-клетки	Зрелые CD4 <sup>+</sup> Т-клетки	То же
Лимфогранулематоз	Антигенпрезентирующие клетки, Т-клетки	Зрелые дендритные клетки	CD30
<b>Лимфолейкозы</b>			
Острый лимфобластный лейкоз	Лимфоидный предшественник	Общий лимфоидный предшественник	CD10, CD38, TdT
Острый пре-В-клеточный лейкоз	В-клетки	Пре-В-клетки	CD10, CD38, CD19, TdT, $\kappa$ -цепь
Хронический В-лимфоцитарный лейкоз	В-клетки	Зрелые В1-клетки	CD19, CD20, CD5, CD23
Волосовидно-клеточный лейкоз	В-клетки	Незрелые В-клетки	CD19, CD20
Макроглобулинемия Вальденштрема	В-клетки	Лимфобласты, секретирующие IgM	cIgM

#### 4.6.1. Лимфоидные клетки при лимфопролиферативных процессах и их соответствие нормальным прототипам

Тип лимфоцитов, вовлекаемых в злокачественный процесс, определяют с помощью иммунофенотипирования, т.е. выявления мембранных маркеров с использованием моноклональных антител, меченных флуорохромами. Сопоставление спектров лимфоидных клеток, вовлекаемых в злокачественный процесс (табл. 4.15), с численностью соответствующих субпопуляций лимфоцитов и стадий их развития в кровотоке и лимфоидных органов здоровых людей свидетельствует против предположения о неизбирательном, случайном характере их малигнизации. Злокачественные процессы чаще затрагивают В-, чем Т-лимфоциты; лимфомы на основе NK-клеток наиболее редки. Чаще малигнизируются незрелые и промежуточные формы развития лимфоцитов.

Неизвестны лимфомы, возникшие из  $CD4^+CD8^+$  тимоцитов кортикального типа (возможно из-за их высокой чувствительности к апоптозу). Субкапсулярные  $CD4^+CD8^+$  клетки малигнизируются на стадиях, предшествующих перестройке V-генов TCR (острый Т-лимфобластный лейкоз) (рис. 4.39). Лимфомы тимуса часто развиваются у мышей, но редки у человека. В тимусе человека нередко развиваются тимомы — опухоли эпителиальной природы, обычно доброкачественные. Фенотипически клетки тимом сходны с нормальными эпителиальными клетками тимуса. Обычно они сохраняют способность формировать контакты с тимоцитами. Тип тимоцитов — дважды отрицательные ( $CD4^-CD8^-$ ), дважды положительные



**Рис. 4.39.** Соответствие клеток лимфопролиферативных заболеваний стадиям развития Т-лимфоцитов. В ряде случаев выявляют соответствие малигнизированных клеток при лимфомах и лейкозах клеткам, соответствующим определенным этапам нормального лимфопоэза

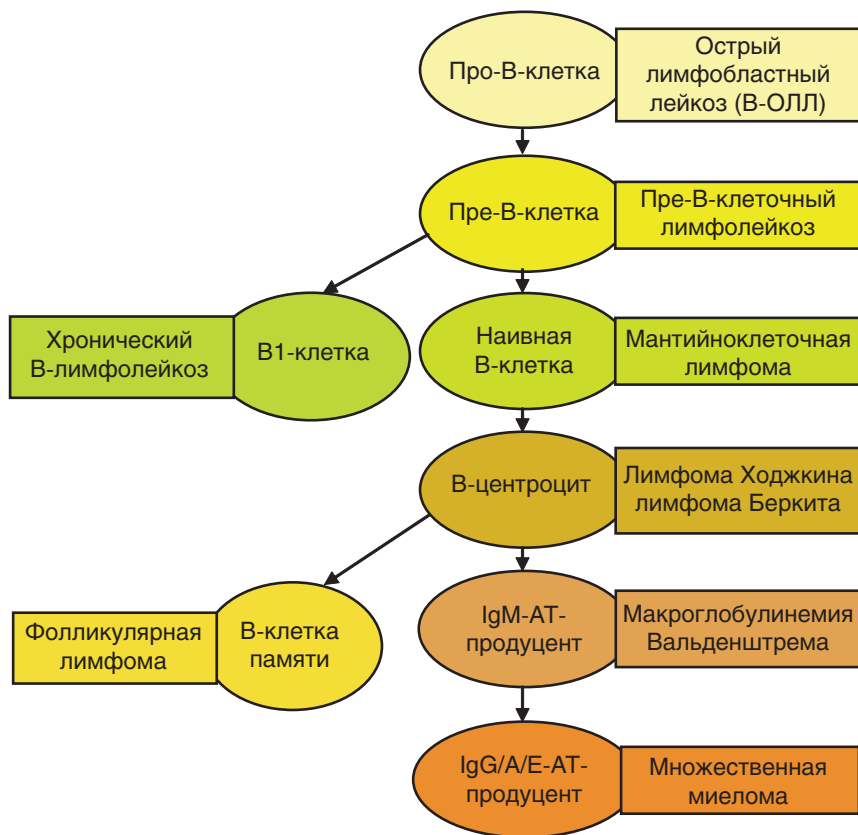
(CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) или моноположительные (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) — может варьировать в разных опухолях. Только при некоторых вариантах злокачественных тимом происходит обеднение тимуса лимфоидными элементами, очевидно, в связи с утратой способности опухолевых эпителиальных клеток взаимодействовать с тимоцитами. Доброкачественные тимомы часто сопровождают развитие тяжелой миастении (см. раздел 4.4.2).

У человека Т-лимфомы обычно локализованы в коже, что, по-видимому, отражает глубинные механизмы взаимоотношений между лимфоидными и эпителиальными клетками. Кожные лимфомы в подавляющем большинстве случаев образованы CD4<sup>+</sup> Т-клетками. Обычно они секретируют цитокины, причем нередко спектр цитокинов поляризован и представлен цитокинами Th1- и Th2-типов. Попытки связать дифференцировочный тип Т-хелперов с формами кожных Т-лимфом — грибовидным микозом или синдромом Сезари — оказались безуспешными. В то же время недавно выявлена связь некоторых вариантов кожных Т-лимфом с естественными регуляторными Т-клетками. Вовлечение в формирование кожных лимфом CD4<sup>+</sup>, а не CD8<sup>+</sup> клеток объясняется возможностью экспрессии на первых, но не на вторых молекулы CLA (*Cutaneous lymphocyte antigen*, см. раздел 2.3.1.1), определяющей хоминг Т-лимфоцитов в кожу: CLA обладает сродством к Е-селектину эндотелиальных клеток сосудов и Е-кадгерину поверхности кератиноцитов. CLA экспрессируется на клетках грибовидного микоза и синдрома Сезари. CD8<sup>+</sup> Т-клетки редко являются субстратом Т-лимфом, но составляют основной клеточный тип при хроническом лимфолейкозе. Причины этой избирательности неясны.

В-клеточные лимфомы также неравномерно охватывают варианты и стадии развития В-лимфоцитов (рис. 4.40). Лимфомы могут развиваться как из фолликулярных (чаще), так и из экстрафолликулярных В-лимфоцитов, формируя соответственно фолликулярные и диффузные лимфомы. Из антителообразующих клеток формируется 2 типа опухолей — макроглобулинемия Вальденштрема и множественная миелома. В-клетки, уже продуцирующие IgM, но еще не превратившиеся в плазмocyты, служат источником макроглобулинемии Вальденштрема. Эта патология локализуется в соответствии с местом расположения ее предшественников в лимфоидных органах. Поскольку плазматические клетки преимущественно мигрируют в костный мозг, в нем локализуются опухолевые узлы множественной миеломы, часто разрушающей костную ткань.

В подавляющем большинстве случаев хронического В-клеточного лимфолейкоза основу злокачественно измененной популяции составляют В1а-лимфоциты — IgM<sup>+</sup> клетки, экспрессирующие молекулу CD5. Это тем более удивительно, что В1-клетки в норме рециркулируют слабо и локализуются в основном в серозных полостях и барьерных тканях.

Особое место среди лимфопролиферативных процессов занимает лимфогранулематоз (болезнь Ходжкина). Природа немногочисленных и диффузно рассеянных опухолевых клеток (клеток Штеренберга и клеток Ходжкина) при лимфогранулематозе точно не определена. Они экспрессируют молекулу CD30 и маркеры, свойственные как В-лимфоцитам, так и клеткам миелоидного ряда. В настоящее время склонны считать, что эти клетки представляют собой злокачественные дендритные клетки.

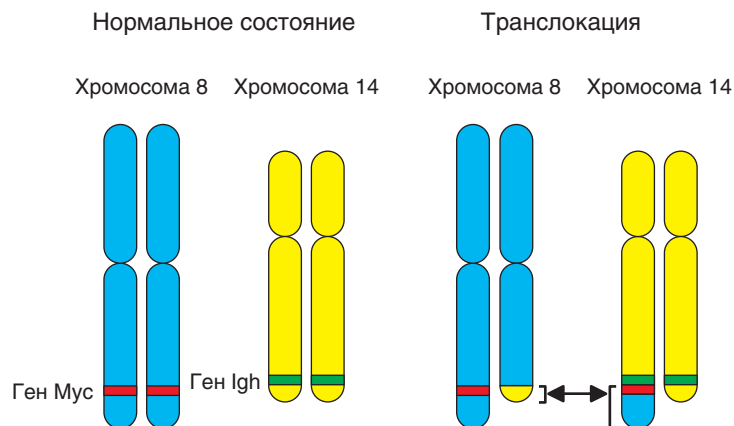


**Рис. 4.40.** Соответствие клеток лимфопролиферативных заболеваний (лимфолейкозов, лимфом) стадиям развития В-лимфоцитов. В ряде случаев выявляют соответствие малигнизированных клеток при лимфомах и лейкозах клеткам, соответствующим определенным этапам нормального лимфопоэза

Существует несколько вариантов этого заболевания, отличающихся численностью и степенью активации лимфоцитов (главным образом Т-клеток) в очагах поражения. При варианте лимфогранулематоза с лимфоидным преобладанием Т-клетки многочисленны и активно пролиферируют (возможно, это следствие процесса презентации антигена в измененной форме). При другой форме — узелковом склерозе — лимфоцитов в очаге поражения мало, они не пролиферируют и преобладает злокачественный процесс, захватывающий строму.

#### 4.6.2. Генетические перестройки и вирусная инфекция при лимфопролиферативных процессах

Общеизвестна роль, которую играют онкогены в развитии опухолей. Утрата нормальной регуляции экспрессии протоонкогенов делает их активность бесконтрольной и превращает их в онкогены. Это происходит при пространственном перемещении протоонкогенов в процессе хромосомных



**Рис. 4.41.** Хромосомная перестройка, ассоциированная с лимфомой Беркита. Транслокация приводит к сближению генов *Мус* и *Igh*, что сказывается на экспрессии гена *Мус* и функционировании его продуктов

перестроек или вследствие встраивания вирусных генов в геном клетки. Яркие и типичные примеры активации онкогенов, приводящие к развитию злокачественного процесса, обнаружены при лимфопролиферативных заболеваниях.

Подробно изучены транслокации участков хромосомы 8 (содержит протоонкоген *c-myc*) и хромосомы 18 (содержит протоонкоген *bcl-2*) в хромосому 14, в результате которых названные протоонкогены оказываются в непосредственной близости от гена Н-цепи иммуноглобулинов — *IGH* (рис. 4.41). Эти два типа перестроек служат предпосылкой развития соответственно В-клеточной лимфомы Беркита и других вариантов фолликулярной В-лимфомы. При лимфоме Беркита может происходить перенос фрагмента хромосомы 8 с геном также в хромосому 2 и хромосому 22, к локусам, занимаемым генами *IGK* и *IGL*, кодирующим соответственно κ- и λ-цепи иммуноглобулинов. При той же лимфоме вслед за транслокацией участка, содержащего ген *c-myc*, может последовать транслокация участка, который содержит ген *bcl-2*, что повышает злокачественность лимфопролиферативного процесса.

**Лимфома Беркита** имеет вирусную природу. Ее вызывает вирус Эпштейна—Барр, часто присутствующий в организме человека в латентной форме или вызывающий инфекционный мононуклеоз. Это заболевание состоит во временной доброкачественной пролиферации В-лимфоцитов. Причина пролиферации В-клеток при этом заключается в том, что один из продуктов вируса является транскрипционным фактором, способствующим индукции генов, причастных к митогенезу. При этом не происходит транслокаций указанного выше типа. В тех случаях, когда происходит транслокация, развивается злокачественный лимфопролиферативный процесс — лимфома Беркита. Обычно такая транслокация происходит редко, лишь при условии действия кофакторов. Однако в некоторых регионах Африки, где эти кофакторы распространены, лимфома Беркита имеет характер эпидемии.

Тот же вирус при сочетании с действием других кофакторов вызывает два других заболевания — рак носоглотки (также имеющий эпидемический характер) и лимфогранулематоз. Таким образом, инфицирование вирусом Эпштейна–Барр — ведущее, но не единственное условие формирования генетических перестроек и развития лимфом. В то же время между формированием транслокаций и развитием лимфопролиферативного процесса есть тесная связь.

Уже упоминалось о том, что частота злокачественных процессов, связанных с пролиферацией В-клеток, у человека выше, чем частота Т-клеточных лимфопролиферативных процессов. Обратную ситуацию наблюдают при анализе злокачественного поражения лимфоидной ткани на фоне подавления иммунитета — при наследственных иммунодефицитах или после действия иммуносупрессивных агентов (облучения, химиопрепаратов). В этих случаях малигнизации чаще подвергаются Т-лимфоциты.

Особый интерес представляет атакия-телеангиоэктазия (см. раздел 4.7.1.3), при которой иммунодефицит сочетается с нестабильностью хромосом. При этом заболевании выявляют 2 основных типа транслокаций, один из которых не сопровождается развитием опухолевых процессов, а другой приводит к формированию Т-клеточного лейкоза. Второй тип транслокаций затрагивает ген, локализованный в хромосоме 14 и обозначаемый *TCL1* (по аналогии с геном *BCL2*). Чаще всего фрагмент, содержащий этот ген, перемещается в участки хромосом, в которых локализованы гены полипептидных цепей TCR, в первую очередь *TCRA* (14q11), кодирующий  $\alpha/\delta$ -цепи TCR, несколько реже — к гену *TCRB* (7q35). В данном случае связь с вирусной инфекцией не установлена.

Вирус является основной причиной другого Т-лимфопролиферативного процесса — острого Т-клеточного лейкоза взрослых. Это заболевание вызывается вирусом HTLV-1 — лимфотропным вирусом, по ряду свойств сходным с ВИЧ. Как и ВИЧ, он обладает сродством к CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам, однако вызывает их трансформацию, а не разрушение. Как и при лимфоме Беркита, для индукции этого заболевания требуется «сотрудничество» вируса с кофакторами, имеющими эндемичную природу. Эндемичная зона для этой формы лейкоза — южные Японские острова.

Во всех рассмотренных случаях протоонкогены перемещаются в участки хромосомы, содержащие гены антигенраспознающих рецепторов BCR и TCR, в которых в норме происходят процессы реаранжировки. Очевидно, это не случайно и вирусы используют повышенную готовность этих участков к рекомбинации. Типичное следствие таких перемещений генов — злокачественная лимфопролиферация — находится в очевидной связи с запуском физиологической активации при воздействии на продукты этих генов — рецепторы для антигенов. Инфекционный мононуклеоз является процессом, моделирующим ту же ситуацию в доброкачественном варианте.

Наиболее четкий ответ на вопрос, способны ли малигнизированные лимфоциты выполнять присущие им в норме функции, получен при изучении малигнизированных плазмочитов при множественной миеломе. Еще в начале 70-х годов было установлено, что при этом заболевании в сыворотке крови электрофоретически выявляют гомогенный пик (М-компонент), образуемый иммуноглобулинами. Затем было показано, что эти

иммуноглобулины обладают активностью антител со специфичностью, идентичной для всех молекул. Специфичность таких антител непредсказуема. Иногда эти антитела связывают даже синтетические гаптены. Однако чаще они направлены против иммунодоминантных компонентов бактерий, например, фосфорилхолина. Все эти данные свидетельствуют о моноклональном происхождении указанных иммуноглобулинов-антител. Это вполне соответствует представлениям о клональной структуре иммунной системы и служит свидетельством происхождения множественной миеломы в результате малигнизации клона плазмочитов, «выбираемого» случайно.

Таким образом, по крайней мере при малигнизации, эффекторные клетки иммунной системы сохраняют свою функцию (в случае с плазмочитом она состоит в секреции антител заданной специфичности). Однако на уровне популяции клеток и организма в целом, задача, связанная с иммунным ответом, при этом не выполняется, поскольку, во-первых, ответ малигнизированных плазмочитов не является адаптивным, во-вторых, он моноклонален, т.е. не может адекватно отразить множественность антигенных стимулов, проявляющихся при инфицировании и других видах биологической агрессии. Нормальная составляющая иммунного ответа при множественной миеломе страдает не только от ее «вытеснения» пролиферирующим клоном, но и от действия регуляторных механизмов. Они срабатывают в ответ на избыточное развитие моноклонального процесса и направлены на его ограничение, но в результате подавляют не его (этот процесс не реагирует на регуляторные сигналы), а нормальный иммунный ответ.

Моноклональность свойственна всем злокачественным лимфопролиферативным процессам. Однако в других случаях пролиферации зрелых форм лимфоцитов ее удастся зарегистрировать не по продуктам, секретиремым клетками, а по результатам генетического анализа реаранжировки генов BCR и TCR. Характер перестройки генов идентичен для злокачественных клеток в каждом конкретном случае заболевания, но различен для каждого из них.

Представляют интерес немногочисленные результаты систематического анализа комплекса цитокинов, продуцируемых малигнизированными лимфоцитами, хотя четкой связи разновидностей Т-лимфом с определенным типом дифференцировки Т-клеток, вопреки первоначальным ожиданиям, установить не удастся.

По-видимому, в большинстве злокачественных процессов с вовлечением зрелых лимфоцитов трансформированные клетки сохраняют сформировавшиеся функции, особенно секреторные, так же, как экспрессию свойственных им маркерных молекул, функционально значимых рецепторов и молекул адгезии. «Правильное» следование свойственным им путям миграции позволяет считать, что экспрессируемые молекулы действительно выполняют свои функции. В то же время сомнительно, чтобы малигнизированные клетки могли адекватно реагировать на регуляторные сигналы, контролируемые их специфическую активность, и практически невозможно проверить, способны ли лейкозные CD8<sup>+</sup> Т-клетки осуществлять лизис специфических клеток-мишеней, поскольку специфичность их TCR никогда не удавалось установить.

Немногочисленные попытки оценить при Т-клеточных лимфопролиферативных заболеваниях состояние компонентов иммунной системы, не затронутых малигнизацией, свидетельствуют о преобладании отрицательных регуляторных воздействий. Последние обусловлены активацией регуляторных Т-клеток и направлены на ограничение неадекватной пролиферации злокачественных клонов Т-лимфоцитов. К этому надо добавить, что объем нормального компонента иммунной системы, как правило, уменьшен в результате его вытеснения малигнизированными Т-клетками. В результате при всех заболеваниях указанной группы (особенно при лейкозах) развивается тотальный иммунодефицит.

## 4.7. ИММУНОДЕФИЦИТЫ

Иммунологическая недостаточность, наряду с ее антиподом — гиперчувствительностью — одно из основных проявлений патологии иммунитета. Иммунодефициты разделяют на первичные (врожденные), основанные на генетических дефектах, и вторичные (приобретенные), формирующиеся под влиянием различных воздействий, эндогенных и экзогенных. Провести четкую границу между ними не всегда возможно, поскольку чувствительность к действию иммунодепрессивных факторов обусловлена генетически.

### 4.7.1. Первичные иммунодефициты

Концепция первичных иммунодефицитов сложилась в 60-е годы XX века, хотя отдельные наследственные заболевания иммунной системы были описаны ранее. Генетически обусловленные иммунодефициты с самого начала рассматривали как «эксперименты природы» [Р. Гуд (*R. Good*)], изучение которых помогает понять иммунологические механизмы. Действительно, в ряде случаев анализ молекулярных основ иммунодефицитов позволил выявить новые детали структуры и функционирования иммунной системы, однако природа дефектов, лежащих в основе первичных иммунодефицитов, чаще становилась известна после раскрытия общих иммунологических закономерностей, клиническим подтверждением которых они оказывались.

Первичные иммунодефициты — крайне редкие заболевания. Большинство из них выявляют с частотой 1 на  $10^5$ – $10^6$ , некоторые — с частотой 1 на  $10^4$ . Только для селективного дефицита IgA определена частота 1 на 500–1000. Заболевания этой группы выявляют преимущественно в детском возрасте, поскольку многие больные не доживают до 20 лет, а у остальных дефекты в определенной степени компенсируются. Благодаря успешному лечению верхний возрастной порог оказался более размытым, чем раньше.

В связи с особой тяжестью этих редких патологий, а также значительным научным интересом, который представляет каждый конкретный случай заболевания, первичные иммунодефициты привлекают к себе внимание не только иммунологов. Всемирная организация здравоохранения с определенной периодичностью публикует материалы, отражающие состояние этой проблемы.

#### 4.7.1.1. Общие проблемы генетики первичных иммунодефицитов

Для понимания генетики первичных иммунодефицитов полезно сопоставить спектры генетических нарушений, лежащих в их основе, с двумя аналогичными спектрами — суммой данных о последствиях генетического нокаута генов и набором мутаций генов, имеющих отношение к иммунной системе, отобранных и закрепленных в линиях мышей.

В основе генетического нокаута лежит генно-инженерная технология, состоящая в следующем. В ген, подлежащий выключению, вводится ген устойчивости к неомицину (*neo*), который одновременно расщепляет ген-мишень и служит маркером. С одной или обеих сторон от гена-мишени помещают второй маркерный ген *HSV-tk*, кодирующий тимидинкиназу вируса простого герпеса. Ген *neo* придает клеткам устойчивость к неомицину и его аналогам, а ген *HSV-tk* — к противовирусному препарату ганцикловиру. Эту конструкцию вводят в клетки, которые помещают в культуру, содержащую аналог неомицина и ганцикловир. Клетки, в которые описанная конструкция не интегрировалась, гибнут от действия аналога неомицина. Клетки, в ДНК которых конструкция встроилась в нехарактерном для данного гена месте, гибнут от действия ганцикловира. Выживают только клетки, в которых введенная конструкция заняла положенное место и уже вступила в рекомбинацию с нормальным геном, в результате которой ген *HSV-tk* был «выброшен» как негомологичный (отсюда — устойчивость к ганцикловиру). В таких клетках ген-мишень, расщепленный внедрением гена *neo*, не работает, в то время как ген *neo* функционирует и обеспечивает устойчивость к неомицину и его аналогам. Если подобная процедура проделана с зиготой, которую можно ввести в матку самке и получить потомство, удастся создать мышей с целенаправленно удаленным геном.

С помощью данной процедуры получено очень большое количество «нокаутных» мышей, у которых инактивированы гены, кодирующие различные молекулы, которые участвуют в развитии клеток иммунной системы и осуществлении иммунологических процессов. Этот подход используют для наиболее четкого определения функциональной роли конкретных молекул в организме. Следствия нокаута генов, кодирующих иммунологически значимые молекулы, весьма разнообразны — от эмбриональной летальности до отсутствия эффектов. Гибель на стадиях эмбрионального развития обычно обусловлена участием молекул в ключевых событиях эмбриогенеза. Само по себе нарушение иммунологических функций не может быть причиной смерти (органы и клетки иммунной системы не относятся к жизненно важным органам) и в условиях особого содержания жизнеспособность обеспечивается при поражениях иммунной системы любой степени тяжести.

С другой стороны, выясняется, что хотя функциональные тесты *in vitro* и даже *in vivo* свидетельствуют о наличии у отдельных молекул тех или иных функциональных эффектов (например, у цитокинов, — способности вызывать пролиферацию определенных клеток), выключение соответствующего гена путем нокаута не всегда приводит к утрате функций, выполняемых продуктами его экспрессии. Чаще всего причина такого несоответствия — феномен избыточности, состоящий в том, что один и тот же функциональный эффект может быть вызван несколькими молекулами. Выключение генов каждой из них желаемого эффекта не дает и только выключение генов

всего комплекса молекул, выполняющих эту функцию, устраняет изучаемый эффект. Это означает, что далеко не все генетические изменения вызывают видимые функциональные нарушения на уровне организма. С другой стороны, опыт использования генетического нокаута позволил получить достаточно полную информацию о молекулярном обеспечении процессов, обуславливающих развитие и функционирование иммунной системы.

Другой ряд иммунологических феноменов генетической природы, с которым следует сопоставить первичные иммунодефициты, представляет спектр линий мышей, несущих мутации, влияющие на иммунную систему. Мутации, регистрируемые у лабораторных мышей, отбирались искусственно и закреплялись в линиях. В естественных популяциях многие из этих мутаций не могли бы закрепиться. Спектр мутаций мышей, по крайней мере потенциально, более широк, чем спектр мутаций, лежащих в основе первичных иммунодефицитов.

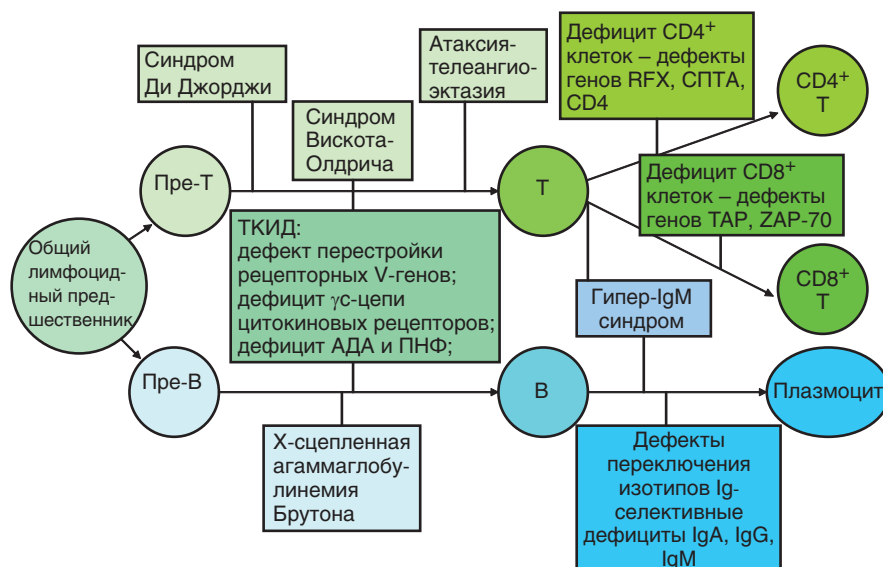
Проведенное сопоставление позволяет констатировать, что наблюдаемый спектр первичных иммунодефицитов человека сужен по сравнению с максимально возможным спектром мутаций иммунологически значимых генов в связи с эмбриональными потерями и выбраковкой мутаций на популяционном уровне под действием отбора. Даже в том минимальном объеме, в каком отбор проявляется в человеческой популяции, его достаточно, чтобы элиминировать очевидно вредные мутации. Действие отбора на мутации, обуславливающие развитие наследственных заболеваний, будет полностью исчезать по мере разработки эффективных методов лечения. С другой стороны, необходимо учитывать, что фенотипически проявляются только мутации тех генов, которые кодируют незаменимые молекулы. Этим объясняется, например, редкость первичных иммунодефицитов, затрагивающих систему цитокинов, для которой характерна максимальная избыточность.

#### **4.7.1.2. Локализация иммунологических дефектов при первичных иммунодефицитах**

В этой главе будет рассмотрена общая схема иммунопатологии, развивающейся при первичных иммунодефицитах. Конкретным первичным иммунодефицитам посвящены разделы 4.7.1.4 и 4.7.1.5.

Отдельно рассмотрим патологию, затрагивающую развитие и функционирование клеток иммунной системы. Обращает на себя внимание, что все иммунодефициты, приводящие к нарушению развития клеток иммунной системы, затрагивают исключительно лимфоидные ростки. Заболеваний, в основе которых лежало бы нарушение дифференцировки миелоидных клеток, по-видимому, не существует. Вероятно, соответствующие генетические дефекты затрагивают более широкий спектр клеток и тканей, а потому приводят к гибели развивающихся эмбрионов.

Первичные иммунодефициты, связанные с нарушением развития лимфоидных клеток, наоборот, очень многочисленны. Спектр первичных иммунодефицитов в незначительной степени отражает стадии нормальной дифференцировки лимфоцитов (некоторые данные, касающиеся поражения Т-линии лимфопоеза отражены на рис. 4.42). Наиболее ранний этап развития лимфоидных клеток, на котором могут происходить их гене-



**Рис. 4.42.** Связь первичных иммунодефицитов с дифференцировкой лимфоцитов. Дефекты развития и функционирования Т-клеток при мутациях могут быть приурочены к определенным этапам их развития

тические изменения, — стадия ранних лимфоидных предшественников. Выживаемость и пролиферацию про-Т- и про-В-клеток обеспечивает IL-7, предшественников NK-клеток — IL-15. Выпадение общей структуры рецепторов этих цитокинов —  $\gamma$ (с)-цепи приводит к гибели ранних предшественников Т- и NK-лимфоцитов и прекращению развития соответствующих линий лимфоидных клеток, тогда как предшественники В-лимфоцитов выживают за счет избыточности цитокинов, обеспечивающих эту стадию развития В-клеток. Аналогичный эффект в отношении развития Т-клеток достигается при мутациях  $\alpha$ -цепи рецептора IL-7 и тирозинкиназы Jak3, связанной с  $\gamma$ (с)-цепью. Блокада развития Т-лимфоцитов не дает возможности наблюдать проявления дефектов  $\gamma$ (с)-цепи и Jak3 на уровне действия IL-2, IL-4 и других цитокинов, чьи рецепторы содержат  $\gamma$ (с)-цепь и передают сигнал с участием Jak3, поскольку клетки не доживают до этих стадий развития.

Другая группа генетических нарушений, влияющих на развитие лимфоцитов, связана с перестройкой генов антигенраспознающих рецепторов и затрагивает Т- и В-лимфоциты. Среди многочисленных факторов, вовлекаемых в перестройку V-генов, в развитии первичных иммунодефицитов участвуют мутации генов рекомбиназ RAG-1 и RAG-2, запускающих эту перестройку, а также ДНК-зависимой протеинкиназы, участвующей в реализации ее промежуточных этапов. Кроме того, на этой стадии проявляется эффект мутации генов *ATM* и функционально родственных факторов при атаксии-телеангиоэктазии и других синдромах нестабильности хромосом вследствие неполноценности процессов репарации ДНК. Любые нарушения

реаранжировки V-генов и гибель клеток на этой стадии приводит к блоку развития лимфоцитов, несущих антигенраспознающие рецепторы, т.е. Т- и В-клеток. К аналогичным результатам приводит дефект сборки молекул, связанных с антигенраспознающим рецептором, например, дефект цепей комплекса CD3, нарушающий его экспрессию и развитие Т-клеток.

Несколько разновидностей первичных иммунодефицитов связано с нарушением селекции развивающихся лимфоцитов и дифференцировки субпопуляций. Основная разновидность первичных В-клеточных иммунодефицитов — агаммаглобулинемия Брутона основана на блоке развития В-лимфоцитов вследствие нарушения передачи сигнала от промежуточных пре-BCR-рецептора, временно присутствующего на поверхности развивающихся В-клеток и свидетельствующего о правильно реализованной реаранжировке V-гена H-цепей. Несколько Т-клеточных дефицитов обусловлено нарушением развития одной из основных субпопуляций, вызванного отсутствием экспрессии молекул МНС-I или МНС-II. Причина этого — мутация как самих генов МНС, так и генов, регулирующих их экспрессию (особенно в случае генов группы МНС-II), а также нарушающих подготовку антигенных пептидов к встраиванию в молекулы МНС (нарушение транспорта пептида при дефектах генов *TAP*, — причина отсутствия молекул CD8 и соответствующей субпопуляции Т-клеток). Наконец, могут быть нарушены сигнальные пути, обеспечивающие дифференцировку клеток (дефект *ZAP-70* препятствует развитию CD8<sup>+</sup> Т-клеток).

Дефект факторов эпителиального микроокружения тимуса — причина нескольких вариантов дефицита Т-лимфоцитов (синдром Ди Джорджи, дисгенезия тимуса). Дефект эктопической экспрессии внетимусных органоспецифических антигенов в эпителиальных клетках мозгового слоя тимуса приводит к неполной элиминации аутоспецифических клонов в ходе отрицательной селекции тимоцитов, что служит основой синдрома APECED.

Первичные иммунодефициты, реализуемые на уровне зрелых клеток адаптивного иммунитета, более редки и затрагивают преимущественно В-лимфоциты. Дефекты гомеостатических факторов BAFF и APRIL приводят к неполноценности процессов, обеспечивающих нормальную численность и функциональную активность этих клеток в периферическом отделе иммунной системы. Существует несколько вариантов селективных дефицитов классов иммуноглобулинов. Самый распространенный из них — селективный дефицит IgA, который, однако, не всегда проявляется клинически. Эта группа иммунодефицитов обусловлена дефектами механизма переключения C<sub>H</sub>-генов. На уровне лимфоцитов реализуется дефект, лежащий в основе гипер-IgM-синдрома, суть которого сводится к нарушению контактных взаимодействий Т-лимфоцитов и АПК, обусловленных молекулами CD40 и CD154 (мутация гена CD154 — наиболее частая причина этой патологии). Нарушения, связанные с дефектами белка цитоскелета при синдроме Вискотта—Олдрича, также проявляются в значительной степени на уровне функционирования клеток адаптивного иммунитета.

Несколько первичных иммунодефицитов обусловлены дефектностью клеток или гуморальных факторов, сдерживающих иммунные процессы. Примерами могут служить IPeX-синдром, при котором нарушается развитие естественных регуляторных Т-клеток, и аутоиммунный лимфопро-

лиферативный синдром, при котором нарушаются механизмы апоптоза, что приводит к дефекту элиминации аутоспецифических клонов. В обоих случаях происходит растормаживание аутоиммунных процессов и усиленная пролиферация лимфоцитов в местах систематического воздействия антигена (кишечник и т.д.).

Генетические дефекты, затрагивающие врожденный иммунитет, проявляются в основном на стадии реализации его эффектов. Нарушения этой группы могут затрагивать ферменты, обуславливающие формирование факторов бактерицидности (например, NADPH-оксидазы), молекулы адгезии, необходимые для миграции клеток (варианты LAD-синдрома), механизмы высвобождения внутриклеточных гранул (синдром Чедиака–Хигаси). Большую группу образуют иммунодефициты, обусловленные дефектом генов, кодирующих компоненты комплемента. В связи с упоминавшейся выше избыточностью следствия этих дефектов редко бывают тяжелыми. С другой стороны, генетически обусловленный дефект ингибитора C1q вызывает тяжелые последствия в виде отека при вовлечении каскада факторов нескольких систем, участвующих в развитии сосудистых реакций при воспалении.

#### **4.7.1.3. Нарушение иммунной защиты и проявления иммунопатологии при первичных иммунодефицитах. Проблемы диагностики и лечения**

Традиционно первичные иммунодефициты разделяют по преобладающему типу поражения на 3 типа: клеточные, гуморальные и комбинированные. Учитывая современные данные о взаимосвязи различных ветвей иммунитета, эта классификация представляется малоинформативной, поскольку изолированных форм иммунодефицитов практически не существует. Даже при такой, на первый взгляд, изолированно гуморальной форме иммунодефицита, как агаммаглобулинемия Брутона, Т-клеточный иммунитет не вполне интактен. В еще большей степени это относится к первичным иммунодефицитам, вызванным мутациями генов, затрагивающим Т-клетки. Недаром большинство таких иммунодефицитов относят к тяжелым комбинированным. Особенно ярко относительность разделения на Т- и В-клеточные иммунодефициты проявляется на примере гипер-IgM-синдрома: хотя мутацию претерпевает ген *CD154*, экспрессируемый Т-клетками, ее следствие — изменение спектра изотипов антител, продуцируемых В-клетками. Более продуктивно, хотя также весьма относительно (по той же причине) разделение иммунодефицитов на вызывающие поражение врожденного и адаптивного иммунитета.

Хотя первичные иммунодефициты относят к тем немногим заболеваниям, при которых рекомендуется фенотипическая оценка содержания в кровотоке лимфоцитов, относящихся к различным популяциям, информация, получаемая с помощью такого подхода, представляет ценность только при радикальной блокаде развития тех или иных популяций или субпопуляций (табл. 4.16). Эти случаи практически полностью укладываются в группу ТКИН и агаммаглобулинемии Брутона. В остальных случаях данные о численности клеток, принадлежащих к различным субпопуляциям, малоинформативны. При адекватной лабораторной диагностике следует выявлять клетки или молекулы, поврежденные в результате мутаций.

Примером может служить оценка экспрессии мембранного CD154 на активированных Т-клетках при гипер-IgM-синдроме, молекул классов и субклассов иммуноглобулинов и компонентов комплемента при соответствующих иммунодефицитах, а также выявление с помощью полимеразной цепной реакции экспрессии мутантных генов, кодирующих  $\gamma(c)$ , btk, Phox, ZAP-70, ATM, FOXP3, Fas и другие молекулы, повреждаемые мутациями. Еще более адекватен молекулярно-генетический анализ с установлением локализации и природы мутаций (делеции, одиночные замены нуклеотидов, миссенс-мутации и т.д.).

**Таблица 4.16.** Отклонения от нормы клинико-иммунологических показателей при наиболее распространенных первичных иммунодефицитах. (Здесь и в табл. 4.17 представлены данные для 8 наиболее распространенных первичных иммунодефицитов)

Нарушение	Первичные иммунодефициты
Изменение числа Т-клеток	Снижение содержания при большинстве разновидностей тяжелой комбинированной иммунной недостаточности. CD4 <sup>+</sup> Т-клетки: снижение содержания при атаксии-телеангиоэктазии, синдроме Вискотта—Олдрича; повышение содержания при хронической гранулематозной болезни; CD8 <sup>+</sup> Т-клетки: повышение содержания при общем переменном иммунодефиците
Снижение числа В-клеток	Агаммаглобулинемия Брутона
Изменение функции лимфоцитов	При большинстве иммунодефицитов функции ослаблены
Изменение уровня иммуноглобулинов	IgM: снижение при агаммаглобулинемии Брутона, общем переменном иммунодефиците; повышение при атаксии-телеангиоэктазии, хронической гранулематозной болезни, гипер-IgM-синдроме, гипер-IgE-синдроме; IgG: снижение при агаммаглобулинемии Брутона, общем переменном иммунодефиците, гипер-IgM-синдроме; повышение при хронической гранулематозной болезни; IgA: снижение при — селективном дефиците IgA, агаммаглобулинемии Брутона, атаксии-телеангиоэктазии, общем переменном иммунодефиците, гипер-IgM-синдроме; повышение при синдроме Вискотта—Олдрича

Каковы бы ни были природа и мишени поражения при первичных иммунодефицитах, их значимость с точки зрения медицинской практики определяется клиническими проявлениями (табл. 4.17). Из самого термина «первичные иммунодефициты» следует, что основа их клинических проявлений — иммунодефицит.

**Таблица 4.17.** Клинические проявления недостаточности иммунитета при наиболее распространенных первичных иммунодефицитах

Проявление	Первичные иммунодефициты
Поражение респираторного тракта	У всех больных при общей вариательной иммунной недостаточности, гипер-IgM-синдроме, агаммаглобулинемии Брутона; у большинства больных при синдроме Вискотта—Олдрича, атаксии-телеангиоэктазии, селективном дефиците IgA, гипер-IgE-синдроме
Поражение ЛОР-органов	У всех больных — при общей вариательной иммунной недостаточности; у большинства больных — при агаммаглобулинемии Брутона, гипер-IgM-синдроме, атаксии-телеангиоэктазии, синдроме Вискотта—Олдрича, гипер-IgE-синдроме
Поражение кожи	У всех больных — при гипер-IgE-синдроме; у большинства больных — при синдроме Вискотта—Олдрича, хронической гранулематозной болезни, гипер-IgM-синдроме, агаммаглобулинемии Брутона
Поражение пищеварительного тракта	У большинства больных при синдроме Вискотта—Олдрича; у 20–40% — при гипер-IgM-синдроме, агаммаглобулинемии Брутона, общей вариательной иммунной недостаточности, атаксии-телеангиоэктазии
Изменения лимфоидных органов	Гиперплазия — при хронической гранулематозной болезни, синдроме Вискотта—Олдрича, гипер-IgM-синдроме; гипоплазия — при общей вариательной иммунной недостаточности, агаммаглобулинемии Брутона
Аутоиммунная патология	В 20–50% случаев — при агаммаглобулинемии Брутона, общей вариательной иммунной недостаточности, гипер-IgM-синдроме, селективном дефиците IgA
Аллергия	У всех больных — при гипер-IgE-синдроме, синдроме Вискотта—Олдрича; в 6–23% случаев — при селективном дефиците IgA, агаммаглобулинемии Брутона, гипер-IgM-синдроме, общей вариательной иммунной недостаточности
Злокачественные опухоли	В 6–20% случаев — при атаксии-телеангиоэктазии, синдроме Вискотта—Олдрича, агаммаглобулинемии Брутона

Он имеет проявления, существенно различающиеся по вкладу в клиническую картину заболеваний:

- рецидивирующее инфекционное поражение, затрагивающее преимущественно барьерные ткани;
- аутоиммунная патология;
- аллергические проявления;
- злокачественные (в основном лимфопролиферативные) новообразования;
- изменения со стороны лимфоидных и кроветворных органов.

Основное и наиболее универсальное клиническое проявление иммунодефицитов — ослабление резистентности к патогенам, реализующееся в виде инфекционных процессов, преимущественно затрагивающих барьерные ткани — слизистые оболочки и кожу. Наблюдаемое разнообразие клиники

иммунодефицитов сводится преимущественно к выключению защиты от разных типов патогенов — внеклеточных и внутриклеточных. Очевидно, что преимущественное поражение В-клеточного звена иммунной защиты, а также факторов комплемента приводит к ослаблению защиты в первую очередь от внеклеточных патогенов и их токсинов; повреждение  $CD4^+$  Т-клеток и их Th1-субпопуляции — к нарушению защиты от внутриклеточных патогенов, локализованных в гранулах; поражение  $CD8^+$  Т-и NK-клеток — к нарушению защиты от внутриклеточных патогенов, интегрированных в геном или локализованных в цитозоле. Нарушение факторов врожденного иммунитета, связанных с фагоцитозом и факторами бактерицидности, затрагивает защиту преимущественно против патогенов двух первых типов.

Клинический анализ показывает, что при первичных иммунодефицитах, помимо классических патогенов, в качестве причины инфекционных процессов часто выступают «оппортунистические агенты» — *Pneumocystis carinii*, *Candida*, цитомегаловирус и другие патогены. Чаще всего инфекционные агенты поражают области максимального контакта с ними — слизистые оболочки и кожу. На первом месте среди поражаемых органов стоит респираторный тракт — его бронхиально-легочный отдел (бронхиты, пневмонии) и ЛОР-органы. Затем следуют ротовая полость, кожа и ее производные (ногти и т.д.). Достаточно часто страдает пищеварительный тракт (энтериты), однако в ряде случаев это обусловлено прямым следствием генетического дефекта иммунной системы, проявляющегося в ее кишечном отделе. Поражение инфекционными агентами проявляется практически у всех больных с первичными иммунодефицитами (по разным данным, в 75–100%). Значительно реже наблюдают крайнее проявление инфекционных заболеваний — септицемию (до 30% при синдроме Вискотта–Олдрича).

Значительно реже при первичных иммунодефицитах проявляются аутоиммунные процессы в форме полиэндокринопатий, волчаночного васкулита, синдрома Шегрена, ревматоидных поражений, аутоиммунного гепатита. В большинстве случаев эта симптоматика проявляется как следствие дефекта развития регуляторных клеток, а также селекции тимоцитов. При IPEX-, APECED- и X-сцепленном лимфопролиферативном синдроме аутоиммунная симптоматика становится основной.

Аллергическая патология более редка. Обычно она связана с усиленной экспрессией факторов, участвующих в патогенезе аллергии немедленного типа (например, при гипер-IgE-синдроме) или со снятием сдерживающих факторов (при IPEX-синдроме). В других случаях (синдром Вискотта–Олдрича) природа проявления аллергии не выяснена.

При некоторых первичных иммунодефицитах, особенно с преобладающим поражением клеточного иммунитета, повышена частота развития злокачественных новообразований, прежде всего лимфом. Наиболее высока частота развития злокачественных опухолей при атаксии-телеангиоэктазии, что обусловлено ослаблением молекулярного надзора за генетическими нарушениями, часто приводящими к опухолевой трансформации клеток. При этом иммунодефиците частота опухолей достигает 10–20% и проявляется практически исключительно в форме лимфом и миелолифферативных заболеваний. Обращает на себя внимание высокая частота Т-клеточного лимфолейкоза, в развитии которого участвуют хромосомные

перестройки (см. раздел 4.6.2). Значительное повышение частоты опухолей лимфоретикулярного генеза наблюдают при синдроме Вискотта—Олдрича (15%) и X-сцепленной агаммаглобулинемии Брутона (6%).

Первичные иммунодефициты — тяжелые заболевания, которые без адекватного лечения приводят к гибели (обычно вследствие инфекционных поражений, реже — опухолей) в возрасте до 20 лет. При особотяжелых формах иммунодефицитов, например, ТКИН, летальный исход наблюдают на первом году жизни. Хотя лечение, используемое в настоящее время, далеко от совершенства, его применение обуславливает существенное удлинение срока жизни пациента (нередко дольше 20 лет). Лечение включает применение 2 основных средств — антибиотиков и иммуноглобулина для внутривенного введения. Антибиотики защищают от развития инфекционных заболеваний. Внутривенный иммуноглобулин содержит естественные антитела, действие которых не всегда понятно, но в целом их рассматривают как факторы заместительной терапии. Более радикальной считают заместительную терапию пересадкой аллогенного костного мозга, однако она несет опасность развития болезни «трансплантат против хозяина» или отторжения чужеродных клеток. Наиболее адекватным средством лечения первичных иммунодефицитов могла бы стать генотерапия. Ее суть сводится к трансфекции недостающего гена в аутологичные клетки костного мозга с последующей их подсадкой. Несмотря на ясность и принципиальную выполнимость данного подхода, он не нашел достаточно широкого применения не только в связи с высокой стоимостью, но и в связи с возможностью развития непредвиденных побочных эффектов, обусловленных самой технологией трансфекции генов. Этот подход успешно использовали для лечения дефицита аденозиндезаминазы.

#### 4.7.1.4. Первичные иммунодефициты, связанные с поражением врожденного иммунитета (табл. 4.18)

##### *Хроническая гранулематозная болезнь*

Наследственное заболевание, обусловленное дефектом генов NADPH-оксидазы (Phox). Описаны мутации генов, кодирующих 4 субъединицы NADPH-оксидазы — *gp91*, *p22*, *p47*, *p67*. Две трети описанных мутаций затрагивают сцепленный с X-хромосомой ген *CYBB*, кодирующий основной компонент Phox — *gp91* (флавицитохром b558). Мутации в этот ген ведут к развитию X-сцепленной хронической гранулематозной болезни. Остальные варианты хронической гранулематозной болезни — аутосомно-рецессивные.

Основное проявление заболевания — нарушение (полное или частичное) образования активных форм кислорода и, вследствие этого, ослабление бактерицидной активности фагоцитов, приводящее к сохранению жизнеспособности фагоцитированных патогенов. Клинически синдром проявляется на первом году жизни тяжелыми рецидивирующими бактериальными и грибковыми инфекционными заболеваниями. В первую очередь поражаются органы, контактирующие с внешней средой — легкие, органы пищеварения, кожа, а также дренирующие их лимфоузлы. Позже вследствие гематогенного распространения патогенов поражаются печень, мозг, кости, почки. Часто возбудителями при таких заболеваниях служат грамположительные бактерии: *Streptococcus aureus*, *Aspergillus*, *Escherichia coli*.

**Таблица 4.18.** Первичные иммунодефициты, затрагивающие систему врожденного иммунитета

Название	Локализация дефекта	Природа дефекта	Проявления
<b>Дефекты клеток врожденного иммунитета</b>			
Хроническая гранулематозная болезнь	<i>CYBB</i> (Xp21) и др. (6q, 1q, 7q)	Дефект <i>CYBB</i> (Phox-gp91). Дефекты генов, кодирующих Phox p22, p47 и p67. Нарушение образования NADPH-оксидазы	Тяжелые рецидивирующие инфекционные заболевания с формированием гранулем
Дефекты адгезии лейкоцитов (LAD)	LADI — <i>CD18</i> (22q); LADII — <i>SLEX</i> ; LADIII — <i>GCPR</i>	Дефект <i>CD18</i> . Дефект <i>CD15s</i> (sLe <sup>x</sup> ). Дефект рецептора <i>GCPR</i>	Нарушение миграции лейкоцитов. Рецидивирующие инфекционные заболевания
Синдром Чедиак–Хигаши	<i>CHS/Beige</i>	Мутации гена <i>CHS/Beige</i> . Нарушение транспорта секреторных гранул	Рецидивирующие бактериальные инфекционные заболевания
Дефицит миелопероксидазы	<i>MPO</i> (17q)	Дефицит миелопероксидазы. Нарушен киллинг бактерий	Рецидивирующие бактериальные инфекционные заболевания
Дефицит глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы	<i>G6PD</i> (X)	Дефицит глюкоза-6-фосфат дегидрогеназы. Нарушен киллинг бактерий	Рецидивирующие инфекционные заболевания. Анемия
Дефицит киназы <i>IKK<math>\gamma</math></i>	<i>IKKG</i>	Дефект <i>IKK<math>\gamma</math></i> . Нарушение образования фактора NF- $\kappa$ B и формирования воспалительного ответа	Рецидивирующие бактериальные инфекционные заболевания
Дефицит фактора <i>IRAK</i>	<i>IRAK1</i> (X)	Дефект сигнального фактора <i>IRAK</i> , нарушение образования NF- $\kappa$ B	Рецидивирующие бактериальные инфекционные заболевания
<b>Дефекты системы комплемента</b>			
Дефицит <i>C1q</i> Дефицит <i>C1r</i> Дефицит <i>C4</i> Дефицит <i>C2</i>	<i>C1q</i> (1) <i>C1r</i> (12) <i>C4</i> (6) <i>C2</i> (6)	Нарушение активации комплемента по классическому пути	Волчаночный синдром
Дефицит <i>C3</i>	<i>C3</i> (19)	Нарушение всех путей активации комплемента	Пиогенные инфекции, иммунокомплексная патология

Окончание табл. 4.18

Название	Локализация дефекта	Природа дефекта	Проявления
Дефицит C5. Дефицит C6. Дефицит C7. Дефицит C8 $\alpha$ , $\beta$	C5 (9). C6 (5). C7 (5). C8 (1)	Нарушение сборки мембраноатакующего комплекса	Волчаночный синдром. Нейссерияльная инфекция
Дефицит фактора D. Дефицит пропердина	FB (6p). FD (X)	Нарушение альтернативного пути комплемента	Нейссерияльная инфекция
Дефицит фактора I. Дефицит фактора H	FI (4) FH (1)	Нарушение расщепления C3 и контроля комплемента	Рецидивирующие пиогенные инфекционные заболевания
Дефект C1inh	C1inh (11)	Нарушение ингибитора C1s. Накопление калликреина	Врожденный ангионевротический отек

\* В скобках — хромосома, в которой локализован деректный ген.

В основе иммунодиагностики хронической гранулематозной болезни лежит идентификация продуктов кислородного взрыва. Для этого используют NBT-тест (оценка восстановления красителя нитросинего тетразолия), хемилюминесцентное определение активных форм кислорода и цитометрическое определение внутриклеточной перекиси водорода (по индукции образования флуоресцирующего метаболита дихлорфлуоресцеиндиацетата).

#### **Синдромы, связанные с дефектами адгезии лейкоцитов**

*Leukocyte adhesion deficiency* (LAD) — редкие аутосомно-рецессивные синдромы. Известно 3 их разновидности:

- LAD-I-синдром вызван генетически обусловленным дефектом экспрессии CD18 ( $\beta_2$ -цепи интегринов);
- LAD-II-синдром — результат нарушения экспрессии CD15s (рецептора L-селектина — сialiрированной молекулы Льюис<sup>x</sup> — sLe<sup>x</sup>);
- LAD-III-синдром — нарушение аттракции лейкоцитов и активации их интегринов, вследствие дефекта G-белка, связанного с хемокиновыми рецепторами.

При LAD-I-синдроме вследствие дефекта или отсутствия  $\beta_2$ -интегринов (молекула CD18 является для них общей  $\beta$ -цепью) нарушается транссудистая миграция лейкоцитов, обусловленная прочным прикреплением мигрирующих лейкоцитов к эндотелию сосудов при помощи молекул LFA-1 (CD11a/CD18) и ICAM-1 (см. раздел 2.3.1.2). При синдроме LAD-II нарушена предшествующая стадия того же процесса — перекатывание лейкоцитов вдоль сосудистой стенки, обусловленное взаимодействием L-селектина лейкоцита с его рецептором — молекулой sLe<sup>x</sup>, утрачиваемой вследствие мутации. При синдроме LADIII нарушен второй этап трансмиграции, прояв-

ляющийся «активацией» интегринов лейкоцитов под влиянием хемокинов, выделяемых эндотелиальными клетками. Во всех трех случаях основной результат генетических нарушений — дефект миграции лейкоцитов в очаг воспаления. Сильнее всего проявляется нарушение миграции нейтрофилов, участие которых в остром локальном воспалении критично для его успешного развития. Дефекты адгезии проявляются развитием хронических бактериальных и грибковых инфекционных заболеваний, не сопровождающихся образованием гноя. При синдроме LADII выявляют задержку умственного развития больных.

#### ***Синдром Чедиака—Хигаси (Chediak–Higashi)***

Редкое аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся тяжелым иммунологическим дефектом, рецидивирующими бактериальными инфекциями, а также частичным альбинизмом глаз и кожи. Характерный диагностический признак — наличие гигантских гранул в нейтрофилах, CD8<sup>+</sup> Т- и NK-клетках, меланоцитах и тромбоцитах. Гигантские гранулы являются видоизмененными лизосомами, цитолитическими гранулами, меланосомами и плотными тельцами тромбоцитов.

Идентифицирован ген *CHS/Beige*, мутации которого ответственны за развитие данного синдрома, а мутации его гомологов — за развитие патологии у мышей *beige* и алеутских норок. Ген кодирует белок, обеспечивающий транспорт секреторных везикул. Мутации, приводящие к образованию гигантских гранул, вызывают формирование стоп-кодона и синтез укороченной формы белка. Основной эффект мутации состоит в нарушении внутриклеточного транспорта и экзоцитоза гранул. Отсутствие выделения меланина из гигантских гранул считают причиной альбинизма.

В иммунной системе сильнее всего страдают связанные с лизосомальными гранулами функции клеток — нейтрофилов (нарушается их фагоцитарная активность), NK-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов (ослаблена их способность к перфоринзависимому цитолизу). Таким образом, главный иммунологический дефект при синдроме Чедиака—Хигаси состоит в нарушении функций, связанных с транспортом лизосомальных гранул в клетках иммунной системы.

#### ***Дефекты миелопероксидазы и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы***

Следствие этих нарушений — снижение образования активных форм кислорода и внутриклеточного киллинга бактерий из-за нарушения функций названных ферментов.

Описано еще несколько очень редких синдромов, затрагивающих фагоциты и их функции: синдром Грисчелли (дефект секреторных лизосом, их дегрануляции и опосредуемого ими цитолитического действия), синдром Германски—Пудлак (дефект секреторных гранул и тромбоцитов), синдром Швахмана—Диаманд (нарушение хемотаксиса нейтрофилов), синдром Барта (нейтропения).

#### ***Дефекты в NF-κB-зависимого пути***

Киназа IKK $\gamma$  — ключевой фермент, фосфорилирующий ингибитор IκB, что подготавливает его к расщеплению (см. раздел 2.2.4). После этого освобожденный транскрипционный фактор NF-κB перемещается в ядро и

включает экспрессию провоспалительных генов. Мутация в гене киназы IKK $\gamma$  приводит к развитию X-сцепленной ангидротической эктодермальной дисплазии (EDA), характеризующейся отсутствием волос, зубов и потовых желез. Развивается также тяжелый иммунодефицит, характеризующийся тяжелыми повторяющимися инфекциями. К аналогичным последствиям приводят мутации в гене ингибитора I $\kappa$ B.

Серин/треониновая киназа IRAK (*IL-1 receptor-associated kinase*) передает сигнал от мембранных TLR через адаптор TRAF к транскрипционному фактору NF- $\kappa$ B (см. раздел 2.2.4). Единичные замены в гене IRAK ведут к развитию тяжелого иммунодефицита, характеризующегося частыми инфекционными процессами, вызванными грамположительными бактериями.

#### ***Наследственные дефициты компонентов комплемента***

Эта группа наследственных заболеваний охватывает дефекты практически всех компонентов классического и альтернативного путей активации комплемента — компонентов C1, C2, C4, C3, C5, C6, C7, C8 факторов В и D. В симптоматике патологии, затрагивающей ранние компоненты комплемента (C1, C2, C4), особенно C1q, преобладают проявления волчаночного синдрома разной степени выраженности. Это обусловлено нарушением элиминации иммунных комплексов, их отложением в сосудах и тканевых мембранах с развитием воспалительной патологии, включая васкулиты и нефриты. Дефекты более поздних компонентов комплемента (начиная с C5) проявляются в ослаблении резистентности к внеклеточным патогенам, особенно нейссериям. Дефект C9 не имеет клинических проявлений. Чувствительность к нейссериям возрастает также при дефектах компонентов альтернативного пути. Дефицит C3 соединяет в себе все перечисленные нарушения.

#### ***Дефицит ингибитора C1q-компонента комплемента (наследственный ангионевротический отек)***

Наследственное заболевание, обусловленное мутациями аутосомного гена *C1INH*. C1INH контролирует активацию комплемента, подавляя эстеразную активность факторов C1s (классический путь комплемента) или MASP1/2 (лектиновый путь). Кроме того, C1INH служит ингибитором коагуляционного фактора XII, калликреина, тканевого активатора плазминогена и плазмина. Наконец, C1INH ингибирует переход кининогена в брадикинин, являющийся главным медиатором повышенной сосудистой проницаемости. Все точки приложения действия C1INH имеют отношение к сдерживанию развития отека.

Ангионевротический отек — местный феномен, часто запускаемый травмой, при которой происходит активация фактора XII, прекалликреина, и кининогена. Накапливается калликреин, который способствует образованию плазмина и брадикинина. Последний служит главным медиатором отека. Он взаимодействует с рецептором B2-R, что вызывает повышение проницаемости сосуда. Таким образом, в развитии ангионевротического отека участвуют три системы: кининовая, фибринолитическая и система комплемента. Основная роль C1INH состоит в сдерживании активности калликреина.

Клинически заболевание проявляется развитием отека (особенно опасен отек гортани), возникающего непредсказуемо и спонтанно. Заболевание может не проявляться в течение нескольких лет после рождения и иногда

первой манифестацией служит реакция, клинически не отличимая от анафилактической, но не поддающаяся лечению глюкокортикоидами и блокаторами  $H_1$ -рецепторов гистамина.

#### 4.7.1.5. Первичные иммунодефициты, связанные с поражением адаптивного иммунитета (табл. 4.19)

##### *Тяжелая комбинированная иммунная недостаточность*

Тяжелая комбинированная иммунная недостаточность (ТКИН, *Severe combined immune deficiency — SCID*). Комбинированные иммунодефициты характеризуются отсутствием Т-клеток и сильными нарушениями адаптивного иммунитета. Для больных ТКИН характерна ранняя клиническая манифестация заболевания, практически в первые недели жизни ребенка. Характерные признаки — упорная диарея, нарушение всасывания в кишечнике, прогрессирующее поражение бронхо-легочного аппарата, гнойные инфекционные заболевания кожи и слизистых оболочек. Лимфоидная ткань недоразвита. Возбудителями инфекционных заболеваний чаще всего являются условно-патогенные бактерии, грибы, вирусы, простейшие. Заболевание может проявиться после вакцинации БЦЖ в виде локальной или генерализованной БЦЖ-инфекции. При оценке иммунного статуса выявляют лимфоцитопению, снижение содержания и функциональной активности Т-клеток, гипогаммаглобулинемию.

**Таблица 4.19.** Первичные иммунодефициты, затрагивающие систему адаптивного иммунитета

Название	Ген (хромосома)	Природа дефекта	Иммунологические проявления
<b>Тяжелая комбинированная иммунная недостаточность</b>			
Х-сцепленная тяжелая комбинированная иммунная недостаточность (дефицит $\gamma$ (с)-цепи)	$\gamma$ (с) (Xq)	Отсутствие $\gamma$ (с)-цепи, общей для рецепторов IL-7, IL-2 и ряда других цитокинов. Гибель развивающихся Т- и НК-клеток при переходе на стадию DN2	Формула: Т В <sup>+</sup> НК <sup>-</sup> . Отсутствие всех видов иммунной защиты, связанной с Т- и НК-клетками
Дефицит тирозинкиназы Jak3	JAK3	Jak3 передает сигнал от $\gamma$ (с). Последствия дефицита те же	То же
Дефицит $\alpha$ -цепи рецептора IL-7	IL7RA	Нарушение функционирования рецептора для IL-7, ответственного за раннее развитие Т- и НК-клеток	Формула: Т В <sup>+</sup> НК <sup>-</sup> . Проявления практически те же, что при Х-сцепленной тяжелой комбинированной иммунной недостаточности
Дисгенезия тимуса (синдром Незелоф)	Не установлены	Вследствие гистогенетических дефектов нарушено развитие Т-клеток в тимусе	Изменена структура популяции Т-клеток, уменьшено их число, снижена функция

Продолжение табл. 4.19

Название	Ген (хромосома)	Природа дефекта	Иммунологические проявления
Дефицит RAG-1/ RAG-2	<i>RAG1, RAG2</i>	Не происходит перестройки V-генов во всех типах рецепторов. Остановка развития В-клеток на стадии про-В, Т-клеток — на стадии DN2	Формула: $T^- B^- NK^+$ . Практически не функционирует адаптивный иммунитет
Синдром Оменна	Не установлены	Частичный дефект реаранжировки V-генов антигенраспознающих рецепторов. Частичное нарушение развития и функциональные дефекты лимфоцитов	Формула: $T^+ B^+ NK^-$ . В наибольшей степени страдает развитие Th1-клеток, синтез $IFN\gamma$ и IL-2
Дефицит ДНК-зависимой протеинкиназы	Не установлены	Нарушен процесс разрешения «шпилика» при перестройке V-генов. Нарушено формирование всех типов зрелых рецепторных генов	Формула: $T^- B^- NK^+$ . Отсутствует адаптивный иммунитет
Дефициты CD3 $\gamma$ и CD3 $\epsilon$	<i>CD3G, CD3E</i>	CD3 $\gamma$ и CD3 $\epsilon$ составляют часть комплекса CD3. При их отсутствии нарушается экспрессия рецепторного комплекса TCR—CD3 на мембране и передача активационного сигнала внутрь Т-клетки	Формула: $T^- B^+ NK^+$ . Снижено число и ослаблена функция Т-клеток
Дефицит молекул МНС-II	<i>CIITA, RFXNKRFX5, RFXAP</i>	В отсутствие молекул МНС-II не происходит дифференцировка и селекция CD4 $^+$ Т-клеток и презентация им антигена. Поскольку Т-хелперам принадлежит ключевая роль в адаптивном иммунитете, нарушается развитие практически всех его ветвей	Формула: $T (CD4^- CD8^+) B^+ NK^+$ . Нарушены большинство проявлений адаптивного иммунитета
Дефицит CD4	<i>CD4</i>	Дефект корцептора CD4 нарушает функции Т-хелперов с теми же последствиями, как при дефиците МНС-II	Формула: $T (CD4^- CD8^+) B^+ NK^+$ . То же

Продолжение табл. 4.19

Название	Ген (хромосома)	Природа дефекта	Иммунологические проявления
Дефицит TAP	<i>TAP1, TAP2</i> (6p)	TAP отвечает за транспорт пептидов из цитозоля в эндоплазматический ретикулум, где они встраиваются в молекулу МНС-I. В условиях дефицита TAP полноценные МНС-I не формируются и зависящие от них CD8 <sup>+</sup> Т-клетки не развиваются	Формула: Т (CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> ) В <sup>+</sup> NK <sup>+</sup> . Нарушен цитотоксический Т-клеточный ответ
Дефицит ZAP-70	<i>ZAP70</i>	Тирозинкиназа ZAP-70 участвует в передаче активационных сигналов. Она важна также для развития CD8 <sup>+</sup> Т-клеток, дефицит которых составляет основу данной патологии	Формула: Т (CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> ) В <sup>+</sup> NK <sup>+</sup> . То же
Дефицит CD25	<i>IL2RA</i>	CD25 — α-цепь IL-2R, экспрессируемая на ранних этапах развития Т-клеток, а также на активированных и регуляторных Т-клетках. Дефицит CD25 приводит к возникновению дефектов развития Т-клеток, особенно регуляторных, и нарушению активации зрелых Т-лимфоцитов	Формула; Т <sup>+</sup> В <sup>+</sup> NK <sup>+</sup> . Снижено содержание Т-клеток и их функция. Аутоиммунные процессы
Дефицит CD45	<i>CD45</i>	CD45 активирует киназу Lck, участвующую в запуске активационных сигналов в лимфоциты. При дефиците CD45 этот процесс нарушен	Формула: Т В <sup>+</sup> NK <sup>+</sup> . Снижена функциональная активность Т- и В-клеток
Дефицит аденозиндезаминазы (ADA)	<i>ADA</i> (20q)	Аденозиндезаминаза катализирует превращение аденозина и дезоксиаденозина в инозин и дезоксиинозин. Накопление аденозина и дезоксиаденозина приводит к гибели тимоцитов. Формируется дефицит Т-клеток	Формула : Т В <sup>+</sup> NK <sup>+</sup> . Нарушены все звенья адаптивного иммунитета, зависящие от Т-клеток

Продолжение табл. 4.19

Название	Ген (хромосома)	Природа дефекта	Иммунологические проявления
Дефицит пури- нуклеотидфосфо- риказы (PNP)	<i>PNP</i> (14q)	Пури-нуклеотид фосфорилаза катали- зирует превращение гуанозина в гуанин и инозина и дезокси- инозина в гипоксантин. Метаболиты, накапли- вающиеся при дефици- те PNP, токсичны для развивающихся тимо- цитов, но дефект час- тично компенсируется. Поэтому он выражен слабее, чем при дефици- те аденозиндезамина- зы	Формула: $T^+NK^+B^+$ . Последствия дефицита Т-лимфоцитов выра- жены слабее, чем при дефиците ADA
<b>Другие первичные иммунодефициты</b>			
Синдром Ди Джорджи	<i>TBX1</i> (22q)	Дефекты гена <i>TBX1</i> , кодирующего фактор T-box 1, ответственный за инвагинацию жаберных дуг при закладке тимуса. Формирующаяся дис- генезия тимуса при- водит к нарушению привлечения в орган клеток-предшест- венников. Развития Т-лимфоцитов не про- исходит	Формула: $T^-B^+NK^+$ . Нарушены все звенья адаптивного иммуни- тета
Х-сцепленная агаммаглобулине- мия Брутона	<i>Btk</i> (Xq)	Дефект тирозинкина- зы Btk, участвующей в передаче активацион- ного сигнала в В-клет- ках и их дифференци- ровке. Блок развития В-клеток на стадии про-ВII	Формула: $T^+B^-NK^+$ . Нарушен адаптивный гуморальный имму- нитет
Гипер-IgM- синдром	<i>TNFSF5</i> (Xq)	Нарушена экспрессия CD154 (при основ- ной форме) или его рецептора CD40, что приводит к нарушению взаимодействия между Т-клетками с одной стороны и макрофага- ми, дендритными и В-клетками — с другой	Нарушение переключе- ния С-генов иммуногло- булинов, аффинитет BCR не повышается, повреж- дена активность дендрит- ных клеток, Т-хелперов и макрофагов

Продолжение табл. 4.19

Название	Ген (хромосома)	Природа дефекта	Иммунологические проявления
Общая вариабельная иммунная недостаточность	<i>TNFSF20, BLIMP1, ICOS</i>	Гетерогенная группа иммунодефицитов. В их основе могут лежать дефекты В-клеточных факторов BAFF (фактор выживаемости В-клеток) или Blimp-1 (фактор дифференцировки плазмоцитов), а также костимулирующей молекулы ICOS. Нарушен гомеостаз популяции В-лимфоцитов и дифференцировка антителообразующих клеток	Нарушение преимущественно гуморального иммунного ответа
Селективный IgA дефицит	Не установлен	Нарушение переключения С-генов иммуноглобулинов на С $\alpha$ . Снижено содержание IgA, ответственного за защиту слизистых оболочек	Нарушение гуморальной защиты слизистых оболочек
Гипер-IgE-синдром	Не установлен	Природа повышения уровня IgE не установлена	Гнойное воспаление. Проявления аллергии
Синдром Вискотта—Олдрича	<i>WAS</i> (Xp)	Дефект белка WASP, важного для взаимодействия сигнальных молекул и белков цитоскелета. Нарушена подвижность клеток и формирование контактов	Функциональные повреждения, приводящие к нарушению фагоцитоза, презентации антигена, контактного цитолиза
Атаксия-телеангиэктазия	<i>ATM</i> (11q)	Дефект киназы ATM, ответственной за репарацию разрывов ДНК и запуск апоптоза клеток при невозможности такой репарации	Накопление клеток с нерепарированными разрывами ДНК. Среди разнообразных дефектов — нарушение развития лимфоцитов, особенно Т-клеток и обусловленная этим иммунная недостаточность
Синдром Ниймегена	<i>NBS1</i> (7)	Дефект гена <i>NBS1</i> , ответственного за репарацию разрывов ДНК, с последствиями как при дефекте гена ATM	То же

Окончание табл. 4.19

Название	Ген (хромосома)	Природа дефекта	Иммунологические проявления
Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром	<i>TNFSFR6</i> (10q)	Дефицит генов, кодирующих Fas-рецептор (чаще всего), Fas-лиганд или каспазы 8 и 10. В результате нарушается рецепторный апоптоз, в том числе развивающихся клеток иммунной системы	Аутоиммунные процессы, гиперпролиферация лимфоцитов, гипериммуноглобулинемия, накопление CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> Т-клеток
Х-сцепленный лимфопролиферативный синдром	<i>SH2D1A</i> (X)	Дефект гена <i>SH2D1A</i> , следствием которого является повышение вероятности инфицирования В-клеток вирусом Эпштейна–Барр, вызывающим нарушения функций этих клеток	Инфекционный мононуклеоз, лимфопролиферация, дисиммуноглобулинемия, нарушение гуморального иммунного ответа
IPEX-синдром	<i>FOXP3</i> (Xp)	Дефект гена <i>FOXP3</i> , ответственного за развитие регуляторных Т-клеток, предотвращающих аутоиммунные процессы и любые избыточные иммунные процессы	Развитие множественных аутоиммунных процессов (особенно повреждающих эндокринные органы), гиперпролиферация лимфоцитов кишечника
APCED-синдром	<i>AIRE</i>	Дефект гена <i>AIRE</i> , ответственного за экспрессию в тимусе различных органоспецифических антигенов. Усиление поступления на периферию аутоспецифических Т-клеток	Аутоиммунные эндокринопатии

Различают 16 вариантов ТКИН.

- **Х-сцепленная тяжелая комбинированная иммунная недостаточность [дефицит γ(с)-цепи].** Вызвана мутацией локализующегося в Х-хромосоме гена γ(с)-цепи, общей для рецепторов для IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21 (рис. 4.43). Самый частый вариант ТКИН — 46% от всех ее случаев. При этой форме иммунодефицита теоретически не должны проявлять свою активность все перечисленные цитокины (из-за дефекта их рецепторов). Однако в реальности важно отсутствие функций только одного цитокина — IL-7, в связи с тем, что он обеспечивает выживаемость

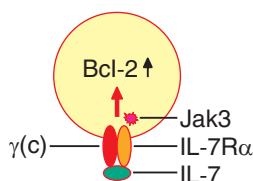
лимфоидных предшественников и развитие всех ростков лимфопоэза. У мышей, гомозиготных по мутации *scid*, отсутствуют Т-, В- и НК-клетки. У человека роль IL-7 в развитии В-лимфоцитов заменима, и больные с X-сцепленной формой ТКИН не имеют Т- и НК-клеток, тогда как В-лимфоциты у них развиваются практически нормально. Развитие Т-клеток блокируется на стадии перехода DN1 в DN2.

- **Дефицит тирозинкиназы Jak3.** Киназа Jak3 отвечает за передачу сигнала от  $\gamma(\text{с})$ -цепи (см. рис. 4.43). Именно поэтому фенотипические проявления ее дефицита практически совпадают с таковыми для X-сцепленной ТКИН с той же формулой развития лимфоцитарных ростков:  $\text{T B}^+ \text{NK}^-$ .
- **Дефицит CD45.** CD45 — крупная молекула, функционально связанная с рецепторным комплексом, цитоплазматическая часть которой обладает активностью тирозинфосфатазы. Она выполняет важную роль при активации Т-лимфоцитов, катализируя дефосфорилирование молекулы тирозинкиназы Lck (в покоящихся клетках эта молекула функционально неактивна и находится в гиперфосфорилированном состоянии). Дефосфорилирование приводит к изменению конформации этой молекулы и переходу ее в функционально активное состояние (см. раздел 3.4.2.1). Если учесть ключевую роль тирозинкиназы Lck в запуске внутриклеточной передачи сигнала в Т-клетках, значение фосфатазы CD45 в пусковых механизмах активации становится понятным. Молекула CD45 выполняет и другие функции, в частности, при активации Т-клеток памяти, о чем свидетельствует изменение структуры внеклеточной части молекулы при дифференцировке этих клеток (см. раздел 3.5.3.2).
- **Дисгенезия тимуса (синдром Незелоф).** Частичная или полная агенезия тимуса с гипоплазией, нарушением архитектуры лимфоидной ткани и отсутствием зародышевых центров. Комбинированный иммунодефицит с нормальным или повышенным уровнем одного или нескольких классов иммуноглобулинов при ослаблении индуцированного синтеза антител. На Т-клетках ослаблена экспрессия CD3 и CD4, но усилена экспрессия CD44.
- **Дефицит RAG-1/RAG-2.** Рекомбиназы 1 и 2 формируют комплекс, ответственный за запуск перестройки V-генов антигенраспознающих рецепторов (см. раздел 3.1.4.1). Мутации генов *RAG1* и *RAG2* полностью блокируют процесс перестройки V-генов. В связи с этим развитие Т- и В-лимфоцитов останавливается на стадиях, предшествующих этому событию: для Т-клеток это стадия DN2, для В-клеток — про-В. Развитие НК-клеток не нарушено.
- **Дефицит ДНК-зависимой протеинкиназы (радиочувствительная ТКИН).** ДНК-зависимая протеинкиназа составляет часть рекомбинационно-го комплекса — комплекса факторов, необходимых для перестройки V-генов. Эти факторы экспрессируются перед началом реаранжировки. ДНК-зависимая протеинкиназа участвует в ликвидации (разрешении) «шпилек», формирующихся после двунитевых разрывов, когда разорванные нити замыкаются на самих себя (см. раздел 3.1.4.1). Разрешение «шпилек» состоит в разрывах этих связей, после чего устанавливаются окончательные связи между разорванными участками гомологичных

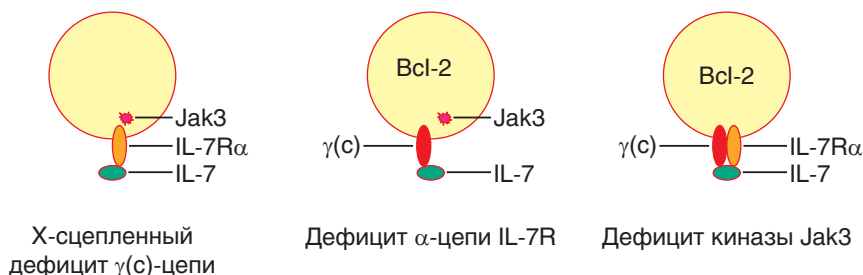
нитей ДНК. Формирование двунитевых разрывов происходит как в процессе реаранжировки V-генов, так и при действии повреждающих факторов, например, ионизирующей радиации. Именно поэтому мутации гена ДНК-зависимой протеинкиназы не только нарушают процесс реаранжировки V-генов, но и препятствуют ликвидации последствий действия радиации и других факторов, повреждающих ДНК. Блокада развития Т- и В-клеток происходит на тех же этапах, как при дефиците RAG-1/RAG-2.

- **Дефицит  $\alpha$ -цепи рецептора IL-7.** Механизм формирования иммунодефицита в принципе таков же, как при дефекте  $\gamma(c)$ -цепи, хотя он касается только проявления действия IL-7 (см. рис. 4.43). В отсутствие сигналов, опосредованных этим цитокином, не происходит развития Т- и НК-клеток (у мышей — также В-клеток) в связи с апоптотической гибелью клеток-предшественников и отсутствием стимулов к пролиферации.
- **Дефицит молекул МНС-II.** Развивается в результате мутации генов трансаактиватора генов класса II (CIITA — *MHC class II transactivator*, контролирует активность генов МНС класса II), а также генов регуляторных факторов семейства RFX — *RFXNK*, *RFX5*, *RFXAP*. Отсутствие экспрессии молекул МНС-II служит препятствием для дифференцировки и селекции субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-клеток.

Нормальная структура рецептора IL-7  
и адекватный ответ на этот цитокин



Варианты ТКИН с дефектами генов рецептора IL-7  
и связанной с ним киназы



**Рис. 4.43.** Схема дефектов рецептора IL-7 и связанной с ним киназы при различных вариантах тяжелого комбинированного иммунодефицита. Выпадение любого из компонентов рецептора IL-7 или связанных с ним сигнальных факторов имеет идентичные последствия: вследствие отсутствия передачи сигнала экспрессии антиапоптотического фактора Bcl-2 не происходит, и клетки подвергаются апоптозу

- **Дефицит TAP.** Молекулы TAP обеспечивают транспорт пептидов, формирующихся в протеасомах, в эндоплазматический ретикулум, где они включаются в состав молекул МНС-I. Поскольку в отсутствие пептида молекулы МНС-I нестабильны, нарушается их экспрессия на поверхности клеток. Это служит причиной нарушения дифференцировки и селекции субпопуляции  $CD8^+$  Т-лимфоцитов.
- **Дефицит CD25.** Молекула CD25 —  $\alpha$ -цепь рецептора IL-2, придающая ему высокое сродство к антигенам. В норме она экспрессируется на активированных Т-лимфоцитах (менее закономерно — на В-клетках), а также на неактивированных естественных регуляторных Т-клетках. Отсутствие этой молекулы затрудняет реализацию IL-2-зависимых процессов — экспансию клонов активированных Т-лимфоцитов и развитие естественных регуляторных Т-клеток. Численность лимфоцитов всех типов не изменена.
- **Дефицит CD3 $\gamma$ .** Единственная форма генетических дефектов, затрагивающих комплекс CD3. Отсутствие  $\gamma$ -цепи нарушает экспрессию комплекса TCR—CD3, для которой требуется полноценный субъединичный состав. Поскольку  $\gamma$ -цепь, наряду с другими полипептидными цепями CD3, участвует в формировании активационного сигнала непосредственно после связывания антигенного лиганда с рецептором TCR, ее дефицит проявляется в ослаблении реактивности Т-клеток в ответ на антигенную стимуляцию.
- **Дефицит ZAP-70.** Тирозинкиназа ZAP-70 (семейство Syk) — один из ключевых факторов передачи активационных сигналов в Т-клетках (см. раздел 3.4.2.1). Она завершает первый этап передачи сигнала, являющийся общим для всех ветвей сигнальных путей, формирующихся дистальнее. Поэтому дефект гена ZAP-70 нарушает все проявления ответа Т-клеток. Кроме того, ZAP-70 участвует в передаче сигналов, необходимых для развития  $CD8^+$  Т-лимфоцитов, что обуславливает преимущественный дефицит этих лимфоцитов. Клеточная формула иммунодефицита:  $T(CD4^+ CD8^-) B^+ NK^+$ .
- **Дефицит CD4.** Мутации гена корцептора CD4 препятствуют развитию субпопуляции Т-хелперов, распознающая функция которых зависит от CD4.
- **Синдром Оменна (Omenn syndrome).** Неполная блокада RAG вследствие мутаций генов *RAG1* и *RAG2*, когда функция этих генов частично сохранена и происходит VDJ-рекомбинация, необходимая для создания антигенспецифического репертуара.
- **Дефицит аденозиндезаминазы (ADA).** Дефицит обусловлен мутацией гена ADA. Аденозиндезаминаза катализирует превращение аденозина и дезоксиаденозина соответственно в инозин и дезоксиинозин. В отсутствие аденозиндезаминазы накапливаются токсические метаболиты, из которых наиболее токсичен дезоксиаденозин. Накопление этих метаболитов вызывает повреждение Т- и В-лимфоцитов. Особенно чувствительны к аденозину и его метаболитам развивающиеся тимоциты, которые погибают под действием этих метаболитов. Дефицит аденозиндезаминазы был первым генетическим дефектом, устраненным путем генотерапии — переноса аутологических клеток костного мозга, в которые был инкорпорирован ген *ADA*.

- **Дефицит пурииннуклеотидфосфорилазы (PNP).** Дефицит обусловлен мутацией гена *PNP*. Фермент пурииннуклеотидфосфорилаза катализирует превращение гуанозина в гуанин, а также инозина и дезоксиинозина в гипоксантин, что предотвращает накопление токсических продуктов метаболизма гуаниновых нуклеотидов — дезоксигуанозина и гуанозина, токсичных только для Т-лимфоцитов. Дефект пурииннуклеотидфосфорилазы частично компенсируется, в связи с чем он проявляется менее тяжело, чем дефицит аденозиндезаминазы.

Описанная группа ТКИН представляет наиболее тяжелые варианты первичных иммунодефицитов. В большинстве случаев больные дети погибают в течение первого года жизни от инфекций. Хотя не во всех случаях поражаются все линии лимфопоэза (неизменно поражение Т-ростка или субпопуляций Т-лимфоцитов) на уровне функционирования иммунной системы, иммунодефицит всегда является комбинированным в связи с зависимостью всех форм иммунного ответа от Т-лимфоцитов.

#### 4.7.1.6. Другие иммунодефициты с поражением лимфоцитов

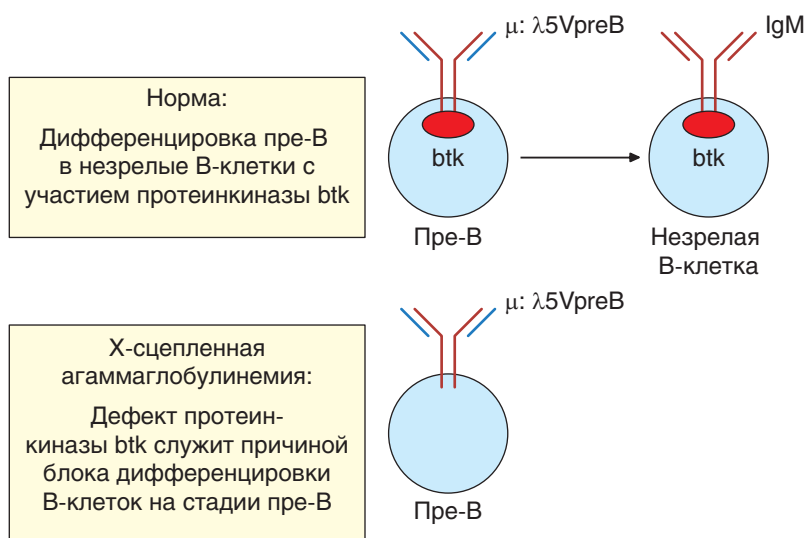
##### *Синдром Ди Джорджи*

Фактически синдром Ди Джорджи тоже является ТКИН, хотя формально в эту группу его не включают. Заболевание обусловлено утратой гена *Tbx1* в результате делеций в хромосоме 22q11, варьирующих по протяженности. Ген *Tbx1*, кодирует транскрипционный фактор T-box1, главная функция которого — запуск процесса инвагинации жаберных дуг при закладке тимуса. Но при мутации *Tbx1* не происходит правильной закладки не только тимуса, но и нервной трубки, крупных сосудов, сердца. Синдром проявляется гипоплазией тимуса, в основе которой лежит дефект развития тимического эпителия, обусловленный нарушением экспрессии фактора T-box1 в производных 3-го глоточного кармана.

##### *Х-сцепленная агаммаглобулинемия Брутона*

Гуморальный иммунодефицит, обусловленный мутацией гена *BTK*, локализованного в X-хромосоме и кодирующего тирозинкиназу btk (*Bruton's tyrosine kinase*) (рис. 4.44). Эта киназа принадлежит к семейству Src и связана с Igα/β-корцепторами комплекса BCR. Btk играет важную роль в проведении активационного сигнала не только от зрелого BCR, но и от проторецептора пре-BCR (см. раздел 3.3.1.2). В развитии X-сцепленной агаммаглобулинемии имеет значение нарушение передачи сигнала от пре-BCR, определяющее блок развития В-лимфоцитов на стадии про-В-II. В результате В-лимфоциты практически отсутствуют или содержатся в лимфоидных органах в очень малых количествах, концентрация сывороточных иммуноглобулинов снижена (IgG <2 мг/мл, IgA <0,2 мг/мл), иммунная защита, обусловленная гуморальным иммунитетом, дефектна. Страдает преимущественно защита от внеклеточных патогенов.

Клинически X-сцепленная агаммаглобулинемия начинает проявляться с 5–6 мес жизни ребенка, когда практически исчезают материнские иммуноглобулины. У большинства пациентов развиваются хронические рецидивирующие инфекционные процессы, наиболее часто вызываемые *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*. Эти бактерии вызывают пневмонии,

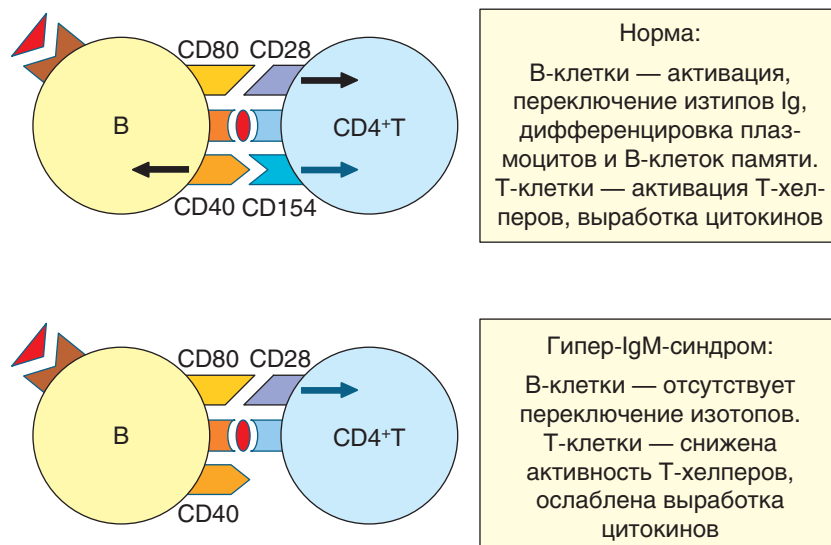


**Рис. 4.44.** Молекулярный механизм Х-сцепленной агаммаглобулинемии Брутона. Дефицит протеинкиназы btk, вызванный мутацией, блокирует созревание пре-В-клеток в зрелые В-лимфоциты

отиты, синуситы, конъюнктивиты. Для больных с Х-сцепленной агаммаглобулинемией характерна повышенная чувствительность к микоплазмам и уреоплазмам, вызывающим хронические пневмонии, артриты, цистит, инфекционное поражение подкожной клетчатки. У больных часто развиваются Th1-зависимые аутоиммунные процессы — ревматоидный артрит, склеродермоподобный синдром, неспецифический язвенный колит и др. Нередко выявляют деформацию грудной клетки, вызванную хроническим бронхо-легочным процессом.

#### ***Гипер-IgM-синдром (Hyper IgM-syndrome — HIGM)***

Гетерогенный первичный иммунодефицит, в основе которого лежат мутации, сцепленные и не сцепленные с полом. К Х-сцепленным вариантам относят гипер-IgM-синдром 1 (HIGM1), в основе которого лежит дефект рецептора Т-клеток CD40L (CD154) (рис. 4.45), и ангидротическая эктодермальная дисплазия, возникающая в результате мутации в сигнальной молекуле ИККγ. Описано 3 варианта аутосомно-рецессивных форм гипер-IgM-синдрома: HIGM2, HIGM3 и HIGM4. Гипер-IgM-синдром 2 (HIGM2) связан с мутацией в гене, кодирующем активационно-индуцируемую цитидиндезаминазу (AID), участвующую в переключении изотипов Н-цепей и ответственную за гипермутационный процесс, который обеспечивает повышение аффинитета антител. У больных с мутацией AID повышен уровень IgM и снижен уровень IgG при нормальной экспрессии CD40L. Гипер-IgM-синдром 3 (HIGM3) связан с мутацией в гене, кодирующем молекулу CD40. Эта мутация приводит к тем же последствиям, что и мутация CD40L. Сходная симптоматика обнаружена при мутациях гена *UNG*, кодирующего фермент урацил-Н-гликозилазу, участвующего в переключении классов иммуноглобулинов в В-клетках.



**Рис. 4.45.** Молекулярная основа гипер-IgM-синдрома. Клинические проявления гипер-IgM-синдрома развиваются при дефекте не только CD40L (CD154), но и CD40, а также некоторых связанных с ними сигнальных факторов

Патогенетическая основа всех перечисленных форм гипер-IgM-синдрома — нарушение процесса переключения классов иммуноглобулинов, кодируемых С-генами Н-цепей. Чаще всего основа дефекта — отсутствие или неполноценность взаимодействия молекулы CD40 (костимулирующая молекула В-лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток) с ее лигандом — CD154 (активационная молекула Т-лимфоцитов; см. раздел 3.4.2.2). Именно дефект лиганда служит наиболее частой причиной дефекта переключения классов иммуноглобулинов (гипер-IgM-синдром I). Однако роль указанного взаимодействия не ограничивается переключением изотипов. Сигналы, порождаемые взаимодействием, обеспечивают активацию всех АПК, на которых экспрессируется CD40. Это взаимодействие необходимо для индукции пролиферации В-клеток и экспрессии костимулирующей молекулы CD80 на их поверхности. Через молекулу CD40 передаются активирующие сигналы в макрофаг и дендритную клетку, что повышает их антигенпрезентирующую и другие формы активности. Обусловленное этим ослабление активности АПК сказывается на эффективности презентации антигена и определяет ослабление функции Т-лимфоцитов, прежде всего Th1-клеток.

Наиболее очевидный признак гипер-IgM-синдрома — нарушение баланса классов иммуноглобулинов — снижение концентрации IgG и IgA при повышенном или нормальном содержании IgM. В подавляющем большинстве случаев патология развивается у мальчиков (в соответствии с преобладанием Х-сцепленного варианта гипер-IgM-синдрома I). Основу клинической картины составляют тяжелые рецидивирующие инфекционные заболевания на 1-м году жизни. Чаще всего выявляют заболевания,

вызываемые внутриклеточными патогенами: пневмоцистную пневмонию; диарею, вызываемую *Cryptosporidium*; склерозирующий холангит; парвовирус-индуцированную апластическую анемию.

#### **Общая переменная иммунная недостаточность**

Это группа заболеваний с различным патогенезом, выясненным не для всех вариантов. В большинстве случаев мутации затрагивают гены, которые кодируют белки, вовлеченные в В-лимфопоэз и гомеостаз В-клеток. Чаще других выявляют мутации двух белков этой группы — рецептора гомеостатического фактора В-клеток BAFF (фактор выживания В-клеток; относится к семейству TNF) и Blimp1 — белка, индуцирующего дифференцировку плазматических клеток (см. раздел 3.6.2.3). При заболеваниях этой группы преобладают дефекты гуморального иммунитета со снижением концентрации иммуноглобулинов. Однако выявляют нарушения и в Т-клеточном звене — снижение содержания NK- и CD4<sup>+</sup> Т-клеток с усилением экспрессии маркеров клеток памяти — CD45R0 и CD29. Нарушение экспрессии и функционирования ряда мембранных молекул Т-клеток приводит к ослаблению их костимуляции при презентации антигена и, вследствие этого, нарушению секреции IL-2 и пролиферативной экспансии клонов Т-лимфоцитов. Показана ориентация антигензависимой дифференцировки Т-клеток больных в направлении Th1-клеток (одна из причин — усиление выработки IL-12), что обуславливает ослабление гуморального иммунного ответа.

Общий переменный иммунодефицит часто диагностируют клинически в возрасте 20–40 лет. Наиболее частые проявления синдрома — повторные пневмонии, синуситы, артрит, тромбоцитопеническая пурпура, аутоиммунная гемолитическая анемия, колит. Инфекционные поражения чаще затрагивают респираторный и желудочно-кишечный тракты и вызываются разнообразными бактериями, вирусами, а также грибами и паразитами. У больных повышена частота развития злокачественных опухолей.

#### **Селективный IgA-дефицит**

Самый распространенный из первичных иммунодефицитов (частота 1 на 500–1000). Его основа — сниженная концентрация сывороточного и секреторного IgA. Клинически проявляется только в 50% случаев — в виде рекуррентных инфекций. Иногда сочетается с дефицитом IgG2; в этом случае выявляют более тяжелое течение заболевания. Молекулярный механизм заболевания неизвестен. В развитие заболевания вовлечен функциональный дефицит TGFβ1, принимающий участие в переключении генов иммуноглобулинов на IgA и, возможно, IgG2.

#### **Гипер-IgE-синдром (синдром Иова)**

Характеризуется высоким уровнем сывороточного IgE (>2000 МЕ/мл) и эозинофилией. Для него свойственны повторные абсцессы кожи и подкожной клетчатки при отсутствии местной гиперемии, гипертермии, болевого синдрома. Характерно развитие пневмоний с формированием пневмоцеле. Молекулярно-генетическая природа не установлена.

#### **Синдром Вискотта–Олдрича**

Х-сцепленный иммунодефицит, обусловленный мутацией гена *WASP*, локализованного в X-хромосоме. Это ген кодирует белок WASP (*Wiscott-Aldrich*

*syndrome protein*), играющий важную роль в функционировании цитоскелета. Он регулирует полимеризацию актина. Нормальная функция этого белка необходима для полноценной подвижности клеток, их поляризации, формирования филоподий при хемотаксисе, адгезии клеток и образования иммунного синапса при взаимодействии клеток иммунной системы.

В зависимости от локализации мутаций и протяженности затронутого ими участка гена развивается три клинических варианта заболевания: полномасштабный синдром Вискотта–Олдрича (следствие делеций) и варианты с изолированным проявлением тромбоцитопении или нейтропении. Классическая картина синдрома Вискотта–Олдрича характеризуется тромбоцитопенией с образованием тромбоцитов малого размера, экземой и рекуррентными инфекциями.

Для синдрома Вискотта–Олдрича характерны множественные нарушения в иммунной системе, затрагивающие преимущественно фагоцитарную и цитолитическую активность клеток врожденного иммунитета, т.е. функции, наиболее зависящие от движения клеток и активного участия цитоскелета. Нарушение образования иммунного синапса между Т-лимфоцитами и АПК влияет на все проявления адаптивного иммунитета.

#### ***Атаксия-телеангиоэктазия (синдром Луи–Бар)***

Наследственное заболевание, обусловленное дефектом гена *ATM* (*Ataxia telangiectasia mutated*). Относится к заболеваниям, в основе которых лежит синдром хромосомных поломок. Заболевание развивается вследствие мутаций, возникающих в любых участках гена *ATM*. Результатом мутаций может быть полное отсутствие или ослабление синтеза белка ATM, а также синтез функционально неполноценного белка.

Белок ATM — серинтреониновая протеинкиназа. Его основная функция состоит в инициации сигналов репарации разрывов двуцепочечной ДНК, возникающих как в физиологических условиях (при мейозе, перестройке V-генов антигенраспознающих рецепторов и т.д.), так и индуцируемых действием внешних факторов (например, ионизирующей радиации). При разрывах ДНК ATM-киназа аутофосфорилируется и переходит из димерной в мономерную форму. ATM-киназа обеспечивает фосфорилирование белков комплекса MRN и связанных с ним факторов, непосредственно осуществляющих репарацию ДНК. В случае небольшого числа разрывов они успешно выполняют эту функцию. При невозможности успешной репарации развивается апоптоз, запускаемый с участием фактора p53. Отсутствие полноценной репарации ДНК обуславливает нестабильность генома, следствием чего является повышение радиочувствительности клеток, частоты развития злокачественных опухолей, особенно лимфом и лейкозов.

Наиболее характерный клинический признак атаксии-телеангиоэктазии — нарастающая атаксия, проявляющаяся изменением походки. Она обусловлена нейродегенерацией с атрофией мозжечка. Развитие нейродегенеративных процессов связано с тем, что при созревании нейронов головного мозга происходят процессы рекомбинации ДНК, сопровождающиеся ее двойными разрывами. Другой симптом, определивший название заболевания, — телеангиоэктазия — представляет устойчивую дилатацию глазных и лицевых кровеносных сосудов.

Нарушение репарации разрывов ДНК, происходящих при созревании Т- и В-лимфоцитов, лежит и в основе иммунодефицита, наблюдаемого при атаксии-телеангиоэктазии. Иммунодефицит проявляется в хронических рецидивирующих бактериальных и вирусных инфекционных заболеваниях бронхолегочного аппарата, что обычно служит причиной смерти больного.

#### **Синдром Ниймегена**

Ниймеген — город в Голландии, в котором впервые описан синдром. Это наследственное заболевание относят к синдромам хромосомных поломок, сопровождающихся формированием нестабильности генома. Развитие этого заболевания связано с мутацией в гене *NBS1*, продукт которого — нибрин — участвует в репарации ДНК в составе комплекса MRN, являясь субстратом для фосфорилирования протеинкиназой АТМ. В связи с этим и патогенез, и клинические проявления синдрома Ниймегена практически совпадают с таковыми при атаксии-телеангиоэктазии. В обоих случаях развиваются нейродегенеративные изменения, однако при синдроме Ниймегена преобладают явления микроцефалии, поскольку процессы рекомбинации ДНК происходят и при созревании нейронов головного мозга.

#### **Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром**

Заболевание характеризуется нарушением апоптоза и связанными с этим незлокачественной лимфопролиферацией, гипериммуноглобулинемией, аутоиммунными процессами, увеличением содержания  $CD3^+CD4^-CD8^-$  клеток в крови. Мутации, лежащие в основе синдрома, чаще всего локализованы в гене *TFRRSF6*, кодирующем Fas-рецептор (CD95). К клиническим проявлениям ведут только мутации, вызывающие изменения во внутриклеточном участке молекулы CD95. Реже мутации затрагивают гены Fas-лиганда и каспаз 8 и 10 (см. раздел 3.4.1.5). Мутации проявляются ослабленной экспрессией молекул, кодируемых соответствующим геном, и ослаблением или полным отсутствием передачи апоптотического сигнала.

#### **Х-сцепленный лимфопролиферативный синдром**

Редкий иммунодефицит, характеризуемый извращенным антивирусным, антиопухолевым и иммунным ответом. Возбудитель Х-сцепленного лимфопролиферативного синдрома — вирус Эпштейна–Барр. Вирус проникает в В-клетки через взаимодействие молекулы gp150 оболочки вируса с рецептором CD21 на клеточной мембране. У больных Х-сцепленным лимфопролиферативным синдромом происходит поликлональная активация В-клеток и беспрепятственная репликация вируса.

Инфицирование вирусом Эпштейна–Барр при Х-сцепленном лимфопролиферативном синдроме — результат мутации в гене *SH2D1A*, кодирующем адапторный белок SAP [*Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-associated protein*]. SH<sub>2</sub>-домен белка SAP распознает тирозиновый мотив в цитоплазматической части SLAM и ряда других молекул. Процессы, развивающиеся в клетках иммунной системы при активации, опосредованной через SLAM-рецептор, играют ведущую роль в противовирусном иммунитете. SLAM-рецептор экспрессируется на тимоцитах, Т-, В-дендритных клетках, на макрофагах. Экспрессия усиливается при активации клеток. Регуляторное действие белка SAP связано с подавлением активности тирозинфосфатаз в

отношении SLAM. В отсутствие SAP фосфатаза SH-2 свободно соединяется с рецептором SLAM, дефосфорилирует его и подавляет передачу сигнала. Не происходит активации главных эффекторов противовирусной защиты — Т- и NK-клеток, что приводит к бесконтрольному размножению вируса Эпштейна–Барр. Кроме того, SAP облегчает взаимодействие тирозинкиназы Fyn с рецептором SLAM, что способствует передаче активационного сигнала.

В разнообразных клинических проявлениях Х-сцепленного лимфопролиферативного синдрома наиболее постоянны молниеносный инфекционный мононуклеоз, доброкачественные и злокачественные лимфопролиферативные нарушения, а также дисгаммаглобулинемия или гипогаммаглобулинемия. Среди локальных поражений превалирует поражение печени, вызываемое инфильтрацией В-клетками, инфицированными вирусом Эпштейна–Барр, и активированными Т-клетками, которая приводит к некрозу ткани печени. Печеночная недостаточность — одна из главных причин смертности больных Х-сцепленным лимфопролиферативным синдромом.

#### ***IPЕХ-синдром***

Сцепленный с Х-хромосомой синдром дисрегуляции иммунитета, полиэндокринопатии и энтеропатии (*Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy X-linked syndrome*) развивается как следствие мутаций гена **FOXP3**, локализованного в Х-хромосоме. **FOXP3** является «мастер-геном», ответственным за развитие регуляторных Т-клеток фенотипа CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Эти клетки играют центральную роль в сдерживании активности аутоспецифических клонов Т-лимфоцитов на периферии. Дефект гена **FOXP3** сопряжен с отсутствием или дефицитом этих клеток и растормаживанием разнообразных аутоиммунных, а также аллергических процессов.

IPЕХ-синдром проявляется в развитии множественного аутоиммунного поражения эндокринных органов, пищеварительного тракта и половой системы. Это заболевание начинается в раннем возрасте и характеризуется поражением ряда эндокринных органов (сахарный диабет типа I, тиреоидит) с высоким уровнем аутоантител, тяжелой энтеропатией, кахексией, низкорослостью, аллергическими проявлениями (экзема, пищевая аллергия, эозинофилия, увеличение уровня IgE), а также гематологическими изменениями (гемолитическая анемия, тромбоцитопения). Больные дети (мальчики) погибают в течение первого года жизни от повторных тяжелых инфекционных заболеваний.

#### ***APЕCED-синдром***

Аутоиммунная полиэндокринопатия, кандидоз, эктодермальная дистрофия (*Autoimmune polyendocrinopathy, candidiasis, ectodermal dystrophy*) — аутоиммунный синдром, обусловленный дефектом отрицательной селекции тимоцитов. Его причина — мутации гена **AIRE**, ответственного за эктопическую экспрессию органоспецифических белков в эпителиальных и дендритных клетках мозговой зоны тимуса, ответственных за отрицательную селекцию (см. раздел 3.2.3.4). Аутоиммунный процесс поражает преимущественно парашитовидные железы и надпочечники, а также островки поджелудочной железы (развивается диабет типа I), щитовидную железу, половые органы.

Часто сопровождается развитием кандидоза. Выявляют также дефекты морфогенеза производных эктодермы.

При рассмотрении спектра первичных иммунодефицитов обращает на себя внимание отсутствие нозологических единиц, связанных с патологией НК-клеток. К настоящему времени описано немногим более десятка мутаций, затрагивающих функцию этих клеток у отдельных лиц, что позволяет сделать заключение о крайней редкости иммунодефицитов, избирательно затрагивающих НК-клетки.

#### 4.7.2. ВИЧ-инфекция и синдром приобретенного иммунодефицита

Кроме первичных иммунодефицитов, единственным заболеванием, для которого поражение иммунной системы является основой патогенеза и определяет симптоматику, является синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД; *Aquired immune deficiency syndrome* — AIDS). Только он может быть признан самостоятельным приобретенным иммунодефицитным заболеванием.

История обнаружения СПИДа восходит к 1981 г., когда в трудах Центра по контролю за заболеваниями (США, штат Атланта) было опубликовано сообщение групп врачей из Нью-Йорка и Лос-Анжелеса о необычном заболевании, зарегистрированном у мужчин-гомосексуалистов. Оно характеризовалось тяжелой формой пневмонии, вызванной условно-патогенным грибом *Pneumocystis carinii*. В последующих сообщениях были приведены данные о расширении группы больных и приведены данные о наличии у них иммунодефицита, связанного с резким снижением содержания в циркуляции CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, сопровождающегося развитием инфекционных процессов, которые могут быть вызваны, помимо пневмоцист, другими факультативными патогенами. У некоторых больных развивалась саркома Капоши, характеризовавшаяся несвойственным ей агрессивным течением. К моменту опубликования этих материалов 40% выявленных больных умерли. Позже выяснилось, что эпидемия заболевания уже захватила экваториальную Африку, где болезнь распространяется преимущественно гетеросексуальным половым путем. Международное медицинское сообщество не только признало существование новой нозологической формы — «синдром приобретенного иммунодефицита» (*Aquired Immunodeficiency Syndrome*), но и констатировало начало пандемии этого заболевания. Столь драматический дебют СПИДа привлек к нему всеобщее внимание, выходящее далеко за пределы профессиональной среды. В медицинской науке, особенно в иммунологии, проблема СПИДа существенно повлияла на распределение усилий и финансов в развитии научных исследований. Это был первый случай, когда заболевание, связанное с преимущественным поражением иммунной системы, оказалось столь значимым в научном и социальном отношениях.

К началу 2007 г. число ВИЧ-инфицированных составило 43 млн, из которых 25 млн погибли, ежегодный прирост этого числа составляет 5 млн, а ежегодная смертность — 3 млн. 60% инфицированных проживают в Африке южнее Сахары.

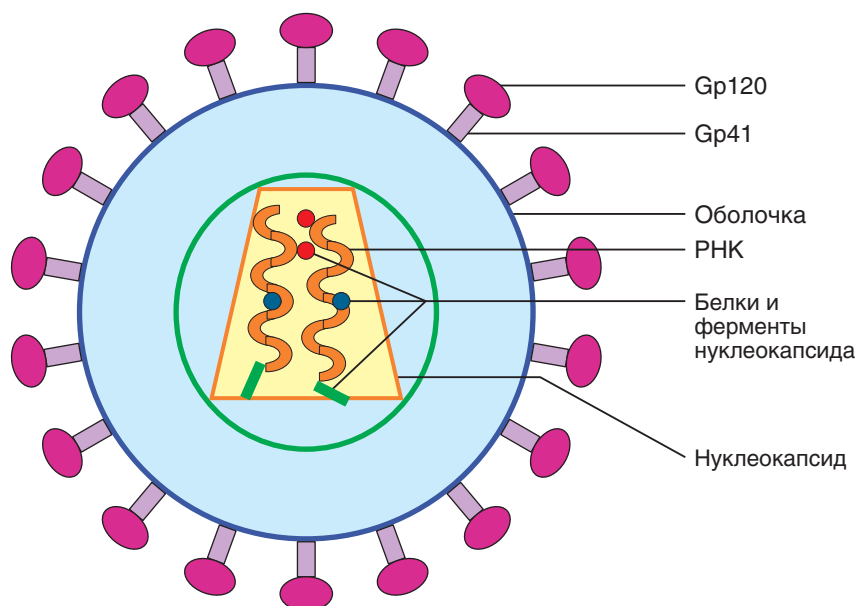
В 1983 г. почти одновременно во Франции [Л. Монтанье (*L. Montagnier*)] и Соединенных Штатах Америки [Р.С. Галло (*R.C. Gallo*)] была определена

вирусная природа СПИД и описан его возбудитель — ВИЧ (вирус иммунодефицита человека, *Human Immunodeficiency Virus* — HIV). Он относится к ретровирусам, т.е. вирусам, у которых носителем наследственной информации служит РНК, и она считывается с участием обратной транскриптазы. Этот вирус принадлежит к подсемейству лентивирусов — медленнодействующих вирусов, вызывающих заболевания с длительным инкубационным периодом. Род ВИЧ включает виды ВИЧ-1, являющийся возбудителем типичной формы СПИДа, и ВИЧ-2, отличающийся от ВИЧ-1 деталями строения и патогенного действия, но в общих чертах аналогичный ему. ВИЧ-2 вызывает более мягкий вариант заболевания, распространенный в основном в Африке. Сведения, приводимые ниже, касаются преимущественно ВИЧ-1 (за исключением особо оговоренных случаев). Выделяют 3 группы ВИЧ — М, О и N, разделяемые на 34 субтипа.

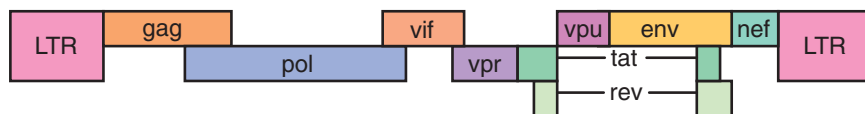
В настоящее время принята точка зрения, что ВИЧ-1 произошел от вируса шимпанзе в Западной Африке (вероятнее всего, в Камеруне — стране, эндемичной по ВИЧ) примерно в 30-е годы XX века. ВИЧ-2 произошел от обезьяньего вируса SIVsm. Варианты ВИЧ-1 неравномерно распределены в мире. В развитых странах Запада преобладает субтип В, в центральной Европе и России — субтипы А, В и их рекомбинанты. В Африке и Азии преобладают другие варианты, причем в Камеруне присутствуют все известные субтипы ВИЧ.

#### **Морфология, гены и белки вируса иммунодефицита человека**

Схема строения ВИЧ представлена на рис. 4.46. Вирус имеет диаметр около 100 нм. Он окружен оболочкой, из которой выступают грибовидные



**Рис. 4.46.** Схема строения вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1)



**Рис. 4.47.** Структура генома вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1). Указано расположение генов на двух молекулах РНК вируса

шпы, наружная часть которых образована оболочечным белком gp120, а прилегающие к мембране и трансмембранные части — белком gp41. Шпы представляют тримеры названных молекул. Эти белки участвуют во взаимодействии вируса и клетки хозяина, и иммунный ответ последнего направлен в основном против них. Глубже расположен слой матрикса, выполняющий роль каркаса. Срединную часть вируса образует конусообразный капсид, в котором содержится геномная РНК. Здесь же локализованы нуклеопротеиды и ферменты: обратная транскриптаза (p66/p51), интеграза (p31–32), протеаза (p10) и РНКазы (p15).

Генетическая структура ВИЧ и кодируемые его генами белки представлены на рис. 4.47. В двух молекулах односпиральной РНК общей протяженностью 9,2 кбаз локализуются 9 генов, кодирующих 15 белков ВИЧ. Последовательности, кодирующие структуры вируса, ограничены с 5'- и 3'-концов длинными концевыми повторами (LTR — *Long terminal repeats*), выполняющими регуляторные функции. Структурные и регуляторные гены частично перекрываются. Основных структурных генов 3 — *gag*, *pol* и *env*. Ген *gag* детерминирует образование группоспецифических антигенов сердцевинны — нуклеоида и матрикса. Ген *pol* кодирует ДНК-полимеразу (обратную транскриптазу) и другие белки нуклеотида. Ген *env* кодирует образование упоминавшихся выше белков оболочки. Во всех случаях первичный продукт генов подвергается процессингу, т.е. расщепляется на более мелкие белки. Регуляторные гены располагаются между генами *pol* и *env* (гены *vif*, *vpr*, *vpu*, *vpx*, *rev*, *tat*) и, кроме того, занимают 3'-концевую часть генома (фрагменты генов *tat* и *rev*, ген *nef*). Белки, кодируемые регуляторными генами, важны для формирования вириона и его взаимоотношений с клеткой. Из них наиболее важны белки *tat* — транскрипционный активатор и *nef* (27 кДа) — ее отрицательный регулятор. Дефектный белок *nef* выявляют у ВИЧ-инфицированных «долгожителей», у которых отсутствует прогрессия заболевания.

Наиболее важны для иммунологии ВИЧ-инфекции, диагностики и разработки подходов к иммунотерапии СПИДа белки оболочки gp120 и gp41. С геном *env* связана чрезвычайно высокая вариабельность ВИЧ. Ген содержит 5 константных (С) и пять вариабельных (V) участков; в последних последовательность аминокислот варьирует от одного изолята вируса к другому на 30–90%. Особенно значима для иммуногенности вариабельная петля V3. Частота мутаций в гене *env* составляет  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  событий на геном за цикл, т.е. на 2–3 порядка выше, чем обычная частота мутаций генов. Значительная часть молекулы занята углеводными остатками.

***Инфицирование клеток вирусом иммунодефицита человека***

Процесс инфицирования клеток человека ВИЧ и его последующей репликации включает несколько стадий. В ранней фазе жизненного цикла можно выделить следующие фазы:

- связывание ВИЧ с поверхностью клетки (рецепция);
- слияние мембран вируса и клетки и проникновение вируса внутрь клетки (фузия и «раздевание»);
- начало обратной транскрипции; формирование преинтеграционного комплекса;
- транспорт преинтеграционного комплекса в нуклеоплазму;
- интеграция провируса в геном клетки.

К этапам поздней фазы жизненного цикла ВИЧ относят:

- транскрипцию вирусной РНК на матрице интегрированной провирусной ДНК;
- экспорт вирусной РНК в цитозоль;
- трансляцию вирусной РНК, процессинг белков;
- сборку вирусной частицы на клеточной мембране;
- высвобождение вновь образованного вириона.

Основные входные ворота инфекции — слизистые оболочки мочевого и пищеварительного тракта. Проникновение вируса в организм существенно облегчается при наличии повреждений слизистой оболочки, однако инфицирование возможно и при их отсутствии. В этом случае вирус захватывается отростками дендритных клеток, проникающими в просвет органа. В любом случае дендритные клетки первыми взаимодействуют с ВИЧ. Они транспортируют вирус в регионарный лимфоузел, где он в процессе взаимодействия дендритных клеток с Т-лимфоцитами при презентации антигенов инфицирует CD4<sup>+</sup> Т-клетки.

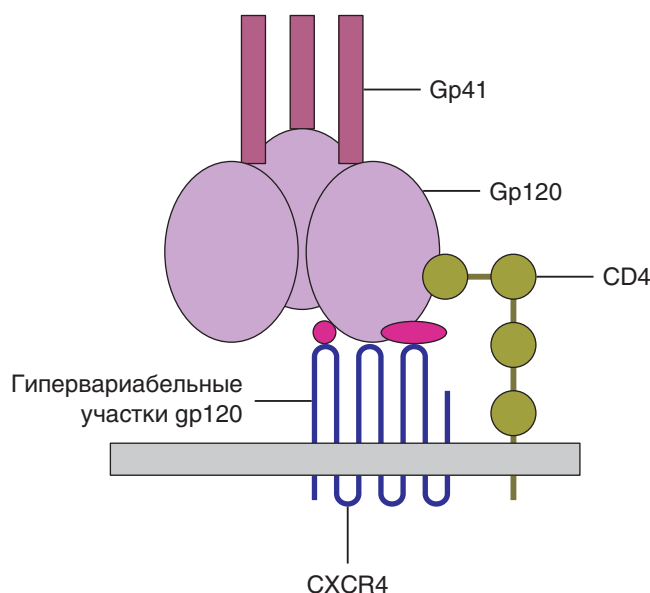
Рецепция ВИЧ обусловлена взаимным распознаванием тримера белка gp120 вируса и мембранного гликопротеина CD4 клетки хозяина. На обеих молекулах локализованы участки, ответственные за их взаимодействие. На молекуле gp120 указанный участок расположен в его С-концевой части (остатки 420–469), кроме того, есть еще 3 участка, важные для формирования сайта взаимодействия с CD4, и участок (254–274), ответственный за проникновение вируса в клетку после связывания с мембранным CD4. На молекуле CD4 участок связывания с gp120 расположен в N-концевом V-домене (D1) и включает последовательности остатков 31–57 и 81–94.

Поскольку рецептором для ВИЧ служит молекула CD4, спектр клеток-мишеней этого вируса определяется ее экспрессией (табл. 4.20). Естественно, что главными мишенями для него служат CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты, а также незрелые тимоциты, экспрессирующие оба корецептора (CD4 и CD8). Дендритные клетки и макрофаги, слабо экспрессирующие CD4 на мембране, так же эффективно заражаются вирусом и служат его активными продуцентами (репликация ВИЧ в дендритных клетках даже выше, чем в Т-лимфоцитах). Мишенями ВИЧ служат и другие клетки, содержащие на поверхности хотя бы небольшие количества CD4 — эозинофилы, мегакариоциты, эндотелиальные клетки, некоторые эпителиальные (эпителий тимуса, М-клетки кишечника) и нервные клетки (нейроны, клетки микроглии, астроциты, олигодендроциты), сперматозоиды, клетки хорионаллантоиса, поперечно-полосатых мышц.

**Таблица 4.20.** Состояние иммунологических показателей при синдроме приобретенного иммунодефицита

Показатель	Доклиническая стадия	Стадия клинических проявлений
Число лимфоцитов	В норме	Снижено
Содержание CD4 <sup>+</sup> Т-клеток	В норме или снижено	Меньше 200 клеток в 1 мкл крови
Содержание CD8 <sup>+</sup> Т-клеток	В норме или повышено	В норме или снижено (процент может быть повышен)
Соотношение CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	0,8–1,0	0,1–0,6
Соотношение Th1/Th2	В норме или снижено	Снижено
Активность цитотоксических Т-клеток	Повышена	Снижена
Ответ Т-клеток на митогены	В норме или снижен	Резко подавлен
Содержание В-клеток	В норме или снижено	Снижено
Антигенемия	Проявляется на 2–8-й неделе	Отсутствует
Антитела в циркуляции	Появляются обычно после 8 нед	Присутствуют
Растворимые факторы в циркуляции	Растворимые формы α-цепи IL-2R, CD8, TNFR, β <sub>2</sub> -микроглобулина, неоптерина	
Содержание и активность NK-клеток	В норме	Функция снижена
Лимфоидные ткани, ассоциированные со слизистыми оболочками	Раннее снижение содержания CD4 <sup>+</sup> Т-клеток памяти	Сильное подавление Т-клеток, особенно субпопуляции CD4 <sup>+</sup>
Врожденный иммунитет	В норме или подавлен	Подавлен

Дополнительные молекулы, необходимые для проникновения ВИЧ в клетки, его корецепторы — 2 хемокиновых рецептора: CXCR4 (рецептор для хемокина CXCL12) и CCR5 (рецептор для хемокинов CCL4 и CCL5). В меньшей степени роль корецептора присуща еще более, чем десятку хемокиновых рецепторов. CXCR4 служит корецептором для штаммов ВИЧ-1, культивируемых на Т-клеточных линиях, а CCR5 — для штаммов, культивируемых на линиях макрофагов (он присутствует на макрофагах, дендритных клетках, а также на CD4<sup>+</sup> Т-клетках). Оба эти рецептора относятся к родопсиноподобным, передающим в клетку сигнал через связанный с ними G-белок (см. раздел 4.1.1.2). Оба хеморецептора взаимодействуют с белком gp120; участок связывания с этими рецепторами открывается в молекуле gp120 после взаимодействия с CD4 (рис. 4.48). Различные изоляты ВИЧ отличаются по избирательности к тем или иным корецепторам. Вспомогательную роль в рецепции ВИЧ-2 играют молекулы адгезии, в частности LFA-1. При инфицировании дендритных клеток во взаимодействии с ВИЧ принимает участие лектиновый рецептор DC-SIGN.



**Рис. 4.48.** Схема взаимодействия вируса и клетки-мишени при ее инфицировании. Проиллюстрирован один из вариантов взаимодействия рецепторных молекул Т-клетки и молекул ВИЧ-1, обеспечивающего проникновение вируса в клетку

Корецепторам принадлежит важная роль в слиянии вирусной оболочки с мембраной клетки. Со стороны вируса главную роль в слиянии играет белок gp41. После фаз слияния (фузии) и «раздевания» вируса формируется ревертазный комплекс, обеспечивающий обратную транскрипцию с образованием двуспиральной провирусной ДНК.

С помощью вирусного фермента интегразы кДНК интегрируется в ДНК клетки, образуя провирус. Особенность интеграции генов ВИЧ в клеточный геном состоит в том, что для ее осуществления не требуется деление клетки. В результате интеграции формируется латентная инфекция, в которую обычно вовлекаются Т-клетки памяти, «дремлющие» макрофаги, служащие резервом инфекции.

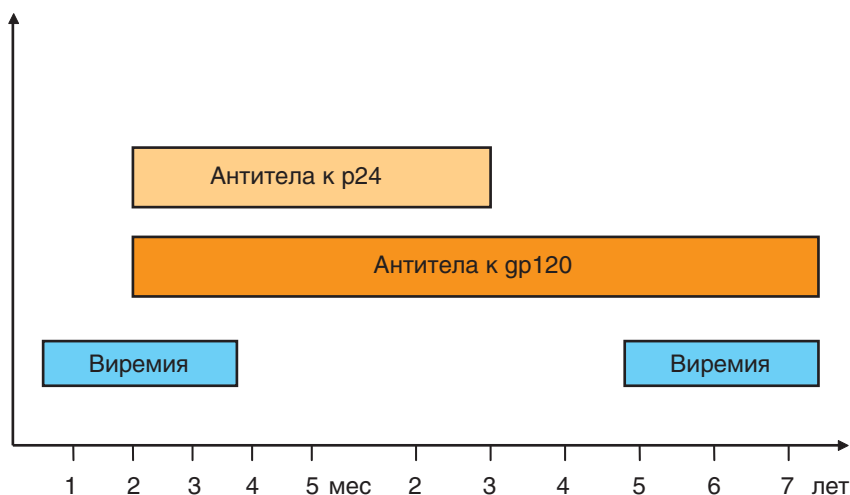
Репликация ВИЧ осуществляется преимущественно или исключительно в активированных клетках. При активации  $CD4^+$  Т-клетки происходит индукция транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, который связывается с промоторами как клеточной, так и вирусной ДНК. Клеточная РНК-полимераза транскрибирует вирусную РНК. Ранее других транскрибируются гены *tat* и *rev*, продукты которых участвуют в репликации вируса. *Tat* — белок, взаимодействующий с длинными терминальными последовательностями (LTR), что резко повышает скорость вирусной транскрипции. *Rev* — белок, способствующий выходу из ядра вирусных мРНК-транскриптов, как сплайсированных, так и не прошедших сплайсинг. Вирусная мРНК, вышедшая из ядра, служит матрицей для синтеза структурных и регуляторных белков. Структурные белки *gag*, *env*, *pol* формируют вирусную частицу, которая отпочковывается от клетки.

Стимуляция лимфоцитов митогенами усиливает репликацию ВИЧ и его цитопатогенный эффект. Этому могут способствовать эндогенные факторы, сопутствующие активации клеток, индуцируемые в активированных лимфоцитах и макрофагах (о NF-κB уже упоминалось). Таким факторами могут быть также цитокины, особенно TNFα и IL-6. Первый активирует транскрипцию генов ВИЧ, второй стимулирует экспрессию ВИЧ в клетках хозяина. Аналогичный эффект оказывают колониестимулирующие факторы GM-CSF и G-CSF. В качестве кофакторов активации ВИЧ могут выступать IL-1, IL-2, IL-3 и IFNγ. Глюкокортикоидные гормоны надпочечников способствуют реализации генетической программы ВИЧ. IL-4, IL-7 и IFNα оказывают противоположное действие.

### ***Иммунный ответ на антигены ВИЧ***

Острая вирусная инфекция характеризуется сравнительно быстрым образованием антигенспецифических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, синтезирующих IFNγ. Это приводит к быстрому падению содержания вируса в крови, но не его исчезновению. Клеточный ответ на ВИЧ-инфекцию складывается из образования антигенспецифических CD4<sup>+</sup> Т-хелперов и CD8<sup>+</sup> Т-киллеров. Цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-клетки выявляют на протяжении всего заболевания СПИДом за исключением поздних стадий, тогда как вирусспецифические CD4<sup>+</sup> Т-клетки выявляются только на ранних стадиях заболевания. CD8<sup>+</sup> Т-киллеры убивают зараженные клетки до выхода вируса из клетки, прерывая тем самым репликацию вируса. Есть четкая обратная зависимость между титром вируса в плазме крови и количеством специфических CD8<sup>+</sup> Т-киллеров. Повышение пролиферативной активности CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> антигенспецифических Т-клеток коррелирует с замедлением прогрессирования заболевания. Для больных, содержащих большое количество CD8<sup>+</sup> Т-киллеров, характерно медленное прогрессирование заболевания. CD4<sup>+</sup> Т-клетки также играют важную роль в элиминации вируса: имеется зависимость между пролиферативным ответом CD4<sup>+</sup> Т-клеток на антигены ВИЧ и уровнем вируса в плазме. Отмечено, что выраженность виремии более тесно обратно коррелирует с выработкой IL-2, чем IFNγ. При хронической вирусной инфекции в количественном отношении эффекторные Т-клетки сохраняются, но они изменяются функционально. Снижается способность CD4<sup>+</sup> Т-клеток синтезировать IL-2; ослабляется образование цитотоксических молекул CD8<sup>+</sup> Т-клетками. Снижается пролиферативная активность CD8<sup>+</sup> Т-клеток, как полагают, в результате снижения продукции IL-2 CD4<sup>+</sup> хелперами. Ослаблению противовирусной защиты способствует дифференцировка CD4<sup>+</sup> Т-клеток в хелперы Th2-типа. Даже для спектра цитокинов, синтезируемых CD8<sup>+</sup> цитотоксическими Т-лимфоцитами, характерно преобладание Th2-цитокинов.

Естественно было бы ожидать, что иммунные процессы, которые, пусть и в ослабленной форме, развиваются в ответ на внедряющийся вирус, смогут хотя бы в малой степени защитить организм от инфекции. В действительности, если это и происходит, то лишь на начальном периоде заболевания. В дальнейшем, несмотря на присутствие антигенспецифических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, происходит интенсивная репликация вируса. Это является следствием отбора вирусов с изменениями в эпитопах, распознаваемых



**Рис. 4.49.** Динамика содержания в крови инфицированных вирусом иммунодефицита человека самого вируса и антител к двум его белкам

Т-клетками, что позволяет им избегать давления со стороны Т-клеточного иммунитета. Таким образом, клеточный иммунный ответ не способен элиминировать вирус из организма в связи с высокой приспособляемостью вируса, основанной на изменчивости. Неэффективны оказываются и НК-клетки, хотя они не являются объектом прямого инфицирования вирусом.

Отражением взаимоотношений между ВИЧ-инфекцией и макроорганизмом служит динамика содержания в циркуляции вирусных антигенов и антивирусных антител (рис. 4.49). Всплеск антигенемии в ранний период развития ВИЧ-инфекции (2–8 нед после инфицирования) отражает интенсивную репликацию вирусов, внедрившихся в клетки. При сохранной иммунной системе хозяина это вызывает наработку нейтрализующих антител (преимущественно к поверхностным белкам gp120, gp41, группоспецифическому gag-антигену p17), что можно выявить по подъему титра сывороточных антител к указанным антигенам, начиная с 8-й недели от момента заражения. Такую смену циркуляции антигена на присутствие в кровотоке антител обозначают термином **«сероконверсия»**. Антитела к оболочечным (env) белкам стабильно сохраняются в течение всего заболевания, тогда как специфичные к gag антитела исчезают на определенных этапах его развития, и вирусные антигены повторно появляются в кровотоке. Одновременно с накоплением в сыворотке крови антител к вирусным антигенам повышается концентрация всех сывороточных иммуноглобулинов, включая IgE.

Циркулирующие антитела способны нейтрализовать свободный вирус и связывать его растворимые белки. При ответе на gp120 это в наибольшей степени относится к антителам, специфичным к иммунодоминантному эпитопу 303–337, локализованному в 3-м гипервариабельном домене (V3) молекулы. Это подтверждается тем фактом, что пассивно введенные антитела могут предохранить от заражения ВИЧ. Нейтрализующие антитела, особенно направленные против gp120, способны блокировать инфициро-

вание клеток. Вероятно, это играет определенную роль в первоначальном сдерживании ВИЧ-инфекции и в какой-то степени обуславливают длительный латентный период, характерный для данного заболевания. В то же время эффекторная активность этих антител ограничена и их защитную роль при ВИЧ-инфекции нельзя считать доказанной.

***Формирование иммунодефицита при синдроме приобретенного иммунодефицита***  
(см. табл. 4.20)

Основная причина иммунодефицита при СПИДе — гибель  $CD4^+$  Т-клеток. Очевидная причина гибели инфицированных клеток — цитопатогенное действие вируса. При этом клетки погибают по механизму некроза вследствие нарушения целостности их мембраны. Так, при заражении ВИЧ клеток крови численность  $CD4^+$  Т-клеток, начиная с 3-х суток, резко уменьшается одновременно с высвобождением вирионов в среду. В наибольшей степени страдает популяция  $CD4^+$  Т-клеток слизистой оболочки кишечника.

Помимо этого механизма гибели инфицированных клеток при СПИДе выявляют высокий уровень апоптоза. Поражение Т-клеточного звена иммунной системы значительно превосходит ожидаемое на основании оценки числа инфицированных клеток. В лимфоидных органах инфицировано не более 10–15%  $CD4^+$  Т-клеток, а в крови это количество составляет только 1%, однако апоптозу подвергается значительно больший процент  $CD4^+$  Т-лимфоцитов. Помимо инфицированных, апоптотизирует значительная часть неинфицированных вирусом клеток, прежде всего  $CD4^+$  Т-лимфоцитов, специфичных к антигенам ВИЧ (до 7% этих клеток). Индукторами апоптоза служат белки gp120 и регуляторный белок Vpr, активные в растворимой форме. Белок gp120 понижает уровень антиапоптотического белка Bcl-2 и повышает уровень проапоптотических белков p53, Bax, Bak. Белок Vpr нарушает целостность митохондриальной мембраны, вытесняя Bcl-2. Происходит выход из митохондрии цитохрома c и активация каспазы 9, что приводит к апоптозу  $CD4^+$  Т-клеток, в том числе не инфицированных, но ВИЧ-специфичных.

Взаимодействие вирусного белка gp120 с мембранным гликопротеином  $CD4^+$  Т-лимфоцитов служит причиной еще одного процесса, происходящего при ВИЧ-инфекции и участвующего в гибели и функциональной инактивации клеток хозяина — формированию синцития. В результате взаимодействия gp120 и CD4 происходит слияние клеток с формированием многоядерной структуры, не способной выполнять нормальные функции и обреченной на гибель.

Среди клеток, инфицируемых ВИЧ, погибают только Т-лимфоциты и мегакариоциты, подвергаясь цитопатогенному действию или вступая в апоптоз. Ни макрофаги, ни эпителиальные или другие клетки, инфицированные вирусом, не теряют жизнеспособности, хотя их функция может нарушаться. Дисфункцию может вызывать не только ВИЧ как таковой, но и его изолированные белки, например, gp120 или продукт гена *tat* p14. Хотя ВИЧ не способен вызывать злокачественную трансформацию лимфоцитов (в отличие, например, от вируса HTLV-1), белок tat (p14) участвует в индукции саркомы Капоши при ВИЧ-инфекции.

Резкое снижение содержания  $CD4^+$  Т-лимфоцитов — самый яркий лабораторный признак ВИЧ-инфекции и ее эволюции в СПИД. Условная

граница содержания этих клеток, за которой обычно следуют клинические проявления СПИД, — 200–250 клеток в 1 мкл крови (в относительных цифрах — около 20%). Соотношение CD4/CD8 на пике заболевания снижается до 0,3 и ниже. В этот период проявляется общая лимфопения с уменьшением содержания не только CD4<sup>+</sup>, но и CD8<sup>+</sup> клеток и В-лимфоцитов. Ответ лимфоцитов на митогены и выраженность кожных реакций на распространенные антигены продолжает снижаться до полной анергии. К разнообразным причинам неспособности эффекторных Т-клеток элиминировать ВИЧ добавляется высокая мутабельность ВИЧ с образованием все новых эпитопов, не распознаваемых цитотоксическими Т-клетками.

Естественно, что среди иммунологических расстройств при СПИДе доминируют нарушения Т-клеточных и Т-зависимых процессов. К факторам, определяющим эти нарушения, относят:

- снижение числа CD4<sup>+</sup> Т-хелперов вследствие их гибели;
- ослабление функций CD4<sup>+</sup> Т-клеток под влиянием инфицирования и действия растворимых продуктов ВИЧ, особенно gp120;
- нарушение баланса популяции Т-клеток со сдвигом соотношения Th1/Th2 в сторону Th2, тогда как защите от вируса способствуют Th1-зависимые процессы;
- индукция регуляторных Т-клеток белком gp120 и ВИЧ-ассоциированным белком р67.

Снижение способности организма к иммунной защите затрагивает как ее клеточные, так и гуморальные факторы. В результате формируется комбинированный иммунодефицит, делающий организм уязвимым к инфекционным агентам, в том числе условно-патогенным (отсюда — развитие оппортунистических инфекций). Дефицит клеточного иммунитета играет определенную роль в развитии лимфотропных опухолей, а сочетание иммунодефицита и действия некоторых белков ВИЧ — в развитии саркомы Капоши.

#### ***Клинические проявления иммунодефицита при инфекции вирусом иммунодефицита человека и синдроме приобретенного иммунодефицита***

Основные клинические проявления СПИДа состоят в развитии инфекционных заболеваний, главным образом, оппортунистических. Наиболее характерны для СПИДа следующие заболевания: пневмонии, вызываемые *Pneumocystis carinii*; диарея, вызываемая криптоспоридиями, токсоплазмами, жиардиями, амебами; стронгилоидоз и токсоплазмоз головного мозга и легких; кандидоз полости рта и пищевода; криптококкоз, диссеминированный или локализованный в ЦНС; кокцидиомикоз, гистоплазмоз, мукормикоз, аспергиллез различной локализации; инфекции нетипичными микобактериями различной локализации; сальмонеллезная бактериемия; цитомегаловирусная инфекция легких, ЦНС, пищеварительного тракта; герпетическая инфекция кожи и слизистых оболочек; инфекция вирусом Эпштейна–Барр; мультифокальная папавирусная инфекция с энцефалопатией.

Другую группу связанных со СПИДом патологических процессов составляют опухоли, отличие которых от неассоциированных со СПИДом, состоит в том, что они развиваются в более молодом возрасте, чем обычно (до 60 лет). При СПИДе часто развиваются саркома Капоши и неходжкинские лимфомы, локализующиеся преимущественно в головном мозгу.

Развитию патологического процесса способствуют некоторые реакции макрооргнаизма, провоцируемые ВИЧ-инфекцией. Так, активация CD4<sup>+</sup> Т-клеток в ответ на действие вирусных антигенов способствует реализации цитопатогенного эффекта, особенно апоптоза Т-лимфоцитов. Большинство образуемых при этом Т-клетками и макрофагами цитокинов благоприятствуют прогрессированию ВИЧ-инфекции. Наконец, в патогенезе СПИДа важную роль играет аутоиммунная составляющая. Ее основу составляет гомология между белками ВИЧ и некоторыми белками организма, например между gp120 и молекулами МНС. Однако эти нарушения, усугубляя иммунодефицит, не формируют специфических аутоиммунных синдромов.

Уже на доклинической стадии ВИЧ-инфекции возникает необходимость использования иммунологических методов диагностики. С этой целью используют иммуноферментные тест-наборы, позволяющие определять наличие в сыворотке крови антител к белкам ВИЧ. Существующие тест-системы основаны на твердофазном иммуносорбентном тестировании антител (ELISA). Первоначально применяли тест-наборы с использованием в качестве антигенного материала вирусных лизатов. Позже с этой целью стали применять рекомбинантные белки ВИЧ и синтетические пептиды, воспроизводящие эпитопы, с которыми взаимодействуют сывороточные антитела ВИЧ-инфицированных людей.

В связи с исключительно высокой ответственностью врачей, делающих заключение об инфицированности ВИЧ на основании лабораторных анализов, принята практика повторной постановки анализов на антитела (иногда с помощью альтернативных методов, например иммуноблоттинга, см. раздел 3.2.1.4), а также определение вируса с помощью полимеразной цепной реакции.

Лечение СПИДа основано на применении противовирусных препаратов, среди которых наиболее широко используют зидовудин, действующий как антиметаболит. Успехи достигнуты в контроле течения СПИДа, существенно увеличивающем продолжительность жизни больных. Основной терапевтический подход — использование антиметаболитов нуклеиновых кислот в варианте высокоактивной антиретровирусной терапии (*High active antiretroviral therapy* — HAART). Эффективным дополнением к антиретровирусной терапии служит применение препаратов интерферонов, а также лечение сопутствующих заболеваний и вирусных инфекций, способствующих прогрессированию СПИД.

Летальность от СПИД до сих пор составляет 100%. Наиболее частой причиной смерти являются оппортунистические инфекции, особенно пневмоцистные пневмонии. Другие причины смерти — сопутствующие опухоли, поражение центральной нервной системы и пищеварительного тракта.

#### 4.7.3. Вторичные иммунодефициты

*Вторичные иммунодефицитные состояния* — это нарушения иммунной защиты организма вследствие действия ненаследственных индукторных факторов (табл. 4.21). Они не являются самостоятельными нозологическими формами, а лишь сопутствуют заболеваниям или действию иммунологических факторов. В большей или меньшей степени нарушения иммуни-

тета сопутствуют большинству заболеваний, и это существенно осложняет определение места вторичных иммунодефицитов в развитии патологии.

**Таблица 4.21.** Основные отличия первичных и вторичных иммунодефицитов

Критерий	Первичные иммунодефициты	Вторичные иммунодефициты
Наличие генетического дефекта с установленным типом наследования	Есть	Нет
Роль индуцирующего фактора	Нет	Есть
Раннее проявление недостаточности иммунитета	Выражено	Время проявления иммунодефицита определяется действием индуцирующего фактора
Оппортунистические инфекции	Развиваются первично	Развиваются после действия индуцирующего фактора
Лечение	Заместительная, противoinфекционная терапия. Генотерапия	Устранение индуцирующего фактора. Заместительная, противoinфекционная терапия

Часто бывает трудно дифференцировать вклад в развитие нарушений иммунитета наследственных факторов и индукторных воздействий. Во всяком случае, реакция на иммунотоксические агенты зависит от наследственных факторов. Примером сложностей в интерпретации основ нарушений иммунитета могут служить заболевания, отнесенные к группе «часто болеющие дети». Основа чувствительности к инфекции, в частности, респираторной вирусной, — генетически (полигенно) детерминированная иммунологическая конституция, хотя в качестве этиологических факторов выступают конкретные возбудители. Однако на тип иммунологической конституции оказывают влияние факторы внешней среды и ранее перенесенные заболевания. Практическая значимость точного вычленения наследственно обусловленного и приобретенного компонентов патогенеза иммунологической недостаточности будет возрастать по мере разработки методов дифференцированного терапевтического воздействия на эти формы иммунодефицитов, в том числе методов адаптивной клеточной терапии и генотерапии.

Основой иммунодефицитов, не вызванных генетическими дефектами, может служить:

- гибель клеток иммунной системы — тотальная или избирательная;
- нарушение функции иммуноцитов;
- несбалансированное преобладание активности регуляторных клеток и супрессорных факторов.

#### 4.7.3.1. Иммунодефицитные состояния, обусловленные гибелью иммуноцитов

Классические примеры таких иммунодефицитов — нарушения иммунитета, вызванные действием ионизирующей радиации и цитотоксических лекарственных средств.

Лимфоциты относят к немногочисленным клеткам, реагирующим на действие ряда факторов, в частности повреждающих ДНК, развитием апоптоза. Этот эффект проявляется при действии ионизирующей радиации и многих цитостатиков, используемых в лечении злокачественных опухолей (например, цисплатина, внедряющегося в двойную спираль ДНК). Причина развития апоптоза в этих случаях — накопление нерепарированных разрывов, регистрируемых клеткой с участием киназы АТМ (см. раздел 4.7.1.5), от которой сигнал поступает по нескольким направлениям, в том числе к белку р53. Этот белок отвечает за запуск апоптоза, биологический смысл которого состоит в защите многоклеточного организма ценой гибели единичных клеток, которые несут генетические нарушения, чреватые риском малигнизации клетки. В большинстве других клеток (как правило, покоящихся) срабатыванию этого механизма противодействует защита от апоптоза, обусловленная повышенной экспрессией белков Bcl-2 и Bcl-X<sub>L</sub>.

#### *Радиационные иммунодефициты*

Уже в первое десятилетие после открытия ионизирующих излучений была обнаружена их способность ослаблять резистентность к инфекционным заболеваниям и избирательно снижать содержание лимфоцитов в крови и лимфоидных органах.

Радиационный иммунодефицит развивается сразу после облучения организма. Действие радиации обусловлено преимущественно двумя эффектами:

- нарушением естественных барьеров, прежде всего слизистых оболочек, что приводит к усилению доступа в организм патогенов;
- избирательным повреждением лимфоцитов, а также всех делящихся клеток, включая предшественники клеток иммунной системы и клетки, вовлекаемые в иммунный ответ.

Предметом изучения радиационной иммунологии является, главным образом, второй эффект. Радиационная гибель клеток реализуется по двум механизмам — митотическому и интерфазному. Причина митотической гибели — нерепарируемые повреждения ДНК и хромосомного аппарата, препятствующие осуществлению митозов. Интерфазная гибель затрагивает покоящиеся клетки. Ее причиной служит развитие апоптоза по р53/АТМ-зависимому механизму (см. выше).

Если чувствительность всех типов клеток к митозу примерно одинакова ( $D_0$  — около 1 Гр), то по чувствительности к интерфазной гибели лимфоциты значительно превосходят все остальные клетки: большинство их погибает при облучении в дозах 1–3 Гр, тогда как клетки других типов погибают при дозах, превышающих 10 Гр. Высокая радиочувствительность лимфоцитов обусловлена, как уже сказано, низким уровнем экспрессии антиапоптотических факторов Bcl-2 и Bcl-X<sub>L</sub>. Различные популяции и субпопуляции лимфоцитов несущественно различаются по чувствительности к апоптозу (В-клетки несколько чувствительнее Т-лимфоцитов;  $D_0$  для них составляет соответственно 1,7–2,2 и 2,5–3,0 Гр). В процессе лимфопоэза чувстви-

тельность к цитотоксическим воздействиям изменяется в соответствии с уровнем экспрессии в клетках антиапоптотических факторов: она наиболее высока в периоды селекции клеток (для Т-лимфоцитов — стадия кортикальных  $CD4^+ CD8^+$  тимоцитов,  $D_0$  — 0,5–1,0 Гр). Радиочувствительность высока у покоящихся клеток, она дополнительно возрастает на начальных этапах активации, а затем резко снижается. Высокой радиочувствительностью характеризуется процесс пролиферативной экспансии лимфоцитов, причем при вступлении в пролиферацию могут погибнуть клетки, подвергшиеся действию излучения ранее и несущие нерепарированные разрывы ДНК. Сформировавшиеся эффекторные клетки, особенно плазматические, устойчивы к действию радиации ( $D_0$  — десятки Гр). В то же время клетки памяти радиочувствительны примерно в той же степени, что и наивные лимфоциты. Клетки врожденного иммунитета радиорезистентны. Радиочувствительны только периоды их пролиферации во время развития. Исключение составляют НК-клетки, а также дендритные клетки (погибают при дозах 6–7 Гр), которые по радиочувствительности занимают промежуточное положение между другими лимфоидными и миелоидными клетками.

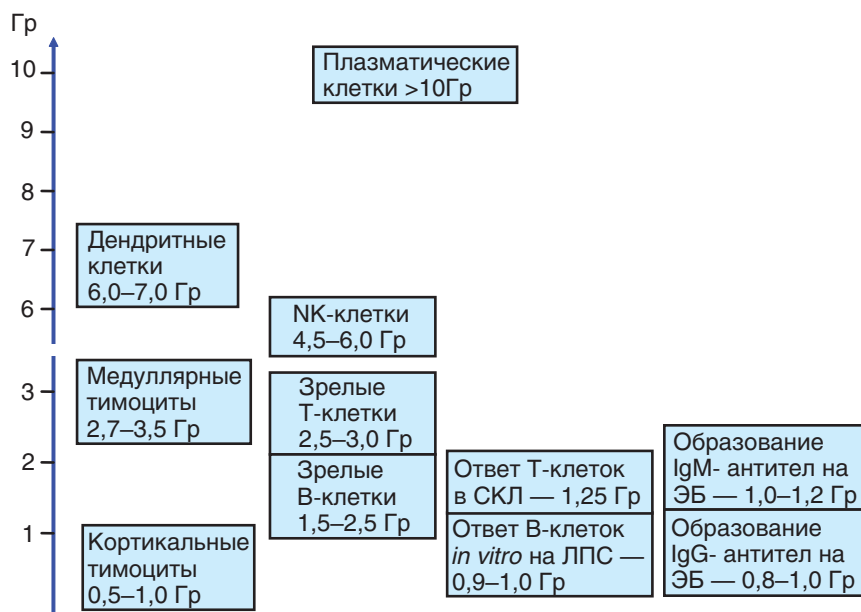
Хотя зрелые миелоидные клетки и опосредуемые ими реакции радиорезистентны, в ранние сроки после облучения максимально проявляется именно недостаточность миелоидных клеток, в первую очередь нейтрофилов, вызванная радиационным нарушением гемопоэза. Его последствия раньше и тяжелее всего сказываются на нейтрофильных гранулоцитах как популяции клеток с наиболее быстрым обменом пула зрелых клеток. Это обуславливает резкое ослабление первой линии защиты, нагрузка на которую именно в этот период значительно возрастает в связи с нарушением барьеров и бесконтрольным поступлением в организм патогенов и других чужеродных агентов. Ослабление этого звена иммунитета служит главной причиной радиационной гибели в ранние сроки после облучения. В более поздние сроки последствия поражения факторов врожденного иммунитета сказываются значительно слабее. Функциональные проявления врожденного иммунитета сами по себе устойчивы к действию ионизирующих излучений.

Через 3–4 сут после облучения в дозах 4–6 Гр у мышей погибает более 90% лимфоидных клеток и происходит опустошение лимфоидных органов. Функциональная активность выживших клеток снижается. Резко нарушается хоминг лимфоцитов — их способность мигрировать в процессе рециркуляции во вторичные лимфоидные органы. Реакции адаптивного иммунитета при действии этих доз ослабляются в соответствии со степенью радиочувствительности клеток, которые опосредуют эти реакции. В наибольшей степени от действия радиации страдают те формы иммунного ответа, развитие которых нуждается во взаимодействиях радиочувствительных клеток. Поэтому клеточный иммунный ответ более радиорезистентен, чем гуморальный, а тимуснезависимое антителообразование более радиорезистентно, чем тимусзависимый гуморальный ответ.

Дозы радиации в интервале 0,1–0,5 Гр не вызывают повреждения периферических лимфоцитов и нередко оказывают стимулирующее действие на иммунный ответ, обусловленный прямой способностью квантов излучения,

генерирующих активные формы кислорода, активировать в лимфоцитах сигнальные пути. Иммуностимулирующее действие радиации, особенно в отношении IgE-ответа, закономерно проявляется при облучении после иммунизации. Полагают, что в этом случае стимулирующий эффект обусловлен относительно более высокой радиочувствительностью регуляторных Т-клеток, контролирующих эту форму иммунного ответа, по сравнению с эффекторными клетками. Стимулирующее действие радиации на клетки врожденного иммунитета проявляется даже при действии высоких доз, особенно в отношении способности клеток продуцировать цитокины (IL-1, TNF  $\alpha$  и др.). Помимо прямого стимулирующего действия радиации на клетки, проявлению усиливающего эффекта способствует стимуляция этих клеток продуктами патогенов, поступающих в организм через поврежденные барьеры. Однако повышение активности клеток врожденного иммунитета под действием ионизирующей радиации не является адаптивным и не обеспечивает адекватной защиты. В связи с этим превалирует отрицательное действие облучения, проявляющееся в подавлении (при дозах, превышающих 1 Гр) адаптивного антигенспецифического иммунного ответа (рис. 4.50).

Уже в период развивающегося опустошения лимфоидной ткани включаются восстановительные процессы. Восстановление происходит двумя основными путями. С одной стороны, активизируются процессы лимфопоэза за счет дифференцировки всех разновидностей лимфоцитов из кроветворных стволовых клеток. В случае Т-лимфопоэза к этому добавляется развитие Т-лимфоцитов из внутритимусных предшественников. При этом в определенной степени повторяется последовательность событий,



**Рис. 4.50.** Радиочувствительность некоторых клеток иммунной системы и опосредуемых ими реакций. Представлены величины  $D_{50}$ . ЭБ — эритроциты барана

свойственных Т-лимфопозу в эмбриональном периоде: сначала образуются  $\gamma\delta$ Т-клетки, затем —  $\alpha\beta$ Т-клетки. Процессу восстановления предшествует омоложение эпителиальных клеток тимуса, сопровождающееся повышением выработки ими пептидных гормонов. Численность тимоцитов быстро возрастает, достигая максимума к 15-м суткам, после чего происходит вторичная атрофия органа вследствие истощения популяции внутритимусных клеток-предшественников. Эта атрофия мало сказывается на численности периферических Т-лимфоцитов, поскольку к этому времени включается второй источник восстановления популяции лимфоцитов.

Этот источник — гомеостатическая пролиферация выживших зрелых лимфоцитов. Стимул к реализации этого механизма регенерации лимфоидных клеток — выработка IL-7, IL-15 и BAFF, служащих гомеостатическими цитокинами соответственно для Т-, NK- и В-клеток. Восстановление Т-лимфоцитов происходит наиболее медленно, поскольку для реализации гомеостатической пролиферации необходим контакт Т-лимфоцитов с дендритными клетками, экспрессирующими молекулы МНС. Численность дендритных клеток и экспрессия на них молекул МНС (особенно класса II) после облучения снижены. Эти изменения можно трактовать как индуцированные радиацией изменения микроокружения лимфоцитов — лимфоцитарных ниш. С этим связана задержка восстановления пула лимфоидных клеток, особенно существенная для  $CD4^+$  Т-клеток, которая реализуется в неполном объеме.

Т-клетки, формирующиеся в процессе гомеостатической пролиферации, имеют фенотипические признаки клеток памяти (см. раздел 3.4.2.6). Для них характерны пути рециркуляции, свойственные этим клеткам (миграция в барьерные ткани и нелимфоидные органы, ослабление миграции в Т-зоны вторичных лимфоидных органов). Именно поэтому численность Т-лимфоцитов в лимфоузлах практически не восстанавливается до нормы, в то время как в селезенке она восстанавливается полностью. Иммунный ответ, развивающийся в лимфатических узлах, также не достигает нормального уровня при его полной нормализации в селезенке. Таким образом, под влиянием ионизирующей радиации изменяется пространственная организация иммунной системы. Другое следствие конверсии фенотипа Т-лимфоцитов в процессе гомеостатической пролиферации — учащение аутоиммунных процессов вследствие повышения вероятности распознавания аутоантигенов при миграции в нелимфоидные органы, облегчения активации Т-клеток памяти и отставания регенерации регуляторных Т-клеток по сравнению с остальными субпопуляциями. Многие изменения в иммунной системе, индуцированные радиацией, напоминают следствия обычного старения; особенно наглядно это проявляется в тимусе, возрастное снижение активности которого ускоряется облучением.

Варьирование дозы облучения, его мощности, применение фракционированного, местного, внутреннего облучения (инкорпорированных радионуклидов) придает определенную специфику иммунологическим нарушениям в пострadiационном периоде. Однако принципиальные основы радиационного поражения и пострadiационного восстановления во всех этих случаях не отличаются от рассмотренных выше.

Особую практическую значимость действие умеренных и малых доз радиации приобрело в связи с радиационными катастрофами, особен-

но в Чернобыле. Сложно точно оценить эффекты малых доз радиации и дифференцировать влияние радиации от роли привходящих факторов (особенно таких, как стресс). В этом случае могут проявляться уже упоминавшееся стимулирующее действие радиации как часть эффекта гормезиса. Радиационную иммуностимуляцию нельзя рассматривать как положительное явление, поскольку оно, во-первых, не адаптивно, во-вторых сопряжено с разбалансировкой иммунных процессов. Пока затруднительно объективно оценить влияние на иммунную систему человека того незначительного повышения естественного фона радиации, которое наблюдается в местностях, прилегающих к зонам катастроф или связанных с особенностями производственной деятельности. В подобных случаях радиация становится одним из неблагоприятных факторов среды и ситуацию следует анализировать в контексте экологической медицины.

***Иммунодефицитные состояния, вызываемые нерадиационной гибелью лимфоцитов***

Массовая гибель лимфоцитов составляет основу иммунодефицитов, развивающихся при ряде инфекционных заболеваний как бактериальной, так и вирусной природы, особенно при участии суперантигенов. Суперантигены — субстанции, способные активировать  $CD4^+$  Т-лимфоциты с участием АПК и их молекул МНС-II. Действие суперантигенов отличается от эффекта обычной презентации антигенов.

- Суперантиген не расщепляется до пептидов и встраивается не в антигенсвязывающую щель, а подсоединяется к «боковой поверхности»  $\beta$ -цепи молекулы МНС-II.
- Суперантиген распознается Т-клеткой по их сродству не к антигенсвязывающему центру TCR, а к так называемому 4-му гипервариабельному участку — последовательности 65–85, локализованной на боковой поверхности  $\beta$ -цепей TCR, относящихся к определенным семействам.

Таким образом, распознавание суперантигена не является клональным, а обусловлено принадлежностью TCR к тем или иным  $\beta$ -семействам. В результате суперантигены вовлекают в ответ значительное количество  $CD4^+$  Т-лимфоцитов (до 20–30%). Так, в ответе на стафилококковый экзотоксин SEB участвуют  $CD4^+$  Т-клетки мышей, экспрессирующих TCR, относящиеся к семействам  $V\beta 7$  и  $V\beta 8$ . После периода активации и пролиферации, сопровождающихся гиперпродукцией цитокинов, эти клетки подвергаются апоптозу, что обуславливает значительную степень лимфопении, а поскольку гибнут только  $CD4^+$  Т-клетки, то нарушается также баланс субпопуляций лимфоцитов. Этот механизм лежит в основе Т-клеточного иммунодефицита, развивающегося на фоне некоторых вирусных и бактериальных инфекций.

**4.7.3.2. Вторичные иммунодефициты, обусловленные функциональными нарушениями лимфоцитов**

Вероятно, именно эта группа вторичных иммунодефицитов является преобладающей. Однако в настоящее время практически отсутствуют сколько-нибудь точные данные о механизмах снижения функции лимфоцитов при различных соматических заболеваниях и воздействии вредных факторов. Только в единичных случаях удастся установить точные механизмы,

лежащие в основе функциональных иммунодефицитов, однако и они пока не складываются в единую систему.

Один из наиболее значимых в практическом отношении — локальный иммунодефицит, формирующийся в зоне роста опухоли. Большинство Т-клеток, инфильтрирующих опухоль, функционально инертны. Это обусловлено формированием опухоли иммунодепрессивного микроокружения. Одним из его проявлений является нарушение экспрессии полипептидных цепей, входящих в состав рецепторного комплекса TCR—CD3— $\zeta_2$ . Чаше всего нарушается экспрессия  $\zeta$ -цепей, выполняющих основную сигнальную функцию в данном комплексе. Утрата экспрессии этих цепей сопряжена с потерей способности рецептора Т-клеток передавать сигнал о связывании антигена и, следовательно, активироваться в ответ на презентацию антигена. Этот дефект устраняется при культивировании в присутствии IL-2 и других цитокинов.

По-видимому, одним из основных эндогенных факторов, обуславливающих ингибирование иммунных процессов, служит индолил 2,3-диоксигеназа (IDO). Достаточно хорошо обоснована роль этого фермента в локальном подавлении иммунитета и формировании иммунологически привилегированных зон — при развитии плода, росте опухоли, некоторых аутоиммунных процессах (ревматоидный артрит и др.). Его роль в формировании системного иммунодефицита пока оценить трудно.

Активность индолил 2,3-диоксигеназы индуцируется вирусами, бактериальным ЛПС (через TLR), а также IFN $\gamma$  преимущественно в стромальных и дендритных клетках. Физиологическая роль этого фермента состоит, как полагают, в ограничении чрезмерно выраженного ответа на патогены, реализуемом по принципу петли отрицательной обратной связи: сильная реакция Т-клеток приводит к интенсивной выработке индолил 2,3-диоксигеназы, которая сдерживает реакцию Т-клеток.

Механизм действия индолил 2,3-диоксигеназы состоит в превращении триптофана в кинуренин. Дефицит триптофана (аминокислоты в наибольшей степени лимитирующей синтез белков) и накопление кинуренина обуславливают блок клеточного цикла (нарушается переход из G1- в S-фазу). Посредниками в реализации этого эффекта выступают стрессорная киназа GCN2, индуцирующая экспрессию фактора инициации eIF2 $\alpha$ , который способствует экспрессии LIF — ингибиторной изоформы транскрипционного фактора NF-IL-6.

Индукцию индолил 2,3-диоксигеназы в плазматоидных дендритных клетках рассматривают как возможный механизм реализации активности действия естественных регуляторных Т-клеток. Полагают, что сигнал к индукции индолил 2,3-диоксигеназы поступает в дендритную клетку при взаимодействии супрессорной молекулы CTLA-4 с молекулами B7 (CD80/CD86) дендритной клетки. Особо пристальное внимание к индолил 2,3-диоксигеназе привлечено в связи с ее ролью в локальном подавлении иммунных процессов в зоне роста опухоли. Делают попытки решить задачу отмены иммуносупрессорного действия индолил 2,3-диоксигеназы с помощью ее низкомолекулярного ингибитора — 1-метилтриптофана, испытываемого в качестве иммуномодулирующего средства.

Функциональную неполноценность, выражающуюся на системном уровне в ослаблении выработки IL-2 и интенсивности пролиферативного ответа

на митогены, наблюдают в условиях дефицита гормонов тимуса, особенно тимулина. При этом число Т-клеток и соотношение субпопуляций, как правило, не изменяется. Этот дефект, в частности, проявляется при нормальном старении и корригируется назначением пептидных препаратов тимусного происхождения. Вероятно, этот вариант функционального нарушения Т-клеток вносит вклад в формирование иммунологической недостаточности, развивающейся при дефиците  $Zn^{2+}$  (тимулин активен только в комплексе с ионами  $Zn^{2+}$ ). Можно предположить, что клеточный иммунодефицит, обусловленный недостаточностью тимусных гормонов, служит частой причиной ослабления иммунитета на фоне различных заболеваний. К сожалению, несмотря на то, что пептидные гормоны тимуса известны давно, точные сведения об их физиологии и патологии ограничены.

Тем не менее известно, что один из механизмов действия гормонов тимуса связан с их влиянием на циклические нуклеотиды. Повышение внутриклеточного уровня цАМФ в Т-лимфоцитах сопряжено с ослаблением их функций, во многом аналогичным наблюдаемому при дефиците гормонов тимуса. Поскольку на уровень цАМФ влияет (через воздействие на их синтез и разрушение) большое число гормонов (глюкокортикоиды и др.), метаболитов (аденозин и др.), лекарственных средств (аминофиллин и др.), можно допустить, что одним из путей, ведущих к развитию функциональных нарушений лимфоцитов, особенно Т-клеток, является избыточные воздействия эндогенных и экзогенных факторов на систему циклических нуклеотидов, особенно на цАМФ.

Эти отрывочные данные свидетельствуют о существовании обширной области иммунопатологии, обусловленной функциональными нарушениями лимфоцитов, которые пока практически не затронуты исследованиями. Однако, возможно, именно такие нарушения лежат в основе чрезвычайно высокой «отзывчивости» лимфоидных клеток на воздействия внешних и внутренних факторов, которая в настоящее время находится фактически вне сферы научного анализа.

#### 4.7.3.3. Физиологические иммунодефициты

##### *Изменение иммунитета при стрессе*

Стресс представляет стандартную адаптационную реакцию на необычные ситуации, потенциально угрожающие организму. В основе реакции лежит повышенная выработка АКТИВ и индуцированная ею гиперпродукция стероидных гормонов коры надпочечников, а также катехоламинов. К основным мишеням этих гормонов, особенно глюкокортикоидов, относятся лимфоциты (см. раздел 3.6.6.2), что и определяет реакцию иммунной системы при стрессе.

Реакция лимфоцитов зависит от концентрации глюкокортикоидов, а следовательно, от интенсивности стресса. Воздействия умеренной интенсивности вызывают преимущественно перераспределение лимфоцитов. Незрелые кортикальные тимоциты эмигрируют из тимуса и поступают в основном в костный мозг. Сюда же мигрирует часть зрелых Т-клеток. При слабом стрессе массовая гибель лимфоцитов отсутствует. Функциональная активность лимфоцитов изменяется незначительно, отчасти

в связи их пространственным перераспределением. Уровень иммунного ответа, особенно гуморального, при этом снижается, хотя тоже незначительно. В целом же действие малых и умеренных доз гормонов надпочечников, оказывающих слабое и преходящее влияние на иммунную систему, нельзя рассматривать как причину развития иммунодефицитного состояния.

Иная ситуация создается при интенсивных и длительных или повторяющихся стрессорных воздействиях. При этом концентрация глюкокортикоидов может превысить пороговые уровни для индукции апоптоза лимфоцитов. Соотношение чувствительности различных разновидностей лимфоцитов к действию глюкокортикоидов таково же, как к действию радиации, что обусловлено одинаковой причиной гибели — развитием апоптоза при условии низкой экспрессии внутриклеточных антиапоптотических факторов (Bcl-2 и др.). Долгое время чувствительность к действию глюкокортикоидов рассматривалась как главный показатель степени зрелости тимоцитов: кортизончувствительность свойственна незрелым кортикальным, а кортизонрезистентность — зрелым медуллярным тимоцитам. Макрофаги под влиянием глюкокортикоидов не погибают, но их функция ослабляется — в основном вследствие повышения внутриклеточной концентрации цАМФ. В результате интенсивный стресс может вызвать подавление всех форм иммунного ответа, особенно гуморального. Течение уже развившегося иммунного ответа при этом не изменяется.

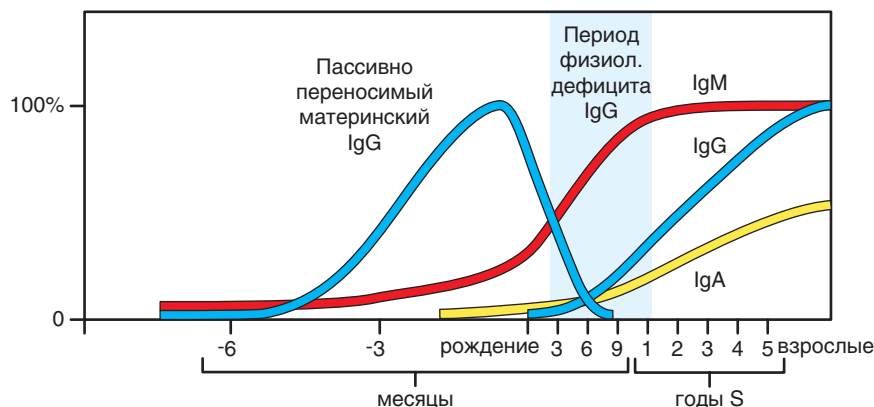
Обычно последствия стресса, даже сильного, быстро ликвидируются. Однако при длительном и повторном действии стресс может выступать в качестве кофактора формирования иммунодефицита, а также ускоренного старения иммунной системы. Этому способствуют изменения, индуцируемые стрессом в микроокружении лимфоцитов, например, в эпителиальных клетках тимуса.

### ***Возрастные иммунодефициты***

Известно 2 типа физиологических иммунодефицитов, ассоциированных с возрастом — иммунодефицит раннего постнатального возраста и иммунодефицит при старении.

**Иммунодефицит раннего постнатального периода** связан с тем, что формирование иммунной системы к моменту рождения еще не завершено (см. раздел 3.4.1.2).

Особенно четко основы возрастного иммунодефицита удастся продемонстрировать при анализе возрастной динамики концентрации сывороточных иммуноглобулинов у детей, отраженной на рис. 4.51. Первый пик концентрации IgG на графике отражает поступление IgG из организма матери в результате Fc-зависимого транспорта через плаценту. Иммуноглобулины других классов не преодолевают плацентарный барьер в связи с отсутствием на клетках трофобласта соответствующих Fc-рецепторов. У животных с различным строением плаценты условия проникновения материнских иммуноглобулинов в циркуляцию плода существенно варьируют. В связи с тем, что время полужизни в циркуляции молекул IgG большинства изотипов составляет около 20 сут, этот белок некоторое время сохраняется в организме новорожденного. В период кормления с молоком матери поступает секреторный IgA, защищающий слизистую оболочку кишечника и частично



**Рис. 4.51.** Изменение концентраций иммуноглобулинов основных классов в крови детей в онтогенезе

всасывающийся в неизменном виде. Из собственных иммуноглобулинов в организме новорожденных образуется только IgM, причем в количествах, значительно меньших, чем у взрослых. Уровень синтеза IgM, свойственный взрослым, достигается лишь к концу первого года жизни. Синтез собственных IgG начинается примерно в то же время, когда исчезают материнские IgG — в возрасте около 6 мес. Полного развития он достигает к 5–6 годам жизни. Еще медленнее формируется способность к образованию IgA и IgE, которая достигает уровня, характерного для взрослых, к 10 годам.

В результате сочетания описанных выше процессов оказывается, что у детей первых лет жизни проявляется естественный гуморальный иммунодефицит, затрагивающий синтез антител всех классов. В возрасте 6 мес выраженность этого дефицита достигает максимума в связи с исчерпанием запасов материнских иммуноглобулинов без должной компенсации собственными иммуноглобулинами. После года гуморальный дефицит снижается, а к 10 годам полностью ликвидируется. Наличие этого возрастного иммунодефицита проявляется в повышенной восприимчивости детей к инфекционным заболеваниям.

Данные относительно проявлений возрастного дефицита факторов клеточного иммунитета более ограничены. Наиболее определенные сведения на это счет получены для тимуса. К моменту рождения из тимуса эмигрируют почти исключительно  $\gamma\delta$ T-клетки с ограниченной способностью распознавать антиген. Непосредственно после рождения у мышей тимус вновь покидают  $\gamma\delta$ T-клетки, и лишь позже на протяжении нескольких дней периферические органы иммунной системы заселяется  $\alpha\beta$ T-клетками. В течение всего периода колонизации лимфоидных органов T-лимфоцитами функция тимусзависимого звена иммунной системы остается сниженной. Это проявляется не только в слабости ответа T-клеток на митогены и антигены, но еще в большей степени — в недостаточности контроля за гуморальным иммунитетом и функцией макрофагов, который осуществляют  $CD4^+$  T-клетки, позже других лимфоцитов завершающие свое развитие.

О том же свидетельствует низкий уровень выработки Т-клеточных цитокинов, включая IL-2, IFN $\gamma$  и Th2-цитокины.

Из анатомических отделов иммунной системы позже всего завершается формирование иммунной системы слизистых оболочек. Так, уже после рождения происходит морфогенез лимфоидной ткани, ассоциированной с носоглоткой и бронхами, при существенном влиянии микрофлоры. Развитие пейеровых бляшек также завершается после рождения. Все это не может не сказываться на эффективности иммунной защиты слизистых оболочек, основную роль в которой в раннем постнатальном периоде играют только факторы первой линии защиты.

Способность отвечать на различные группы антигенов приобретает в постнатальном онтогенезе в определенной последовательности. Так, у крыс иммунный ответ на антигены бордетелл проявляется уже в первые дни после рождения, тогда как ответ на пневмококковый полисахарид (тимуснезависимый антиген) — только в последнюю декаду первого месяца жизни. Это может служить причиной неодинаковой чувствительности детей раннего возраста к различным инфекционным агентам.

Таким образом, у детей раннего возраста проявляются признаки иммунодефицита, обусловленного естественной задержкой формирования в онтогенезе некоторых звеньев иммунитета и его незавершенностью к моменту рождения.

#### ***Старение иммунной системы и связанный с ней иммунодефицит***

Точные критерии оценки возникновения старческого иммунодефицита отсутствуют. О его возникновении можно судить в большей степени по клиническим проявлениям, чем по лабораторным показателям. Хотя возрастные изменения структуры и функции иммунной системы сомнения не вызывают, говорить о наличии старческого иммунодефицита можно лишь в единичных случаях. При этом у очень старых людей (более 90 лет) состояние иммунитета в целом более удовлетворительное, чем в более молодой возрастной группе (следствие отрицательного отбора лиц с дефектами иммунитета).

Наиболее ранние проявления старения иммунной системы связаны с возрастной инволюцией тимуса. Она проходит несколько этапов и имеет ряд последствий не только для тимусзависимой защиты, но и для всей иммунной системы. Раньше всего проявляются изменения, затрагивающие непосредственно тимус. Ослабляется способность стромы тимуса привлекать клетки-предшественники. Это обусловлено снижением секреции хемокинов, привлекающих лимфоидных предшественников. Уже на 1-й неделе после рождения резко снижается способность стромы тимуса заселяться сингенными тимоцитами. Снижение секреторной способности стромы (особенно эпителия) тимуса проявляется также в значительном ослаблении выработки пептидного гормона тимулина и снижении его концентрации в сыворотке крови. После 60 лет его удастся выявить только высокочувствительными методами. Значительно ослабляется способность стромы тимуса поддерживать пролиферацию и дифференцировку Т-клеток. В опытах с трансплантацией стромы тимуса мышам с варьированием возраста донора и реципиента установлено, что снижение эффективности образования зрелых Т-клеток определяется

возрастом тимуса, а не клеток-предшественников. Темп потери стромой тимуса способностью поддерживать развитие Т-клеток составляет сначала 3%, а в старости — 1% в год. У 2-летних мышей число Т-клеток, образующихся в тимусе, составляет 0,7% от их количества, продуцируемого тимусом новорожденных. На основе экстраполяции данных о темпе инволюции тимуса сделан вывод, что полная утрата способности тимуса поддерживать развитие Т-лимфоцитов должна произойти в возрасте 120 лет.

Потеря активности тимуса сопровождается периферизацией его функций, т.е. передачей некоторых его функций популяции периферических Т-клеток. Одно из проявлений этого феномена состоит в способности к самоподдержанию численности клеток и субпопуляционного состава с помощью механизмов гомеостатического контроля (см. раздел 3.4.2.6). При действии повреждающих факторов восстановление исходной численности Т-клеток с помощью гомеостатической пролиферации происходит быстрее, чем за счет довольно медленно реализуемого процесса дифференцировки из костномозговых клеток-предшественников. Другой аспект периферизации функций тимуса состоит во вкладе периферического отдела иммунной системы в совершенствование антигенраспознающего репертуара: помимо репертуара, формируемого в тимусе и не учитывающего реальные потребности организма, на периферии иммунной системы формируются клетки памяти, которые распознают антигены, реально присутствующие в окружении организма и уже проникавшие в его внутреннюю среду. С возрастом компартмент Т-клеток памяти постепенно расширяется и параллельно сужается компартмент наивных Т-клеток.

Параллельно усилению независимости Т-клеток от тимуса их функциональная активность, а затем и численность, с возрастом снижаются. Это обусловлено снижением продукции стромой тимуса гуморальных факторов (гормонов тимуса), поддерживающих должный уровень функциональной активности Т-лимфоцитов. Снижение функциональной активности долгое время не проявляется на уровне организма и может быть выявлено только с помощью функциональных тестов *in vitro*. Затем выявляют ослабление реакции Т-клеток в тестах *in vivo* на динитрохлорбензол и распространенные антигены, а у экспериментальных животных — в реакции «трансплантат против хозяина». Снижение численности Т-клеток может происходить в возрасте больше 70 лет и сильнее затрагивает CD4<sup>+</sup>, чем CD8<sup>+</sup> Т-клетки, а среди Т-хелперов — Th1-клетки — сильнее, чем Th2-клетки. Ни численность, ни функциональная активность В-лимфоцитов и NK-клеток при этом не изменяются. В ослаблении Т-клеточного надзора видят одну из причин возрастного учащения развития опухолей.

С возрастом происходит ослабление тимусзависимого иммунного ответа с одновременным снижением аффинитета образующихся антител (следствие ослабления тимусзависимого процесса созревания аффинитета). В то же время концентрация сывороточных IgG и IgA возрастает, как полагают, за счет усиления с возрастом поликлональных процессов. Один из результатов поликлональной активации — накопление аутоантител к ДНК, коллагену, IgG, органоспецифическим антигенам (например, антигенам щитовидной железы), которые, однако, не связаны с клиническими проявлениями аутоиммунных процессов. У аутоиммунных мышей линии NZB есть возрастной

порог проявления аутоиммунных процессов, которые прогрессируют по мере старения. Усиление аутоиммунизации традиционно связывают с ослаблением контроля ответа на «свое» со стороны регуляторных Т-клеток.

Таким образом, возрастные изменения иммунной системы в большинстве случаев проявляются нарушениями, затрагивающими популяцию Т-лимфоцитов, и инициируются процессами, связанными с возрастной инволюцией тимуса. Хотя удастся выявить ослабление с возрастом функций и даже численности Т-лимфоцитов, клинические проявления возрастного иммунодефицита редки. Основное отличие роли старения в функционировании иммунной системы от влияния на нее стресса — необратимость и однонаправленность возрастных изменений. В то же время хронические стрессы могут ускорить развитие возрастных изменений иммунной системы.

#### *Действие факторов внешней среды и иммунитет. Экологическая иммунология*

Условия жизни человека в современном мире могут существенно отличаться от тех условий, в которых проходило его формирование как биологического вида. Это несоответствие влечет за собой неадекватные реакции на воздействия, которые не были предусмотрены эволюцией. В такие реакции вовлекаются интегративные системы организма, к которым относят и иммунную систему.

Среди факторов, обуславливающих экологическое неблагополучие, можно выделить естественные (наблагоприятные климатические условия, дефицит природных факторов, например, микроэлементов, или наоборот, их повышенное содержание, повышенный естественный фон радиации) и искусственные, антропогенные. Наиболее распространенный вариант последних — загрязнение среды обитания химическими веществами, в том числе радионуклидами, формирование разного рода физических полей в результате использования в быту и технике источников ионизирующих и неионизирующих излучений. К вариантам экологического неблагополучия с особенно сильным и сконцентрированным влиянием неблагоприятных факторов относят действие профессиональных вредностей.

Неблагоприятные факторы среды влияют на человека в низких дозах, которые сами по себе чаще всего не вызывают патологий, но выступают в качестве кофакторов (т.е. способствующих факторов) заболеваний или проявляют свое неблагоприятное действие при накоплении эффектов. Они способны снижать качество жизни человека.

Поскольку изучение эффектов неблагоприятных экологических факторов чрезвычайно затруднено в связи с их слабостью и «растворением» в массе других воздействий, проведение исследований в области экологической медицины, в частности иммунологии, требует особой научной идеологии и методологии, которые в настоящее время сформированы не полностью.

В конце 80-х годов XX века по инициативе Р.В. Петрова была создана «Программа иммуноэкологического обследования населения России», которая реализовалась в широком масштабе по единому плану. В основе этой деятельности лежала экспедиционная работа, в процессе которой проводили массовые иммунологические обследования больших контингентов в местах экологического неблагополучия — природного (регионы Крайнего Севера и др.) и антропогенного (индустриальные регионы, территории, загрязненные в результате радиационных аварий и т.д.).

Перед началом реализации проекта была проведена масштабная работа по созданию региональных иммунологических нормативов. На основании оценки ключевых иммунологических показателей были построены иммунограммы, или (в графическом варианте) «иммунологические образы». Они отражали региональные особенности иммунного статуса здоровых людей, которые были сгруппированы в 8 основных типов: нормограмма, варианты с подавлением Т-, В-клеточного звена или обоих звеньев, с повышением или понижением уровня иммуноглобулинов, показателей врожденного иммунитета, равномерного повышения всех показателей. Закономерности распределения названных вариантов иммунограмм по географическим зонам пока неясны.

На этой основе было развернуто более детальное иммунологическое обследование населения экологически неблагоприятных регионов. Комплекс методов клиничко-иммунологического и лабораторно-иммунологического обследования позволяет сформировать группу риска развития иммунодефицитов, группу повышенного риска и, наконец, поставить клинический диагноз иммунопатологии с выделением четырех ведущих синдромов:

- инфекционного (критерий — наличие хронических рецидивирующих или повторяющихся острых инфекционных заболеваний);
- аллергического;
- аутоиммунного;
- иммунопролиферативного.

Наиболее достоверную информацию об иммунном статусе обследуемых удается получить в результате проведения иммунологического мониторинга — динамического слежения за состоянием иммунной системы выбранных групп населения обследованных контингентов с заданными интервалами (обычно от 1 до 5 лет). Опыт обследования населения десятков городов и регионов показал, что величина групп риска по иммунопатологии обычно колеблется от 2 до 8%, а групп повышенного риска — от 0 до 1,5%. При этом на долю иммунодефицита с инфекционным синдромом приходится 70–85%, аллергическим — 7–20%, аутоиммунным — 0–15% и иммунопролиферативным — 0–5%. Подобные обследования, помимо их непосредственно практического значения, служат основным способом выявления широкомасштабных закономерностей иммунотропного действия природных и антропогенных факторов, в частности, неблагоприятных для здоровья человека.

## **4.8. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ И ПРИНЦИПОВ ИММУНОЛОГИИ В ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ: ИММУНОДИАГНОСТИКА, ИММУНОПРОФИЛАКТИКА, ИММУНОТЕРАПИЯ**

### **4.8.1. Основы современной иммунодиагностики**

#### **4.8.1.1. Области использования иммунологических методов в клиничко-лабораторной практике**

Можно выделить 3 разновидности лабораторной деятельности, имеющей отношение к иммунологии:

- использование иммунологических методов для оценки неиммунологических показателей;
- использование любых (преимущественно иммунологических) методов для оценки иммунологических показателей с диагностической целью;
- определение иммунологических показателей для характеристики состояния иммунной системы (иммунного статуса).

Пример деятельности первого рода — широкое использование методов иммунохимического анализа для определения гормонов и других физиологически значимых молекул в сыворотке крови и других биологических субстратах. В последние десятилетия с этой целью используют практически исключительно количественные методы иммунолигандного анализа, в недалеком прошлом — радиоиммунологического, в настоящее время — иммуноферментного. С той же целью используют иммуноблоттинг и другие методические подходы. Преимущества иммунохимических методов состоят в специфичности, высокой чувствительности, относительной простоте и дешевизне (последнее уходит в прошлое в связи с дороговизной современной аппаратуры, предназначенной для регистрации результатов исследований). Это направление лабораторной диагностики имеет отношение к использованию иммунологических методов, но только иногда — к решению иммунологических (т.е. собственно иммунодиагностических) задач — при определении антител, цитокинов и других молекул, непосредственно участвующих в иммунологических процессах.

Другое направление использования лабораторных иммунологических методов — оценка иммунного статуса — также непосредственно не связано с иммунодиагностикой, хотя в большинстве случаев ее используют именно с диагностическими целями. Идея разграничения иммунодиагностики и оценки иммунного статуса принадлежит Б.В. Пинегину, который подчеркивает определенную «отрешенность» оценки иммунного статуса от задач иммунодиагностики. Оценку иммунного статуса применяют, когда необходимо всесторонне оценить состояние иммунной системы, например, при характеристике региональных особенностей иммунитета, его связи с HLA-генотипом, при выявлении эффектов экологических факторов среды без нацеленности на выявление конкретной иммунопатологии.

Иммунодиагностика в узком смысле этого слова направлена на решение задачи выявления (обычно, но не обязательно с использованием иммунологических методов) иммунологических нарушений, имеющих отношение к конкретной патологии у конкретного больного. Строго говоря, использование иммунодиагностики необходимо и оправдано лишь в тех случаях, когда ее результаты позволяют уточнить диагноз и повлиять на выбор тактики лечения. У больных можно оценивать иммунный статус, однако при этом к иммунодиагностике будут иметь отношение не все оцениваемые показатели. В связи с этим возникает проблема этической оправданности определения с помощью дорогостоящих методов иммунологических показателей, не облегчающих постановку диагноза и не вносящих вклад в совершенствование лечения.

#### 4.8.1.2. Методология лабораторной иммунодиагностики

Лабораторная иммунодиагностика до сих пор находится в периоде становления. Первоначально иммунологические тесты использовали (и доста-

точно широко) для диагностики инфекционных заболеваний, аллергопатологии, а также для типирования групп крови и тканевой совместимости. В 70-е годы прошлого века стали широко распространяться лабораторные методы характеристики популяций и субпопуляций лимфоцитов, а также определения концентрации сывороточных иммуноглобулинов и других гуморальных факторов, значимых с иммунологической точки зрения. Поводом для оценки этих показателей было желание оценить состояние иммунной системы больных (в типичных случаях — выявление иммунодефицитных состояний), а не диагностика активных иммунопатологических или инфекционных процессов, как это было ранее.

Ключевым событием, ускорившим прогресс в данной области, стала разработка простого подхода к выделению лимфоцитов (в связи с возможностью примесей выделяемые клетки обычно называют мононуклеарами), основанного на центрифугировании порций крови на слое смеси полисахарида фиколла и радиоконтрастного вещества верографина (другие наименования — гипак, пак); при этом эритроциты и сегментоядерные клетки, а также большинство моноцитов проходят этот слой и оседают на дно пробирки, а лимфоциты с примесью дендритных клеток и моноцитов формируют кольцо над плотным слоем фиколла-верографина. Арсенал средств и методов, первоначально использовавшихся для характеристики клеток иммунной системы (методы, основанные на розеткообразовании и т.д.), с современных позиций выглядит неадекватным. Только создание гибридной технологии и появление моноклональных антител, а затем и соответствующей приборной базы для выявления их связывания с клетками, позволило разработать адекватные подходы для идентификации клеток. Пока не создано четких стандартных подходов для всесторонней функциональной характеристики клеток иммунной системы и опосредуемых ими процессов. Не меньшей проблемой является способность врачей, занимающихся иммунодиагностикой, дать адекватную трактовку полученным результатам. Безусловной издержкой процесса внедрения иммунодиагностических методов в практическую медицину является их избыточное применение (характерное только для практики отечественной клинической иммунологии). Так, в соответствии с документами Всемирной организации здравоохранения, иммунофенотипирование клеток иммунной системы рекомендуется осуществлять только для диагностики СПИДа, первичных иммунодефицитов и лимфопролиферативных заболеваний. Между тем в отечественной практике определение иммунного статуса стало почти столь же универсальным диагностическим подходом, как клинические анализы крови и мочи, с несопоставимо более низкой информативностью.

Важная тенденция, характеризующая динамику методической базы иммунодиагностики, — переход от разнообразных по принципам, лежащим в их основе, слабоавтоматизированных и субъективных методов к комплексу высокостандартизированных подходов, сводимых к малому числу базисных технологических принципов. Так, в настоящее время иммунологические методы, используемые в клинической иммунологии, основаны почти исключительно на двух методических подходах: при определении гуморальных факторов — на иммуноферментном анализе, а при изучении клеток — на проточной лазерной цитофлуориметрии.

Метод иммуноферментного анализа имеет серьезную теоретическую базу и достаточно совершенное инструментальное оснащение. В настоящее время используют практически исключительно твердофазный вариант метода (ELISA — *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Его применяют в двух основных вариантах — конкурентном и двусайтовом. Конкурентный вариант обычно используют для определения антител к известным антигенам. В его основе лежит конкуренция за связывание с сорбированным антигеном меченых и немеченых (определяемых) антител: мерой концентрации оцениваемых антител служит степень подавления связывания меченых антител по сравнению с контролем, в котором конкурентные антитела заведомо отсутствуют. В качестве метки антител используют ферменты, чаще всего пероксидазу или щелочную фосфатазу, которые затем выявляют с помощью хромогенных субстратов. Двусайтовый вариант реакции обычно используют для определения антигена. Он основан на том, что антиген практически всегда несет более одного типа эпитопов. На пластиковую поверхность фиксируют антитела против одного эпитопа изучаемого антигена. Затем позволяют антигену связаться с этими антителами и наслаивают антитела, направленные против другого эпитопа («вторые антитела»). Связывание этих антител регистрируют с помощью антиизотипических антител, меченых пероксидазой или иными ферментами. В настоящее время с целью повышения чувствительности и стандартности все чаще вторые антитела метят стрептавидином, связывание которого затем выявляется с помощью биотина, конъюгированного с ферментом. Концентрация антигена (или второго антитела — в случае определения антител) пропорциональна связыванию ферментативной метки.

Метод проточной цитофлуориметрии зародился благодаря созданию прибора — лазерного проточного цитофлуориметра, позволяющего регистрировать с помощью лазерного луча параметры клеток, проходящих через капилляр. Параметры регистрируются автоматически и подвергаются компьютерной обработке, результаты которой визуализируются в виде графиков. Метод позволяет исследовать параметры, основанные на светорассеянии — прямом (размер клетки) и боковом (зернистость). На основании этих параметров строится двумерное распределение клеток, в котором может быть задана область (соответствующая клеткам конкретных типов, локализация которых в этом «поле» известна). Дальнейший анализ строится на выявлении связанных с клетками флуоресцентных красителей. Красителями метят моноклональные антитела или иные реагенты, позволяющие определять маркерные молекулы на поверхности клетки (а при дополнительной обработке клеток — и внутри нее). В зависимости от числа лазеров, которым снабжен прибор, варьирует число дифференцируемых цветов (в современных приборах >10). Метод позволяет идентифицировать различные типы клеток, оценить плотность экспрессии маркера и другие многочисленные параметры. На этом же принципе основано фракционирование клеток, экспрессирующих определенные молекулы.

В последнее время для определения иммунологически значимых факторов, в том числе при иммунодиагностике, все чаще стали прибегать к использованию методов молекулярной биологии, в первую очередь полимеразной цепной реакции. Наиболее широкое применение получил метод

качественной ПЦР при типировании HLA, особенно II класса. Однако все большее распространение получает количественный вариант полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией, что позволяет оценить уровень экспрессии генов, в том числе кодирующих иммунологически значимые молекулы.

Методы, позволяющие оценивать функцию клеток, более разнообразны и значительно слабее стандартизированы. Пока они только частично могут быть вписаны в охарактеризованные выше лабораторные технологии.

Подходы к оценке состояния врожденного и адаптивного иммунитета заметно различаются.

#### 4.8.1.3. Оценка состояния врожденного иммунитета

Для оценки состояния врожденного иммунитета применяют почти исключительно функциональные тесты, поскольку численность миелоидных клеток определяют с помощью элементарного анализа крови. Чаще других функций оценивают фагоцитарную активность клеток. Традиционно ее определяют микроскопически, в окрашенных мазках, с использованием в качестве фагоцитируемых частиц как микроорганизмов, так и инертных корпускул, например, частиц латекса. При этом вычисляют фагоцитарный индекс (процент клеток, осуществивших фагоцитоз тест-частиц) и фагоцитарное число (среднее число частиц, фагоцитированных клеткой). Такой подход в принципе адекватен, но он трудоемок, практически не поддается стандартизации и потому в значительной степени субъективен. Современные методы оценки фагоцитоза основаны на проточной цитометрии с применением объектов фагоцитоза (бактерий, частиц), меченых флуорохромами.

С функциональной точки зрения более значима оценка бактерицидности фагоцитов, которую раньше определяли с помощью теста на завершенность фагоцитоза. Основой теста служило определение степени снижения числа микроорганизмов, высеваемых из лизата фагоцитов. Естественное стремление к упрощению и стандартизации позволило разработать несколько вариантов метода, основанных на проточной цитометрии. Помимо этого давно используют косвенную оценку бактерицидного потенциала фагоцитов в реакции восстановления нитросинего тетразолия. Активность фагоцитов определяют по появлению синего окрашивания в результате отложения гранул формазана — продукта восстановления нитросинего тетразолия. Дальнейшее усовершенствование метода состояло в разработке способа оценки способности клеток генерировать активные формы кислорода, которые выявляли по выраженности хемолюминесценции, усиливаемой в присутствии люминофоров (люминола, люцигенина). Как правило, параллельно оценивается спонтанная и индуцированная различными стимуляторами люминолзависимая хемолюминесценция. Хемолюминесценцию регистрируют автоматически на специальном приборе — хемолюминометре.

К группе тестов, характеризующих активность клеток врожденного иммунитета, относят определение их способности секретировать провоспалительные цитокины (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и др.). Корректный вариант — постановка теста *in vitro* со стимуляцией лейкоцитов крови или выделенных макрофагов бактериальными стимуляторами (обычно ЛПС из *Escherichia coli*)

с последующим иммуноферментным определением цитокинов. Менее адекватно иммуноферментное определение цитокинов в сыворотке крови. При таком подходе невозможно разграничить процессы секреции и потребления цитокина, а также определить его происхождение.

Для характеристики состояния естественных киллеров параллельно используют функциональные тесты и определение численности клеток. Для идентификации NK-клеток обычно выявляют мембранные молекулы CD56 и CD16 методом проточной цитометрии с использованием соответствующих антител. Одновременно оценивают соотношение двух основных субпопуляций NK-клеток  $CD56^{lo}CD16^{+}$  и  $CD56^{hi}CD16^{-}$ . Опыт показывает, что для характеристики популяции естественных киллеров недостаточно подсчета этих клеток, а также их разнообразностей: требуется параллельно оценивать их функциональную активность (поскольку нередко случаи обратной корреляции численности и активности NK-клеток). Традиционный метод оценки функциональной активности естественных киллеров — радиометрическое определение выхода в среду  $^{51}Cr$ , предварительно введенного в клетки. Это достаточно точный и информативный метод, однако он неудобен в связи с необходимостью использования радионуклида, являющегося  $\gamma$ -излучателем, и поэтому сейчас его используют редко. Он заменен другим вариантом радиометрического метода, основанного на оценке ослабления включения  $^3H$ -уридина, предварительно введенного в клетки-мишени и выходящего из них при цитолизе. Будучи  $\beta$ -излучателем,  $^3H$ -уридин представляет меньшую опасность. Предложено несколько вариантов оценки гибели меченых флуорохромами клеток-мишеней, с помощью проточной цитометрии, которые пока не вытеснили радиометрические методы. Наиболее интересный и перспективный подход к цитофлуориметрической оценке цитотоксических клеток — метод, основанный на выявлении мембранной экспрессии молекулы CD107 (LAMP-1). Эта молекула в норме отсутствует на клеточной поверхности, но содержится на мембранах лизосом, включая цитотоксические гранулы цитотоксических лимфоцитов. При секреции цитотоксических гранул их мембрана сливается с клеточной мембраной, и молекула CD107 оказывается на поверхности клетки.

Еще одна группа показателей, характеризующих функциональный потенциал системы врожденного иммунитета, позволяет оценить состояние системы комплемента. Реакции, основанные на титровании комплемента с определением 50% гемолиза, не используют в связи с их громоздкостью. С помощью иммуноферментного анализа оценивают концентрацию в сыворотке крови основных компонентов комплемента, в первую очередь C3.

Фактически приведенными методами ограничивается спектр подходов к лабораторной характеристике системы врожденного иммунитета. Такая важнейшая функция, как антигенпрезентирующая, не входит в число определяемых показателей. Отсутствуют общепринятые лабораторные подходы к характеристике популяции дендритных клеток.

#### 4.8.1.4. Оценка состояния адаптивного иммунитета

В основе комплекса методов, предназначенных для оценки состояния адаптивного иммунитета, лежит определение реализующих его клеток. Для этого используют методы проточной цитометрии. Общепринято

использование с этой целью антител к маркерным антигенам, меченых флуорохромами. Суммарную популяцию Т-лимфоцитов тестируют с помощью моноклональных антител к CD3, а 2 их основные субпопуляции — с помощью антител к CD4 и CD8. Поскольку молекула CD3 — абсолютный маркер Т-лимфоцитов, то при определении CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток их параллельно окрашивают моноклональными антителами к CD3, так как молекулы CD4 и CD8 могут экспрессироваться не только Т-лимфоцитами. При этом применяют окрашивание антителами, мечеными контрастными флуорохромами (например, зеленым, оранжевым или розовым). Для выявления В-лимфоцитов довольствуются использованием антител к CD19 — молекуле, присутствующей на всех В-клетках и только на них. Антитела к тяжелым и легким цепям иммуноглобулинов используют редко, поскольку ни одна из разновидностей цепей не присутствует на всех В-клетках. Определение мембранных  $\kappa$ - и  $\lambda$ -цепей используют для оценки моноклональности В-лимфоцитов при лимфопролиферативных процессах.

В лабораторной практике функцию лимфоцитов оценивают редко, хотя, строго говоря, функциональные показатели важнее, чем показатели численности клеток. Игнорирование функциональной активности лимфоцитов связано с техническими проблемами, возникающими при постановке функциональных тестов, с их громоздкостью, трудоемкостью и дороговизной. Адекватный подход к суммарной оценке функционального потенциала (а не конкретной функции) — методы измерения пролиферативного ответа лимфоцитов (в основном Т-клеток) на митогенную стимуляцию. В качестве митогенов раньше использовали растительные митогенные лектины — фитогемагглютинин, реже конканавалин А, в настоящее время — активирующие моноклональные антитела к CD3 (оптимально — анти-CD3-антитела, фиксированные на пластике, в сочетании с растворимыми антителами к костимулирующей молекуле CD28). Все перечисленные митогены вызывают поликлональный митогенный ответ, который поддается достаточно точному измерению в отличие от олигоклонального ответа на конкретные антигены, интенсивность которого обычно ниже чувствительности используемых методов.

Пролиферацию чаще всего количественно оценивают по включению <sup>3</sup>Н-тимидина. Несмотря на неудобства, обусловленные использованием радионуклида, этот метод остается эталонным благодаря высокой чувствительности, способности выявлять достаточно тонкие изменения измеряемого показателя. Существует несколько альтернативных подходов, основанных на использовании проточной цитометрии, наиболее интересен из которых тест на разбавление флуоресцентной метки CFSE (*Carboxyfluorescein succinyl ester*). Этот флуорохром связывается с внутриклеточными белками клетки, не нарушая ее жизнеспособности и функциональной активности, и при делении в равных количествах переходит в дочерние клетки. При проточной цитометрии выявляют распределение меченых клеток в виде нескольких пиков, из которых правый (с максимальным содержанием красителя) соответствует неделившимся клеткам, а следующие за ним справа налево пики отражают численность клеток, делившихся 1, 2, 3 раза и т.д. Помимо возможности измерения числа клеток, прошедших определенное число делений, при условии выявления различных маркеров можно допол-

нительно охарактеризовать свойства клеток в каждом пике. Более простой цитофлуорометрический подход дает возможность суммарно определить долю клеток, находящихся в цикле, измеряя процент клеток с гипердиплоидным содержанием ДНК; для этого клетки окрашивают флуоресцентным красителем, связывающимся с ДНК — пропидия йодидом. Использование специально разработанных программ позволяет определить число клеток, находящихся в фазах цикла G1+S, G2, а также в митозе.

Иногда возникает необходимость оценить процент клеток, вступающих в апоптоз (что с определенной натяжкой также можно рассматривать как функциональную характеристику клеток). С этой целью используют вышеописанный цитофлуорометрический подход с окрашиванием клеток пропидия йодидом. Однако при этом определяют число клеток в гиподиплоидном пике, расположенном левее диплоидного (при апоптозе теряется часть ядерного материала, содержащего ДНК). Другой метод цитофлуорометрической оценки апоптоза состоит в определении связывания аннексина V, меченого флуорохромом. Этот реагент специфически взаимодействует с фосфатидилсеринном, который появляется на поверхности клетки только при апоптозе.

К функциональным тестам, позволяющим в определенной степени охарактеризовать реактивность клеточных клонов, относят тест торможения миграции лейкоцитов. Он основан на быстрой (после 20–30-минутной инкубации) регистрации *in vitro* ослабления миграции из капилляров лейкоцитов крови человека под влиянием комплекса цитокинов, секретируемых лимфоцитами или иными клетками. К достоинствам этого метода относят его чувствительность, быстроту выполнения и возможность стандартизации.

Оценка функциональной активности субпопуляций Т-лимфоцитов обычно не входит в программу лабораторного обследования больных. В особых случаях, когда подобная задача возникает, функцию Т-хелперов определяют по способности продуцировать цитокины. Для дифференцирования Th1- и Th2-клеток исследуемую популяцию лимфоцитов стимулируют сочетанным действием форболмиристат ацетата (неспецифический активатор протеинкиназы С) и иономицина (кальциевый ионофор), что обеспечивает ускоренную активацию клеток в обход антигенраспознающих рецепторов. Клетки обрабатывают брэфелдином А, блокирующим внутриклеточный транспорт молекул с участием аппарата Гольджи (включая процесс секреции) с целью сохранения внутри клетки синтезируемых молекул. Затем нарушают целостность клеточной мембраны путем обработки сапонином и инкубируют клетки с моноклональными антителами к цитокинам, меченым флуорохромом, после чего проводят проточную цитометрию. Обычно в клетках выявляют синтез ключевых цитокинов Th1- и Th2-клеток — соответственно IFN $\gamma$  и IL-4.

Чаше, особенно зарубежные специалисты, оценивают секрецию Th1-клетками IFN $\gamma$  с использованием метода ELISPOT (*Enzyme-linked immunospot*). В этом случае клетки инкубируют на нитроцеллюлозной мембране, сенсibilизированной антителами к IFN $\gamma$  (или другому определяемому цитокину — в зависимости от задач исследования) в присутствии стимулятора и затем с помощью иммуноферментного метода определяют фиксацию секретированного цитокина на нитроцеллюлозной мемб-

ране (секретируемый IFN $\gamma$  связывается с фиксированными антителами и может быть обнаружен с помощью вторых антител, меченых пероксидазой). Число окрашенных пятен, соответствующих клеткам, секретирующим цитокин, подсчитывают с помощью специального прибора или под микроскопом. Этот метод широко используют также для отбора Т-клеточных эпителий при создании вакцин.

Функцию цитотоксических Т-лимфоцитов определяют с помощью тех же подходов, которые используют для функциональной оценки НК-клеток. Однако получение данных сильно осложняется, во-первых, необходимостью предварительной индукции активности этих клеток в смешанной культуре лейкоцитов, а во-вторых, очень малой частотой антигенспецифических Т-клеток в популяции. В рутинной лабораторной практике определение этих клеток не проводят.

В арсенале методов лабораторной оценки адаптивного звена иммунной системы отсутствуют тесты на состояние специфического гуморального иммунитета, хотя теоретически антителообразующую способность клеток В-ряда можно оценивать с использованием ELISPOT. Однако для индукции антителообразования *in vitro* необходимы усилия, трудновыполнимые даже при научных исследованиях. Именно поэтому подходы к оценке состояния гуморального иммунитета ограничиваются определением концентрации иммуноглобулинов основных классов, для чего используют иммуноферментный метод. Менее предпочтителен используемый до сих пор метод радиальной иммунодиффузии, основанный на оценке диаметра кольца преципитации, формирующегося при диффузии исследуемых белков в агар, содержащий антитела к определяемому иммуноглобулину. Реже определяют естественные антитела к распространенным бактериальным антигенам и маркерам групп крови. Для выявления пролиферативного потенциала В-лимфоцитов оценивают их пролиферативный ответ на действие митогена лаконоса — растительного лектина, вызывающего Т-зависимую поликлональную пролиферацию В-клеток.

Тесты *in vivo* практически не используют при лабораторной иммунодиагностике в связи с их инвазивностью. Следует назвать лишь пробы с внутрикожным введением комплекса распространенных антигенов (кандидозный антиген, стрептокиназа-стрептодорназа, туберкулин и другие антигены; в качестве варианта вводят митогены или гаптены, например, динитрохлорбензол). Результаты тестирования оценивают по интенсивности воспалительной реакции, развивающиеся в местах введения. Такие тесты информативны, поскольку адекватно отражают функциональное состояние популяции Т-лимфоцитов (например, при первичных иммунодефицитах) и коррелируют с исходом некоторых патологических процессов, в том числе опухолевых. Тем не менее в связи с инвазивным характером воздействия эти подходы используют достаточно редко.

Резюмируя краткий обзор арсенала методов иммунодиагностики, подчеркнем его ограниченность и несопоставимость по степени информативности и однозначности при трактовке результатов с методами диагностики, сложившимися в других областях медицины. Ситуацию усугубляет часто неадекватная трактовка результатов иммунологического обследования, обусловленная ограниченностью иммунологических знаний во врачебной среде.

### 4.8.2. Иммунопрофилактика

Иммунологические принципы реализуются в профилактике инфекционных заболеваний и иммунозависимой патологии в форме вакцинации. Наиболее длительную и богатую историю имеет вакцинация с целью предупреждения инфекционных заболеваний. С разработки первых подходов к предупреждению инфекционных заболеваний более тысячелетия тому назад началась предыстория иммунологии, а в конце XIX века успешное создание методов вакцинации породило иммунологию как самостоятельную научную дисциплину.

#### 4.8.2.1. Вакцинация против возбудителей инфекционных заболеваний

В главе 1 кратко рассмотрена предыстория иммунологии, однозначно сводимая к истории вакцинации. Около 3 тыс. лет назад впервые письменно упомянуто предупреждение заболевания оспой путем ее прививки, многие столетия использовавшееся (в основном в Азии) в форме вариоляции. В конце XVIII в. Э. Дженнер разработал безопасный и надежный метод профилактики оспы путем вакцинации — прививки материала, содержащего инфекционный агент коровьей оспы. В 1880 г. Л. Пастер разработал (на примере холеры кур) общие принципы вакцинации с использованием живой ослабленной вакцины. В результате целенаправленного «ослабления» вируса бешенства была получена вакцина, защищающая людей от поражения этим вирусом при заражении в результате укусов животных. После этого деятельность по созданию и использованию вакцин стала непрерывной и кодифицировалась законами.

Первоначальный смысл понятия «вакцина» заключен в следующем определении. **Вакцинами называют препараты, предназначенные для формирования иммунологической памяти и протективного иммунитета к антигенам возбудителей, минуя стадию инфекционного заболевания. Вакцинацией называют способ создания протективного иммунитета с помощью вакцин.** Расширенное употребление термина «вакцины» (в отношении препаратов с противоопухолевой, противоаллергической активностью или направленных на лечение аутоиммунных заболеваний) заставляет несколько изменить акценты. В этом, новом смысле под вакцинами следует понимать препараты, содержащие антигенный материал, направленные на предотвращение и лечение инфекционных, опухолевых процессов, а также проявлений гиперчувствительности путем индукции эффекторных клеток и клеток памяти, оказывающих защитное действие. В этом разделе речь пойдет о противоинфекционных вакцинах.

Различают несколько разновидностей вакцин, характеристики которых представлены в табл. 4.22. Исходный вариант вакцин, введенный в практику Л. Пастером, представляет живые аттенуированные (ослабленные) вакцины. Пастер использовал для этого культивирование в неблагоприятных условиях. Очевидно, причиной ослабления вирулентности послужили серии мутаций, обеспечивавших приспособление микроорганизма к измененной среде обитания с утратой качеств, которые в этих условиях не давали преимуществ (патогенности, вирулентности). Такие вакцины, как правило, эффективны, но всегда существует опасность реверсии с восстановлением патогенности и вирулентности. Кроме того,

при ослабленном иммунитете (например, при первичных иммунодефицитах у детей) даже аттенуированные патогены могут вызвать инфекционный процесс. Вариант такого подхода — противооспенная вакцина Э.Дженнера, полученная на основе вируса коровьей оспы, который у человека вызывает слабовыраженное заболевание, но, в силу перекрестной антигенной реактивности, обеспечивает иммунитет против вируса человеческой оспы.

**Таблица 4.22.** Разновидности вакцин

Тип вакцины	Характеристика	Примеры
Живые ослабленные (аттенуированные)	Вирулентность патогенов снижена разными способами, в частности культивированием в неблагоприятных условиях. Вакцины эффективны, но сохраняют опасность реверсии	Вакцины против оспы, краснухи, кори, полиомиелита (вакцина Сэбина), герпеса, БЦЖ
Убитые	Патогены убиты различными способами (формалином и др.). Вакцины менее эффективны, чем живые	Вакцины против бешенства, тифа, холеры, полиомиелита (вакцина Солка), коклюша
Антитоксические	Анатоксин, или токсид (инактивированный токсин) в сочетании с адъювантом	Вакцины против дифтерии, столбняка
Синтетические	Синтетический эпитоп, конъюгированный с иммуногенным носителем или адъювантом	Вакцины против сальмонеллеза, йерсиниоза, ящура, гриппа
Рекомбинантные	Основаны на использовании методов молекулярной генетики. Выделенный ген протективного антигена вводят в безопасный вектор. Гены вирулентности удаляют с сохранением протективных генов и т.д.	Вакцины против гриппа, герпеса, везикулярного стоматита и т.д.
ДНК-вакцина	Плазмиду, содержащую ген протективного антигена, вводят в мышцу, в клетках которой он экспрессируется	Вакцины против гепатита В
Идиотипические	Вместо антигена используют антиидиотипические антитела, воспроизводящие конфигурацию эпитопа	Экспериментальные вакцины

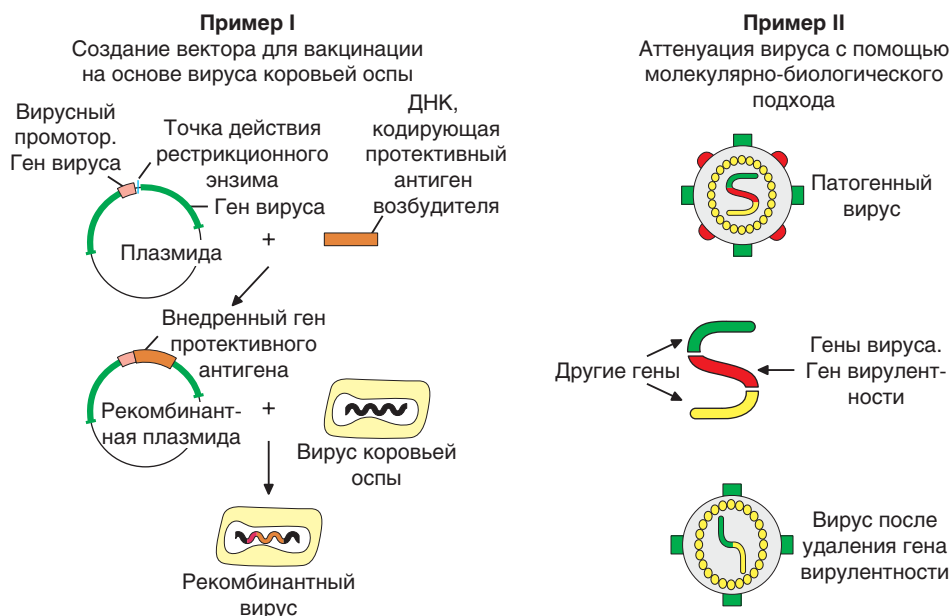
Другой распространенный вид традиционных вакцин — убитые вакцины — предложен Р. Пфедфером (*R. Pfeiffer*) и У. Колле (*W. Kolle*) также в конце XIX века. Убитые вакцины в принципе не могут вызвать инфекционных осложнений, но они могут быть токсичны, аллергенны и иметь другие побочные эффекты, обычно обусловленные примесями. Метод, применяемый для того, чтобы убить патогены, не должен вызывать инактивацию протективных антигенов. Такие вакцины используют для профилактики сальмонеллеза, брюшного тифа и ряда других заболеваний, особенно вызываемых внеклеточными патогенами. Убитые вакцины более безвредны, но, как правило, менее эффективны, чем ослабленные, что связано с отсутствием самоподдержания микробных клеток.

Логическое развитие принципа использования убитых микроорганизмов — их фракционирование и включение в вакцинный препарат субклеточных компонентов, содержащих протективные антигены (субъединичные вакцины). Следующим шагом на этом пути стало создание химических вакцин путем выделения активных молекул или их химического синтеза.

Вариант вакцин — препараты на основе продуктов микроорганизмов — токсинов, предназначенные для их инактивации. В интактном виде использовать токсины невозможно в связи с их токсичностью. Для вакцинации применяют анатоксины — токсины, инаktivированные обработкой формалином или иными агентами, устраняющими токсичность с сохранением антигенности. Широко распространена вакцинация дифтерийным, столбнячным и другими анатоксинами. Нередко вакцинные препараты содержат комбинацию из вакцин против различных возбудителей и их анатоксинов; при таком комбинировании может происходить взаимное усиление (адъювантность) отдельных компонентов вакцин. Классический пример такой комбинации — вакцина АКДС, содержащая дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин и убитые *Bordetella pertussis*.

В последние десятилетия наметились коренные изменения в подходах к способам создания вакцин. Наиболее перспективным выглядит направление, основанное на использовании генно-инженерных подходов. Это позволяет, предварительно «разобрав» гены возбудителя, исключить из генома гены вирулентности и сохранить гены, кодирующие протективные антигены (рис. 4.52). В качестве вектора, в который вводят переконструированные гены, часто используют вирус осповакцины, сам по себе способствующий формированию гуморального и клеточного иммунного ответа.

Другой способ создания вакцин нового типа состоит в конструировании комплекса полностью синтетических субъединиц, одни из которых несут В-клеточные эпитопы, другие служат источником Т-клеточных эпитопов, а третьи отвечают за активацию клеток врожденного иммунитета. При этом структуру В-эпитопов могут воспроизводить синтетические пептиды или полисахариды, сами по себе не иммуногенные, но приобретающие эти свойства в комбинации с другими компонентами системы. При всей рациональной безукоризненности таких подходов для них характерна более слабая иммуногенность, чем для традиционных вакцин. Очевидно, это результат неполноты знаний о природе антигенности и иммуногенности, в связи с чем конструируемые таким образом вакцинные препараты



**Рис. 4.52.** Использование молекулярно-биологических подходов для создания вакцинных препаратов. Приведены примеры использования молекулярной инженерии для конструирования вакцин. Пример I иллюстрирует создание рекомбинантной вакцины. Сначала формируют плазмиду — путем внедрения гена, кодирующего антиген, под промотор другого гена, что дает преимущества при дальнейших манипуляциях. Полученную плазмиду внедряют в «нейтральный» вирус, в качестве которого обычно используют вирус коровьей оспы, используемый как носитель. Получаемый рекомбинантный вирус применяют как основу рекомбинантной вакцины. Пример II иллюстрирует принцип модификации генов возбудителя (обычно вируса) с целью лишения его вирулентности. Для этого гены вируса «разбирают», удаляют гены вирулентности и снова «собирают». В результате устраняются отрицательные эффекты вируса с сохранением его антигенов, обеспечивающих протективный эффект вакцины

не содержат некоторых, пока неизвестных компонентов, обязательных для обеспечения иммуногенности в полной мере. По мере пополнения знаний в этой области будут совершенствоваться вакцины такого рода. Так, недавно установленный факт зависимости адаптивного иммунного ответа от стимуляции врожденного иммунитета «образами патогенности» (PAMP) уже сейчас учитывается при построении новых вакцинных препаратов.

#### **Адьюванты**

Проблему усиления иммуногенности вакцин, а также препаратов, используемых в экспериментальной практике, обычно решают с помощью использования адьювантов — веществ, усиливающих иммунный ответ при введении одновременно с иммуногенами. Данные по адьювантам представлены в табл. 4.23. Различают несколько групп адьювантов — минеральные (алюминиевые квасцы —  $Al(OH)_3$  и др.), растительные (сапонины), микроб-

ные (ЛПС, полисахариды, пептидогликаны, CpG-содержащие нуклеиновые кислоты, ослабленные микроорганизмы — БЦЖ, и т.д.), синтетические (полиэлектролиты и т.д.), цитокины, комплексные транспортные системы (липосомы, ISCOM и т.д.).

Таблица 4.23. Адъюванты

Название	Примеры	Состав	Механизм действия	Преобладающий тип ответа
Минеральные	Алюминиевые квасцы	Соли или гидроокись алюминия и кальция	Депонирование, усиление фагоцитоза	Th2-зависимый
Масляные эмульсии	MF59, MPL, AS, полный и неполный адъюванты Фрейнда	Вазелиновое масло, ланолин, эмульгатор (адъюванты Фрейнда; в полном адъюванте — содержится микобактерии)	Депонирование, стимуляция через паттернраспознающие рецепторы	Th1- (полный адъювант Фрейнда), Th2-зависимый (неполный адъювант Фрейнда)
Липидные	Липосомы, ниосомы, иммуностимулирующие комплексы	Липидные частицы различного состава, в которые введен антиген	Направленная доставка антигена в клетки, например в цитотоксические Т-лимфоциты при использовании иммуностимулирующих комплексов	Цитотоксический, Th1-зависимый
Наночастицы	Дендримеры, полимерные наночастицы	Наночастицы различных конструкций, в которые включен антиген	Векторная доставка антигена в клетки	Th1- и Th2-зависимый
Вирусоподобные частицы	На основе различных вирусных векторов	Вирус без генетического материала, содержащий антиген	Векторная доставка антигена в клетки	Th1-зависимый, цитотоксический

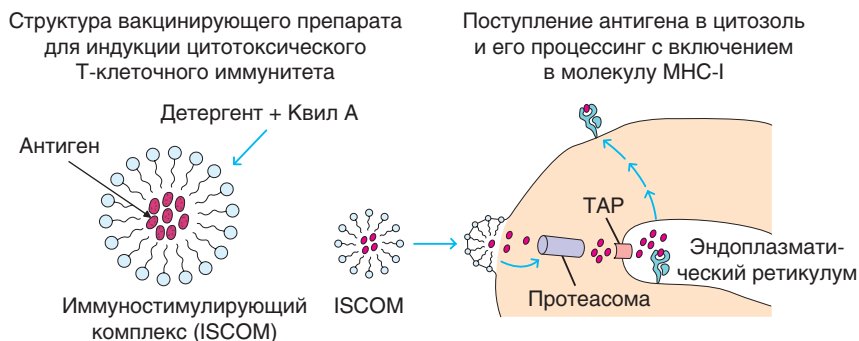
Можно выделить несколько механизмов усиливающего действия, в разных комбинациях реализуемых в различных адъювантах. Это формирование депо антигена, удлиняющего срок его воздействия на иммунную систему, оптимальная доставка антигена, прямое стимулирующее действие на клетки иммунной системы и т.д. Однако с современных позиций важнейшим пред-

ставляется комплекс механизмов, обеспечивающих развитие воспаления и стимуляцию механизмов врожденного иммунитета, особенно активности АПК, что в конечном счете стимулирует презентацию антигена Т-лимфоцитам. Относительный вклад этого комплексного механизма и формирования депо в обеспечение адьювантных свойств препаратов наглядно иллюстрируют эффекты неполного и полного адьювантов Фрейнда. Первый представляет смесь ланолина, вазелинового масла и эмульгатора, второй содержит эти же компоненты, но с добавлением БЦЖ — вакцинного штамма микобактерий (*Micobacterium bovis*). Для эффективной индукции первичного иммунного ответа обычно используют полный адьювант Фрейнда, для поддержания высокого уровня ответа на повторные иммунизации — неполный адьювант Фрейнда. Наиболее ответственный и «трудный» этап в развитии иммунного ответа — презентация антигена наивным Т-клеткам, осуществление которой невозможно без предварительной стимуляции клеток врожденного иммунитета, прежде всего дендритных клеток. Вероятно, реализации этой функции способствует воздействие на иммунную систему БЦЖ. После преодоления этого этапа вполне достаточным оказывается правильное дозирование антигена, медленно и длительно поступающего из депо, создаваемого липидной составляющей адьюванта.

Состав адьюванта определяет не только общий иммуностимулирующий эффект, но и тип индуцируемого иммунного ответа (гуморальный или клеточный, опосредованный CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клетками). Так, использование провоспалительных стимулов (БЦЖ, другие микроорганизмы, вводимые в адьювант) способствует развитию воспалительной формы Т-клеточного ответа, опосредованной Th1-клетками. Усиление тимусзависимого гуморального иммунного ответа, опосредованного Th2-клетками, при этом также происходит, но его в большей степени стимулируют минеральные адьюванты, например, алюминиевые квасцы. Для усиления CD8<sup>+</sup> Т-клеточного ответа необходимо создавать условия, благоприятствующие проникновению антигена в цитозоль, что обеспечивает его включение в молекулы МНС-I, презентующие пептидный эпитоп CD8<sup>+</sup> Т-клеткам. Таким адьювантом служат комплексы ISCOM (*Immune stimulatory complexes*), в которых антигены (в типичном случае вирусные) связаны с мицеллами гликозида Quil A в составе везикул, обеспечивающих трансмембранное проникновение антигена в цитозоль (рис. 4.53). Для облегчения доставки антигена в эндосомальный компартмент используют липидные пузырьки — липосомы, заполненные антигенным материалом.

Адьюванты нередко включают в состав вакцин для усиления иммуногенности последних — при обязательном условии их безвредности. В связи с этим не все адьюванты разрешено включать в вакцины. Чаще всего с этой целью используют квасцы. Применение адьювантов Фрейнда — наиболее сильных адьювантов — запрещено в связи с их сильной реактогенностью.

В 70-е годы прошлого века Р.В. Петровым и Р.М. Хаитовым был разработан принцип создания полностью синтетических вакцин на основе пептидов, конъюгированных с носителем, который представляет собой адьювант. Первоначально в роли адьювантов использовали полиэлектролиты, но проблемы, связанные с их побочными эффектами, а также низкой деградируемостью определили выбор другого адьюванта — полиоксидония, син-



**Рис. 4.53.** Проникновение вакцинирующего антигена в цитозоль благодаря использованию адъюванта группы ISCOM. Внедрение антигена в комплекс ISCOM обеспечивает его введение непосредственно в цитозоль, что облегчает встраивание антигенных эпитопов в молекулы МНС-I и развитие цитотоксического иммунного ответа

тезированного в 80-е годы А.В. Некрасовым. Полиоксидоний (азоксимера бромид) представляет сополимер (N-окси)-1,4-этиленпиридина и (N-карбоксо)-1,4-этиленпиперазинбромида. Его используют как самостоятельно в виде адъюванта, так и в составе вакцин. Наиболее известна вакцина против гриппа Гриппол, разработанная в 1988 г. Это полимер-субъединичная вакцина, которая содержит гемагглютинин и нейраминидазу вирусов гриппа А (H1N1, H3N2) и В, конъюгированные с полиоксидонием.

Существует еще несколько разновидностей современных вакцин, которые, однако, пока не нашли широкого практического применения, хотя их очень интенсивно исследуют в экспериментальных моделях. Одна из таких разновидностей — ДНК-вакцины. Они представляют бактериальные векторы, содержащие гены протективных антигенов, против которых нужно индуцировать иммунитет. Вакцины вводят в мышцу, в клетках которой происходит экспрессия генов и синтез антигенных белков. Механизмы реализации этих процессов в мышцах не до конца раскрыты.

Наконец, есть довольно экзотический вариант создания вакцин на основе антиидиотипических антител. Рассматривая природу идиотипии и ее роль в регуляции гуморального иммунного ответа, был отмечен факт, что при максимально возможном совпадении структур активного центра антител и идиотопа конфигурация активного центра антиидиотипических антител и эпитопа должны совпадать. Именно поэтому, когда использование нативных молекул патогенов по той или иной причине затруднено, теоретически можно применять вместо них антиидиотипические антитела. На этой основе создана вакцина против вируса гепатита В, однако ее эффективность оказалась невысокой. Антиидиотипические вакцины до сих пор остаются примером скорее остроумного движения мысли исследователей, чем реальным инструментом противoinфекционной защиты.

Вакцины — медицинские препараты, предназначенные для массового использования преимущественно у детей. В связи с этим существуют достаточно жесткие требования к вакцинным препаратам:

- наличие доказанного защитного эффекта — вакцины должны предотвращать развитие инфекционных заболеваний после заражения, эффект должен быть длительным (годы);
- безвредность — вакцина сама по себе не должна вызывать патологических эффектов;
- дешевизна;
- стабильность;
- простота использования.

Вакцинация — узаконенная процедура (с учетом ограничений по медицинским показаниям). В нашей стране действует закон от 1998 г. «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней человека», в котором констатируется, что вакцинация составляет часть государственной политики в области здравоохранения. В нем оговорены правила проведения плановых прививок и прививок по эпидемиологическим показаниям. Во всех странах имеются календари прививок, содержащие перечни вакцин, предназначенных для плановой массовой вакцинации населения и правила их использования. В России календарем прививок предусмотрено проведение плановых прививок с применением 7 вакцин против 11 инфекционных заболеваний (табл. 4.24).

**Таблица 4.24.** Вакцины календаря обязательных прививок Российской Федерации (по Медуницын Н.В. Вакцинология. — М., 1999)

Вакцина	Природа антигена	Форма вакцины	Наличие адъюванта	Наличие стабилизаторов, консервантов	Природа иммунитета
БЦЖ	Аттенуированные живые <i>Micobacterium bovis</i>	Сухая	Нет	Нет	Клеточный
АКДАС	Дифтерийный анатоксин; столбнячный анатоксин; убитые <i>Bordetella pertussis</i>	Жидкая	Al(OH) <sub>2</sub>	Мертиолят (консервант)	Гуморальный и клеточный
Полиомиелитная	Аттенуированные живые вирусы трех типов	Жидкая	Нет	Стабилизаторы	Гуморальный
Коревая	Аттенуированный живой вирус	Сухая	Нет	Антибиотики, стабилизаторы	Гуморальный

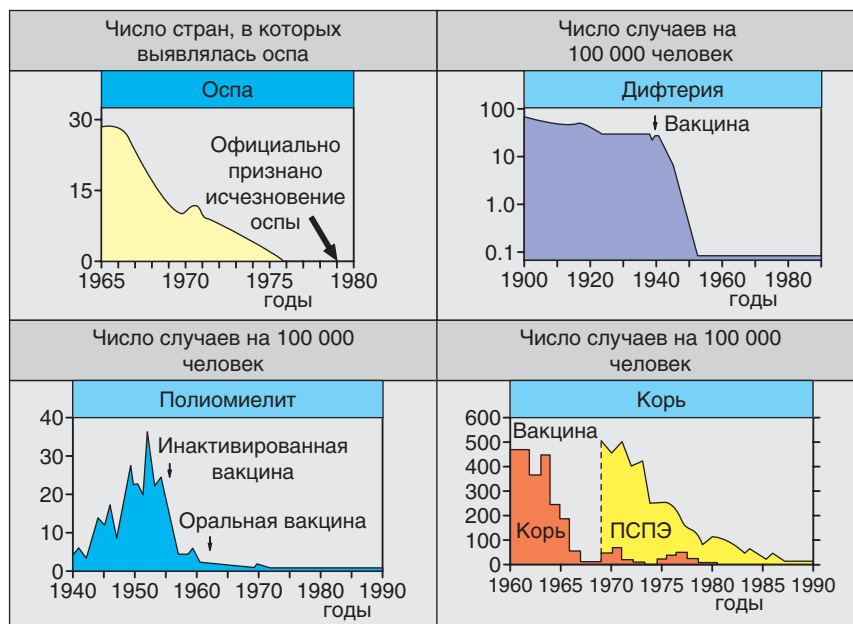
Окончание табл. 4.24

Вакцина	Природа антигена	Форма вакцины	Наличие адьюванта	Наличие стабилизаторов, консервантов	Природа иммунитета
Паротитная	Аттенуированный живой вирус	Сухая	Нет	Антибиотики, стабилизаторы	Гуморальный
Против гепатита В	HBs-антиген	Жидкая	Al(OH) <sub>2</sub>	Мертиолят (консервант)	Гуморальный
Против краснухи	Аттенуированный живой вирус	Сухая	Нет	Антибиотики, стабилизаторы	Гуморальный

Первичную плановую иммунизацию осуществляют в различные сроки на протяжении первых лет жизни. Вакцину БЦЖ и вакцину против гепатита В вводят в первые дни после рождения, АКДАС — в возрасте 3 мес, противовирусные вакцины — через 12–15 мес после рождения (раннее эффекту вакцинации препятствуют антитела материнского происхождения, присутствующие в сыворотке крови ребенка). Первую иммунизацию проводят в виде 2–3 инъекций с интервалом 4 нед. Через несколько лет осуществляют бустерную иммунизацию, предназначенную для поддержания и усиления эффекта первой вакцинации. Основной путь введения вакцин — подкожный (реже внутримышечный). Значительные усилия прилагают для создания мукозальных (пероральных, назальных и т.д.) вакцин. Дозы вакцин и интервалы между введениями строго регламентированы.

Побочное действие вакцин может состоять в недомогании, умеренном повышении температуры, местных реакциях, реже развивается расстройство сна, боли в суставах, головная боль, рвота, обмороки. В большинстве случаев побочные реакции вызывают примеси, содержащиеся в вакцинных препаратах. Однако часть из них связана с действием провоспалительных факторов, неотделимых от активной составляющей вакцин. Так, реактогенность вакцины АКДАС обусловлена ее коклюшным компонентом. Более тяжелые последствия вакцинации квалифицируют как осложнения. Особую группу побочных эффектов образует поствакцинальный инфекционный процесс, обусловленный живыми ослабленными патогенами. Осложнения вакцинации разделяют на три группы — токсические, аллергические и поражение нервной системы. В единичных случаях (примерно 1:1 000 000) они могут вызвать гибель вакцинированных. Противопоказаниями к вакцинации служат иммунодефицитные состояния, осложнения и сильные реакции на предыдущую вакцинацию, аллергия к вакцинным препаратам.

Единичные осложнения вакцинаций и даже крайне редкие случаи смертельного исхода несопоставимы с поистине глобальным положительным эффектом. Вакцинации сделали современный цивилизованный мир практически свободным от смертоносных эпидемий и резко снизили смертность от инфекционных заболеваний, особенно в детском возрасте.



**Рис. 4.54.** Последствия успешной вакцинации против оспы, полиомиелита и кори. Внедрение адекватных методов вакцинации приводит к резкому снижению как случаев заболеваний, непосредственно вызываемой патогеном, так и осложнений от этих заболеваний (см. вариант с корью; ПСПЭ — подострый склерозирующий панэнцефалит)

На рис. 4.54 приведены графические иллюстрации, свидетельствующие о непосредственной связи резкого снижения частоты ряда инфекционных заболеваний (а также — в случае кори — и их типичных осложнений) сразу после начала широкого применения вакцин. Благодаря вакцинации ликвидировано одно из особо опасных инфекционных заболеваний — оспа. Однако до сих пор существуют инфекции, в том числе и особо опасные, против которых эффективные вакцины не разработаны. К ним относят чуму, сифилис, гонорею, малярию, проказу, СПИД и др.

#### **Вакцина против СПИДа**

Наиболее актуальная и одновременно трудная задача вакцинологии — создание вакцины против СПИДа. Два обстоятельства резко затрудняют решение этой задачи:

- чрезвычайно высокий темп мутирования белков ВИЧ, особенно поверхностных, которые могут служить оптимальной мишенью для антител и эффекторных Т-лимфоцитов;
- поражение при СПИДе  $CD4^+$  Т-лимфоцитов — центральных клеток адаптивного иммуногенеза.

Определенные надежды на успех получения вакцин против СПИДа порождают данные, свидетельствующие о случаях резистентности к заражению и формирования у ВИЧ-инфицированных иммунитета, достаточного для замедления прогрессии заболевания. В пользу возможности создания

эффективных вакцин против СПИДа свидетельствуют также случаи успешной вакцинации обезьян, обеспечивающие устойчивость к вирусам SIV и SHIV (соответственно, обезьяний и рекомбинантный обезьяний/человеческий вирусы). Тем не менее проблематичность решения данной задачи в каждом конкретном случае подчеркивает сам термин, используемый для обозначения создаваемых вакцин — «кандидатные вакцины».

При разработке кандидатных вакцин против СПИДа используют стратегию, направленную на решение двух задач (отдельно или в сочетании) — индукции эффективных нейтрализующих антител или развитие Т-клеточного ответа (как правило, на основе цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов), способного если не элиминировать, то сдерживать инфекцию. Наиболее привлекательным для построения вакцин было использование консервативных эпитопов (например, сайта связывания с корцептором или консервативных эпитопов белка gp41), однако проблема осложняется слабой доступностью этих эпитопов для действия нейтрализующих антител. На современном этапе разработки вакцины отрабатывают пути создания как лечебных, так и профилактических вакцинных препаратов.

Процесс создания и испытания вакцин против СПИДа осуществляется под контролем Глобального вакцинного центра (*Global HIV/AIDS vaccine enterprise*). Большинство кандидатных вакцин имеют в качестве основы ДНК-вектор или рекомбинантные белки и их комбинации. Чаще всего в них воспроизводятся эпитопы белков **Gag** и **Pol**. Живые аттенуированные вакцины, показавшие наибольшую эффективность на обезьянах, не могут быть использованы на людях из соображений безопасности. Для индукции Т-клеточного иммунитета применяют подходы, основанные на использовании дендритных клеток, нагруженных антигенами. В состав таких вакцинных препаратов вводят компоненты, стимулирующие (через TLR и другие патогенраспознающие рецепторы) врожденный иммунитет. Широко используют различные адъюванты, в том числе новые. Значительная часть кандидатных вакцин основана на использовании ДНК-плазмид.

В процессе доклинического испытания вакцин очень большое внимание уделяют отработке оптимальных моделей на животных с заражением ВИЧ, а также методов тестирования различных звеньев иммунитета. Экспериментальный анализ позволил избрать в качестве оптимального способа иммунизации схему «прайм-буст», т.е. двукратное введение вакцины, причем на первом и втором этапах могут быть использованы разные препараты. Как правило, праймирование осуществляется введением ДНК-вакцины, а бустирование — введением рекомбинантного белка.

К концу 2007 г. 31 кандидатная вакцина прошла I (или I/II) этап и пять вакцин — II или II и III этапы клинических испытаний.

В ряду испытываемых вакцин следует назвать отечественную кандидатную вакцину ВИЧРЕПОЛ, созданную совместными усилиями Института иммунологии ФМБА и Института вирусологии РАМН (Москва) в ходе выполнения научной программы «Вакцины нового поколения и медицинские диагностические системы будущего». Основой вакцины служит химерный рекомбинантный белок гес, содержащий последовательности полноразмерного внутреннего белка p24 (продукт гена **Gag**) и иммунореактивный фрагмент белка gp41 (продукт гена **Env**). Присутствие в вакцине эпитопа gp41

рассчитано на индукцию нейтрализующих антител, а наличие эпитопа р24 — на развитие Т-клеточного иммунного ответа. В качестве адъюванта вакцина содержит полиоксидоний (см. раздел 4.8.3.1) — полимерный иммуномодулятор, с которым конъюгирован антиген. Доклинические испытания констатировали способность вакцинного препарата индуцировать сильный гуморальный иммунный ответ с образованием антител, взаимодействующих с эпитопами, содержащимися в препарате, и содержащими их белками ВИЧ. Клинические испытания вакцины начаты в 2006 г.

В России созданы и испытываются еще две вакцины против СПИДа — КомбиВИЧвак (инъекционная форма) и САЛ-ВИЧ (суппозиторий для мукозальной иммунизации), разработанные в Центре вирусологии и биотехнологии «Вектор». КомбиВИЧвак представляет собой вирусоподобную частицу, внутри которых содержится плазмиды рсDNA-TCI (кодирует несколько эпитопов ВИЧ), а на поверхности — белок TBI, содержащий 4 Т-эпитопа и 5 В-эпитопов, присутствующих в разных белках ВИЧ. САЛ-ВИЧ представляет аттенуированные клетки *Salmonella enteritidis*, содержащие плазмиду рсDNA-TCI.

#### ***Противоопухолевые профилактические вакцины***

Создание профилактических противоопухолевых вакцин — реальная цель иммуноонкологов. До недавнего времени работа в этом направлении не выходила за рамки экспериментальных исследований. Недавно создана первая профилактическая противоопухолевая вакцина — вакцина против папилломавируса, предотвращающая развитие рака шейки матки. Таким образом, фактически эта вакцина в равной степени относится к инфекционной и онкологической областям и создана по правилам, разработанным для других противовирусных вакцин. Тем не менее ее предназначение коренным образом отличается от целей традиционных вакцин, поскольку она участвует в предупреждении развития не инфекционного заболевания, а опухоли.

Вакцинацию осуществляют в виде инъекций вакцинного препарата девочкам в возрасте 12–13 лет (в некоторых странах возраст первой вакцинации — 9 лет). В последние годы вакцинацию против папилломавируса стали осуществлять и в России. Пока она не входит в разряд обязательных.

#### **4.8.3. Иммунотерапия**

Под иммунотерапией понимают использование принципов и методов иммунологии при лечении заболеваний. Выделяют 2 основных подхода к иммунотерапии:

- медикаментозная иммунотерапия;
- иммунобиотерапия.

Медикаментозная иммунотерапия предполагает использование фармакологических препаратов, точнее определенных групп этих препаратов, действующих на иммунную систему — иммуностимуляторов (иммуномодуляторов) и иммунодепрессантов. Биотерапия — более новое направление терапии, основанное на использовании с лечебной целью агентов биологической природы, преимущественно получаемых с помощью современных

биотехнологий — моноклональных антител, рекомбинантных цитокинов, молекул, созданных с помощью генной инженерии, а также клеток, как правило, клонированных.

#### **4.8.3.1. Медикаментозная иммунотерапия**

Потребность в медикаментозном усилении или ослаблении иммунитета продиктована характером изменений иммунитета при патологии. Очевидно, что при иммунодефицитах необходима иммуностимуляция, а при патологии, основанной на гиперчувствительности, — иммуносупрессия. Задача подавления иммунитета стоит также при аллотрансплантации органов и тканей.

##### ***Иммуномодуляторы***

Несколько модифицируя схему Б.В. Пинегина, выделим следующие группы иммуномодулирующих средств.

##### **I. Препараты на основе природных факторов:**

- 1) препараты, происходящие из организма человека и высших позвоночных:
  - препараты иммуноглобулинов;
  - пептидные препараты (пептиды тимуса и их аналоги, пептиды иной природы);
  - цитокины и их рецепторы (интерфероны, нерлейкины, растворимые рецепторы цитокинов);
- 2) препараты бактериального происхождения:
  - на основе компонентов клеточной стенки бактерий;
  - на основе нуклеиновых кислот;
  - прочие препараты микробного происхождения;

##### **II. Синтетические препараты:**

- 1) циклические соединения;
- 2) полиэлектролиты;
- 3) синтетические аналоги природных иммуномодуляторов;
- 4) другие синтетические иммуномодуляторы.

##### ***Препараты иммуноглобулинов***

Среди средств иммунотерапии, в основе которых лежит преимущественно заместительный механизм действия, первыми следует назвать препараты иммуноглобулинов человека. Их готовят из смеси сывороток крови, полученных от большого числа людей (не менее 5000). Раньше иммуноглобулины получали спиртовым осаждением по Кону (II фракция). В настоящее время в связи с возрастанием требований к препаратам иммуноглобулинов для внутривенного введения процедура выделения иммуноглобулинов значительно усовершенствована. В отдельных случаях она включает частичное протеолитическое расщепление. Очень важно, чтобы в препаратах отсутствовали молекулярные агрегаты, способные вызвать активацию комплемента, внутрисосудистое свертывание крови и другие осложнения.

Препараты иммуноглобулинов содержат естественные антитела к различным патогенам. В связи с этим их с успехом применяют для повышения

резистентности к разнообразным инфекционным заболеваниям, особенно у лиц с иммунодефицитами. При использовании этих препаратов проявляется также регуляторная активность иммуноглобулинов, которую, однако, трудно учесть и однозначно предсказать. Когда требуется прицельное повышение устойчивости к конкретным инфекционным агентам, используют препараты иммуноглобулинов, обогащенные соответствующими антителами.

#### ***Пептидные иммуномодуляторы***

После установления функции тимуса стали предприниматься попытки замещения его пониженной функции подсадками органа (препятствием на этом пути служит его отторжение по мере восстановления популяции Т-лимфоцитов) и введением его экстрактов. Первым препаратом такого рода была фракция V тимозина теленка, полученная в 60-е годы XX века А. Гольдштейном (А. Goldstein). Вскоре были выделены и охарактеризованы другие активные пептидные фракции тимуса (см. раздел 3.4.1.4); на основе некоторых из них были получены лекарственные препараты. В СССР были созданы комплексные препараты тимуса — тималин (В.Г. Морозов, В.Х. Хавинсон), тимозин (В.Я. Арион) и ряд других. Первый из них получен путем очистки пептидов, выделяемых методом уксуснокислой экстракции, второй — по модифицированной методике получения тимозина V. Путем химического синтеза получены препараты, воспроизводящие структуру индивидуальных гормонов тимуса или их фрагментов. Аналогично был синтезирован оригинальный отечественный препарат тимоген (альфа-глутамил-триптофан), представляющий собой дипептид L-Glu-L-Trp, ранее обнаруженный в экстракте тимуса (В.И. Дейгин). Получен ряд модификаций этого препарата. Тимодепрессин (гамма-глутамил-триптофан) представляет димер D-изомеров тех же аминокислот. Бестим (гамма-глутамил-триптофан) — димер D-Glu и L-Trp, в котором эти остатки соединены не через  $\alpha$ -, а через  $\gamma$ -связь, что существенно повышает его активность. Неоген — тримерный пептид, в котором к L-димеру, идентичному тимогену, добавлен с N-конца остаток лейцина. Изменением порядка двух аминокислотных остатков в молекуле тимопентина (активного фрагмента 32–36 тимопоэтинов) и добавлением с C-конца остатка аргинина, получен препарат имунофан (аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин) (В.В. Лебедев).

В действии всех препаратов тимусного происхождения и их синтетических аналогов много общего и четкого дифференцирования показаний к их применению нет. Надежды на то, что эти препараты могут заменить тимус, обеспечивая дифференцировку Т-лимфоцитов из клеток-предшественников, не оправдались, что значительно ослабило интерес к их применению. Точный механизм действия этих препаратов до сих пор не установлен. Есть данные, что они усиливают выработку Th1-цитокинов, включая IL-2 и IFN $\gamma$ . Предполагают, что эти препараты обуславливают некое «дозревание» Т-лимфоцитов в периферическом отделе иммунной системы, однако точных экспериментальных данных, подтверждающих этот феномен, нет. Показано, что эффекты тимусных пептидов не являются строго специфичными для Т-клеток.

Показания к использованию пептидных препаратов тимуса и их синтетических аналогов — слабовыраженные иммунодефициты. Наиболее адек-

ватно применение этих препаратов при подавлении выработки собственных пептидных гормонов тимуса, например при старении, действии неблагоприятных факторов среды, включая облучение (т.е. заместительная терапия). В этих условиях эффективность пептидных препаратов тимуса проявляется наиболее очевидно (ослабляется чувствительность к возбудителям сезонных инфекционных заболеваний, нормализуются иммунологические показатели). Есть единичные свидетельства эффективности этих препаратов при лечении аутоиммунной патологии и даже при злокачественных опухолях. Преимущество пептидных препаратов тимуса — их безвредность: осложнения, в том числе аллергические, весьма редки.

Таким же мягким действием обладает отечественный препарат миелопид, представляющий комплекс пептидов, выделенных из костного мозга. Первоначально считали, что эти препараты служат факторами дифференцировки В-лимфоцитов и их следует использовать при функциональной недостаточности этих клеток. Изучение действия индивидуальных пептидов показало, что некоторые из них реализуют свою активность через Т-лимфоциты, другие — через макрофаги. Влияние на В-клетки, если и проявляется, то посредством Т-лимфоцитов. В настоящее время допущено для использования в клинической практике 2 индивидуальных миелопептида.

К пептидным препаратам относят фактор переноса, первоначально полученный из диализата лейкоцитов человека. Иммуотропное действие препарата имеет черты специфичности в отношении конкретных антигенов, что пока практически не поддается рациональному объяснению.

#### ***Иммуномодуляторы бактериальной природы***

Первыми природными молекулами с установленным иммуномодулирующим действием были компоненты клеток микроорганизмов, в первую очередь эндотоксины. Их практическое использование затрудняет не только токсичность, но и способность вызывать нежелательные поликлональные эффекты. Тем не менее на основе бактериальных препаратов были созданы иммуномодуляторы, в частности, продигиозан. Вакцинные препараты на основе *Micobacterium tuberculosis* и *Corintbacterium parvum* апробировали в качестве противоопухолевых средств с иммуномодулирующим действием. Всем комплексным препаратам свойственно выраженное стимулирующее действие на иммунную систему, реализуемое через врожденное звено иммунитета. Характер иммуотропного действия иммуномодуляторов бактериальной природы соответствует естественной роли микроорганизмов в развитии иммунных процессов. Все они содержат РАРР, оказывающие мощное стимулирующее действие на клетки врожденного иммунитета, а через них — на адаптивный иммунитет. В то же время для препаратов этой группы свойственны недостатки, обусловленные их многокомпонентностью и нестандартностью.

Как потенциальный источник иммуномодулирующих молекул внимание исследователей достаточно давно привлекли пептидогликаны клеточной стенки микроорганизмов. В России на основе модификации природных пептидогликанов разработан препарат ликолипид (глюкозаминилмурамилдипептид), представляющий N-глюкозаминил-(1–4)-N-ацетилмурамил-D-изоглутамин. Спектр эффектов ликолипида соответствует описанному выше

типичному действию иммуномодуляторов бактериальной природы. Липид реализует свое действие через разновидность патогенраспознающих рецепторов — NOD-рецепторы, локализованные внутриклеточно (см. раздел 2.2.3). Основная мишень его действия — макрофаги. Липид усиливает выработку цитокинов, экспрессию молекул гистосовместимости (в том числе МНС-II), молекул адгезии. Его положительный эффект продемонстрирован при разнообразных заболеваниях и связан со стимуляцией иммунных процессов и корректирующим влиянием на иммунологические показатели. Для липида характерны свойства иммунокорректора: он не влияет на исходно нормальные показатели, а измененные доводит до уровня нормы.

К группе иммуномодуляторов микробного происхождения можно отнести препараты на основе нуклеиновых кислот. Обычно эти препараты получают из микроорганизмов и дрожжей. Главное действующее вещество этих препаратов — неметилованные CpG-последовательности, свойственные ДНК микроорганизмов, активирующие клетки через рецепторы TLR-9. В связи с этим в настоящее время целенаправленно разрабатывают препараты, обогащенные этими последовательностями. Пока не вполне ясно, сводится ли иммуномодулирующее действие препаратов нуклеиновых кислот к эффекту последовательностей CpG, или они содержат другие активные составляющие. Так, ранее было показано, что иммуностимулирующим действием обладают пиримидиновые основания (C, T, U), входящие в состав нуклеиновых кислот. Мишени действия препаратов на основе бактериальных и дрожжевых нуклеиновых кислот — клетки, несущие TLR9 (в первую очередь клетки врожденного иммунитета, а также естественные киллеры и В-лимфоциты).

### *Синтетические иммуномодуляторы*

Первые синтетические иммуномодуляторы были разработаны для других целей. Так, декарис (левамизол), представляющий 1,2 (ацетилимино)-3,2 гидроксид-2-(2-тио)-этилтиазолидин, был создан как противоглистный препарат. Однако оказалось, что он обладает иммуностимулирующим действием, причем его мишенью служат преимущественно Т-лимфоциты, функциональную активность (пролиферативный потенциал, секрецию цитокинов) которых он повышает. В связи с этим левамизол использовали для иммунотерапии рака и иммунокоррекции при хронических легочных заболеваниях. Однако в связи с токсичностью препарат перестали применять в качестве иммуномодулятора.

Диуцифон был первоначально апробирован как антилепрозный химиопрепарат. У него обнаружили многочисленные эффекты, мишенью которых служат Т-лимфоциты. В частности, он оказался костимулятором выработки IL-2. Показана эффективность диуцифона при ряде иммунодефицитных состояний, включая иммунодефициты, сопутствующие хроническим воспалительным процессам, ожоговой болезни. В настоящее время его применяют в ограниченном масштабе.

Выше (в связи с проблемами вакцинации) упоминался препарат полиоксидоний (азоксимера бромид) — сополимер (N-окси)-1,4-этиленпиперазина и бромида (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазиния. Основная мишень препарата — макрофаги и В-лимфоциты. Молекулярные механизмы его

действия не раскрыты. Применение препарата показано при вторичных иммунодефицитных состояниях на фоне хронических воспалительных процессов, злокачественных опухолей, цитотоксической терапии (химиотерапия, лучевая терапия), при послеоперационных состояниях, ожоговой и других травмах. В комплексе со средствами базовой терапии его рекомендуют использовать также при лечении аллергических и вирусных заболеваний.

Иммуномодулирующее действие в определенной степени может быть присуще различным средствам, относящимся к другим фармакологическим группам (например, дибазолу). Влияние на иммунитет является в этих случаях скорее побочным действием препаратов, которые нельзя рассматривать как истинные иммуномодуляторы. То же можно сказать о многочисленных пищевых добавках, положительное действие которых на иммунную систему трудно оценить количественно и строго. Благоприятное действие на иммунную систему оказывают также препараты общего действия (витамины, микроэлементы, адаптогены). Эти свойства многочисленных лекарственных средств и пищевых добавок активно эксплуатируют в рекламе, что наносит ущерб пониманию природы и установлению области применения истинных иммуномодуляторов.

#### 4.8.3.2. Иммунодепрессанты

##### *Химические иммунодепрессанты*

В качестве иммунодепрессантов, особенно при пересадке органов, сначала использовали те же лекарственные средства, которые применяли в качестве цитотоксических агентов при лечении злокачественных опухолей. Первым препаратом такого рода, использованным в иммунологии, был меркаптопурин. В связи с высокой токсичностью возникла необходимость химической модификации этого вещества. Его токсичность была снижена введением в молекулу имидазольной группы. Так был получен препарат азатиоприн. Другой широко применявшийся препарат этой группы — циклофосфамид. Названные препараты объединяет общий принцип действия. Являясь структурными аналогами азотистых оснований, входящих в состав нуклеотидов, они вмешиваются в синтез предшественников нуклеиновых кислот и нарушают процесс репликации ДНК, что приводит к гибели клетки в процессе деления. Таким образом, иммунодепрессанты первого поколения неизбежно повреждают все делящиеся клетки, в том числе лимфоциты, вступившие в иммунный ответ, а также злокачественные клетки. Это объясняет наличие большого количества побочных эффектов, а также неспецифичность действия этих препаратов: они нарушают процессы гемопоэза, обновление тканей, вызывают опустошение лимфоидной ткани, подавляют все формы иммунного ответа, в том числе защиту от инфекционных заболеваний.

Существенным достижением на пути совершенствования иммунодепрессантов стало создание препарата циклоспорина. Это циклический декапептид с метилированными остатками и наличием необычного нинеоненового аминокислотного остатка. Он был выделен из почвенного гриба *Tolypocladium inflatum*, а в настоящее время синтезируется химически (сложность синтеза определяет высокую стоимость препарата). Вскоре из *Streptomyces inflatum* было выделено вещество FK506, ныне называемое такролимусом, имеющее иную структуру, но очень схожий механизм действия (см. рис. 3.96). Он состо-

ит в предотвращении активации фосфатазы кальциневрина при связывании этих веществ с иммунофиллинами [циклоспорин — с циклофиллином, а такролимус — с белком FKBP (*FK506-binding protein*)]. В норме активация кальциневрина происходит под влиянием ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Активированный кальциневрин дефосфорилирует фактор cNF-AT, благодаря чему этот фактор приобретает способность мигрировать в ядро и, связываясь с промоторами ряда генов, выполняя функцию одного из дифференцировочных факторов, запускающих активацию Т-клеток. Взаимодействие иммунофиллинов с кальциневрином предотвращает усиление фосфатазной активности последнего ионами кальция. Дефосфорилирования фактора NF-AT не происходит, он не перемещается в ядро и не участвует в активации лимфоцитов. Таким образом, циклоспорин и такролимус нарушают активацию клетки, не убивая ее. Расшифровка молекулярных основ действия этих веществ стала первым случаем такого рода для иммуноотропных препаратов.

Иным механизмом действия, приводящего к сходному результату, обладает антибиотик рапамицин (сирулим), выделенный из стрептомицет. Его внутриклеточным рецептором служит белок FKBP, но связывание рапамицина с FKBP влияет не на кальциневрин, а вызывает инактивацию одной из протеинкиназ, участвующих в активации гена  $\alpha$ -цепи рецептора IL-2 (CD25). Таким образом, рапамицин приводит к аналогичному результату, блокируя восприятие сигнала от IL-2.

Циклоспорин и его функциональные аналоги обладают явными преимуществами перед всеми остальными иммунодерессантами, поскольку действуют прицельно на активируемые Т-клетки, при этом не повреждая их. Проявляемая ими токсичность (эти вещества могут повреждать почки и оказывают ряд других побочных эффектов) выражена слабее, чем у цитотоксических препаратов. Значительный прогресс в пересадке несовместимых органов однозначно связан с внедрением в практику этих иммунодепрессантов.

### **Глюкокортикоиды**

О противовоспалительном и иммунодепрессивном действии глюкокортикоидов говорилось выше (см. раздел 3.5.6.2). Внедрение глюкокортикоидов в практику лечения аутоиммунных и аллергических заболеваний было этапным достижением, совершившим революцию в этих областях медицины. Однако очень скоро обнаружились многочисленные отрицательные последствия применения гормональных препаратов — от привыкания к ним до выраженных побочных эффектов и осложнений (развитие язв, отеков, изменений костей и кожи, эндокринных нарушений, инфекционных осложнений). При совершенствовании препаратов были достигнуты большие успехи: получены лекарственные средства типа дексаметазона и бетаметазона с высокой активностью, более продолжительным действием и выраженным противовоспалительным эффектом, не сопровождающимся задержкой ионов  $\text{Na}^+$ . Гормональные препараты на основе стероидов коры надпочечников до сих пор являются важнейшим компонентом в терапевтическом комплексе при лечении бронхиальной астмы, СКВ и других системных патологий соединительной ткани и аллергических заболеваний. В последнем случае очередной прогресс в использовании глюкокортикоидов был связан с разработкой препаратов для местного применения (преимущественно в виде спреев).

### 4.8.3.3. Иммунобиотерапия

#### *Использование цитокинов в качестве лекарственных препаратов*

Будучи физиологически активными молекулами, цитокины уже вскоре после их открытия стали апробироваться в качестве лекарственных средств. Раньше других нашли медицинское применение интерфероны (особенно IFN I типа) благодаря наличию у них антивирусной активности. С начала 80-х годов прошлого столетия начинаются систематические испытания различных цитокинов в качестве противоопухолевых средств, стимуляторов кроветворения и с другими целями.

Ряд особенностей физиологии цитокинов осложняет их применение в качестве лекарственных средств.

- Как факторы преимущественно местного действия, цитокины, как правило, быстро выводятся. Так, для IL-1, IL-2 и ряда других цитокинов время их полувыведения составляет минуты. Это требует частых инъекций или непрерывного капельного (или с помощью микронасосов) вливания препаратов.
- Цитокины — полифункциональные молекулы. В связи с этим трудно добиться целенаправленного эффекта от их применения без сопутствующих побочного действия или даже серьезных осложнений (см. далее).
- Цитокины функционально взаимосвязаны и образуют единую цитокиновую сеть. Введение цитокинов извне влияет на функционирование сети, усиливает (реже ослабляет) выработку практически всех ее компонентов в результате чего результирующая реакция может быть обусловлена не введенным цитокином, а другими составляющими сети. Например, при введении высоких доз IL-2 может развиваться шок, подобный септическому, за счет гиперпродукции TNF $\alpha$ .

В настоящее время область медицинского применения цитокинов относительно узка. Препараты цитокинов используют в нескольких областях медицины.

- Интерфероны  $\alpha$  и  $\beta$  применяют в качестве антивирусных препаратов для лечения гепатитов В и С.
- IFN $\beta$  используют для лечения рассеянного склероза.
- Препараты GM-CSF (молграмостим) и G-CSF (филграстим) используют для стимуляции соответственно грануломиело- и гранулопоэза, нарушенных в результате химиотерапии, а также действия ионизирующей радиации. G-CSF используют также для мобилизации стволовых кроветворных клеток в кровотоки с последующим использованием крови в качестве источника этих клеток для восстановления гемопоэза, нарушенного летальным облучением при лечении гемобластозов.
- Для лечения злокачественных опухолей применяют препараты IFN $\alpha$ 2 (см. раздел 2.5.6.1). Применение с той же целью препаратов IL-2 приостановлено. В ограниченном масштабе применяют мутеины — генетически модифицированные производные TNF $\alpha$  и ряд других цитокинов. Цитокины обычно вводят внутривенно, капельно, короткими курсами.

Несколько подробнее остановимся на использовании цитокинов для лечения злокачественных опухолей (табл. 4.25). Цитокиновую терапию злокачественных опухолей стали разрабатывать и внедрять в онкологическую

клиническую практику с начала 80-х годов прошлого века, когда в экспериментах на мышах была показана противоопухолевая эффективность высоких доз рекомбинантного IL-2. Вскоре этот подход был реализован в клинической практике и была показана его эффективность (положительный ответ на монотерапию в 20–25% случаев) при первичном раке почки и злокачественной меланоме. Недостатком метода были тяжелые осложнения, приводившие к летальному исходу в 2% случаев. В настоящее время использование IL-2 для лечения опухолей приостановлено в связи с риском индукции регуляторных Т-клеток. Более широкое распространение получило лечение с использованием рекомбинантных форм IFN $\alpha$ 2. Его применяют (также в высоких дозах) для лечения вышеупомянутых иммунозависимых опухолей, а также лимфом, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, некоторых сарком. Противоопухолевое действие IFN $\alpha$  основано на способности усиливать экспрессию молекул МНС-I, антипролиферативном эффекте, стимуляции дифференцировки Т-лимфоцитов в направлении Th1-клеток и ряде других эффектов. Хотя лечение IFN $\alpha$  также дает осложнения, они проявляются реже и в менее выраженной форме, чем при лечении IL-2. В настоящее время IFN $\alpha$  является единственным цитокином, прочно вошедшим во вспомогательный арсенал противоопухолевых препаратов. Его используют на фоне базовой противоопухолевой терапии; показана его способность усиливать эффект химиотерапевтических препаратов.

**Таблица 4.25.** Использование цитокинов для лечения опухолей

Цитокин	Использование для лечения опухолей
IFN $\alpha$	Применяют в клинической практике в сочетании с базисной терапией
IL-2	Клиническое применение приостановлено в связи с риском индукции регуляторных Т-лимфоцитов
IL-15	Испытывают в качестве заменителя IL-2
TNF $\alpha$	Применяют для локального лечения (перфузия), а также в форме мутеинов
GM-CSF	Применяют для активации макрофагов и стимуляции миелопоэза
G-CSF, IL-1 $\beta$	Применяют для стимуляции миелопоэза на фоне химиотерапии
IFN $\gamma$ , IL-12	Испытывают в качестве дополнительных средств иммуно- и гено-терапии
IL-4, IL-5, IL-6, IL-7	Испытывают в качестве дополнительных средств иммунотерапии
Хемокины	Испытывают в качестве антиангиогенных средств

Испытанию на противоопухолевую активность подверглось большинство известных цитокинов, однако в большинстве случаев их прямое использование в форме инъекций не признано обоснованным. Так, противоопухолевой активностью обладает TNF $\alpha$ , но его высокая токсичность препятствует использованию данного цитокина в лечебных целях. Нативный TNF $\alpha$  применяют для локальных перфузий участков тела (например, конечностей), в которых расположена опухоль. Разработано и используется в онкологической

практике несколько препаратов мутеинов — продуктов мутантных генов TNF $\alpha$  с ослабленной токсичностью, способных избирательно взаимодействовать с рецептором TNFR1 (p55), передающим сигналы к апоптозу клетки. IFN $\gamma$ , играющий столь важную роль в противоопухолевом иммунитете, в качестве лечебного препарата оказался недостаточно эффективным и способным давать осложнения, обусловленные неадекватной активацией макрофагов. Аналогичные недостатки свойственны препаратам на основе IL-12. Некоторые побочные эффекты, вызываемые цитокинами, удается обойти, вынося этап их действия на клетки иммунной системы за пределы организма.

С лечебными целями используют преимущественно препараты рекомбинантных цитокинов. В ограниченном масштабе применяя экстракты лейкоцитов, обогащенные цитокинами [отечественные препараты лейкинферон (интерферон лейкоцитарный человеческий) и суперлимф (препарат для местного применения, созданный Л.В. Ковальчуком)]; в последнем лечебная эффективность обусловлена не только цитокинами, но и дефензинами).

Наиболее часто проявляется 4 типа осложнений цитокинотерапии.

- Гриппоподобный синдром — недомогание, тошнота и рвота, боли в мышцах и суставах, а также другие проявления, характерные для начала инфекционных заболеваний, при которых эта симптоматика связана с выделением провоспалительных цитокинов.
- Шок, подобный септическому, без bacteriemia — тяжелое осложнение, проявляющееся внутрисосудистым свертыванием крови, падением кровяного давления; обусловлен повышенной выработкой TNF $\alpha$ .
- Синдром протекания капилляров — патогенетически не до конца проясненное состояние, причиной которого служит повышение проницаемости капилляров преимущественно для жидкой части крови; оно проявляется развитием сначала насморка и диареи, а затем отека легких, часто смертельного.
- Синдром наркотической зависимости — проявляется особенно часто при лечении интерферонами.

#### *Антицитокиновая терапия*

Антицитокиновая терапия основана на применении антагонистов цитокинов. Ее используют преимущественно при лечении воспалительных заболеваний аутоиммунной природы. Разрабатывают подходы к ее использованию при аллергических заболеваниях.

В качестве противовоспалительных средств используют рекомбинантные аналоги природных белков — рецепторный антагонист IL-1 — raIL-1, растворимые рецепторы для TNF $\alpha$  (TNFR2), а также гуманизированные (см. раздел 3.6.2.5) моноклональные антитела к TNF $\alpha$  (инфликсимаб, ремикейд). Благоприятный клинический эффект препаратов на основе моноклональных антител к TNF $\alpha$  получен при ревматоидном артрите, болезни Крона, спондиллоартрите, ювенильном артрите, псориатическом артрите, псориазе, гранулематозе Вегенера, полиомиозите, рассеянном склерозе.

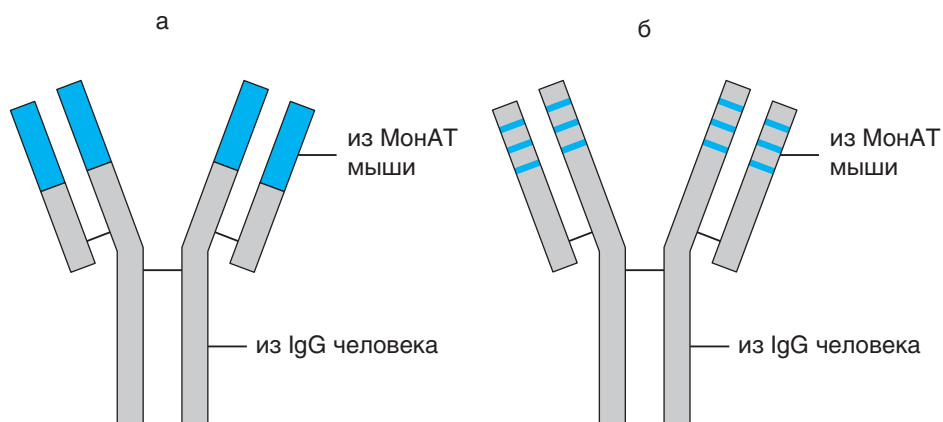
Антицитокиновая терапия для лечения аллергических заболеваний находится в процессе разработки. Сообщалось об испытании при бронхиальной астме и других аллергических заболеваниях гуманизированных моноклональных антител к ряду цитокинов, как имеющих прямое отно-

шение к патогенезу аллергических процессов (IL-5, IL-4, IL-13, IL-9), так и к провоспалительным цитокинам TNF $\alpha$ , IL-1 и IL-25. Испытаны также растворимые рецепторы для IL-4, моноклональные антитела к ним и IL-4-мутеины. Несмотря на улучшение ряда лабораторных показателей, например, ослабление эозинофилии при лечении антителами к IL-5, клиническая эффективность препаратов оказалась в целом незначительной. Только при высоких дозах наблюдали снижение риска развития обострений. Умеренный клинический эффект получен от применения растворимых препаратов рецепторов для IL-4 и моноклональных антител к IL-13. Более выраженный клинический эффект достигнут при использовании инфликсимаба (анти-TNF $\alpha$ ), что согласуется с представлениями об участии TNF $\alpha$  в патогенезе бронхиальной астмы.

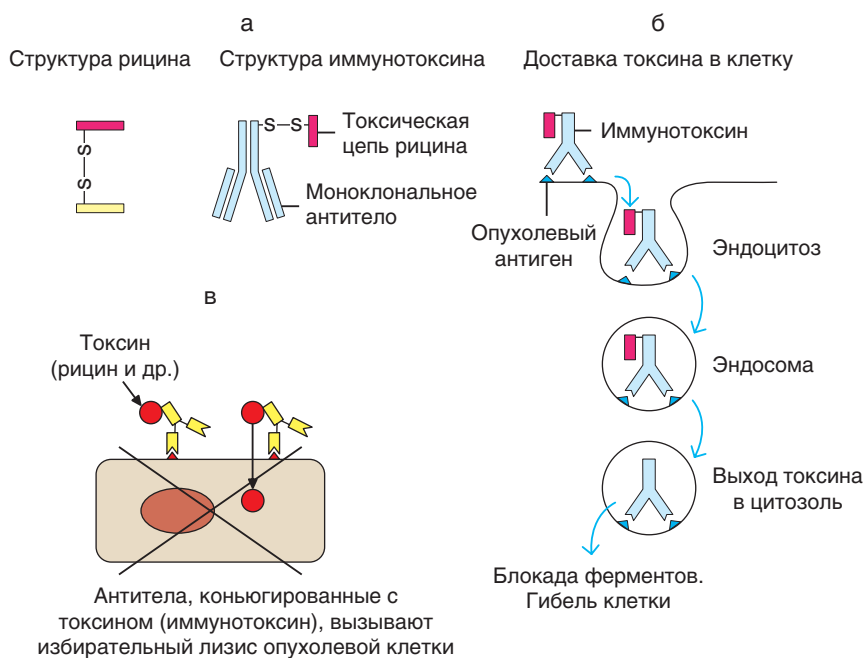
#### *Использование моноклональных антител в иммунотерапии*

Выше мы рассмотрели несколько примеров использования моноклональных антител к цитокинам в иммунотерапии воспалительных заболеваний. Другая важная область применения лечебных препаратов на основе моноклональных антител — онкология, в особенности лечение лейкозов. С этой целью используют антитела к мембранным молекулам, характерным для клеток, вовлеченных в лейкозный процесс, и экспрессированным на них с плотностью, достаточной, чтобы вызвать элиминацию клеток (путем комплементзависимого цитолиза, фагоцитоза опсонизированных клеток или антителозависимого контактного цитолиза). Наиболее яркий пример препарата, успешно используемого для лечения хронического В-клеточного лимфолейкоза — препарат мабтера (ритуксимаб) на основе моноклональных антител к мембранной молекуле CD20, являющейся одной из маркерных молекул В-лимфоцитов. Другой пример лечебных моноклональных антител — антитела к молекуле CD52 — CAMPATH. Антитела обоих типов принадлежат к классу IgG, который характеризуется медленным выведением из организма, что облегчает создание необходимой концентрации антител. Все моноклональные антитела, используемые в иммунотерапии, исходно мышинные. Однако с помощью генно-инженерных процедур все их составные части, кроме *V-гена* или гипервариабельных участков, заменены на человеческие. Такие моноклональные антитела называют гуманизированными (рис. 4.55).

Для лечения солидных опухолей разрабатывают препараты иммунотоксинов — молекул, совмещающих прицельность антител с цитотоксичностью растительных токсинов. Для этого полумолекулу (состава HL) моноклональных антител, специфичных к маркерной молекуле опухоли, ковалентно связывают с токсической субъединицей растительного токсина, чаще всего рицина или винкулина. Благодаря прицельной доставке молекулы иммунотоксина к опухолевой клетке (за счет специфичности активного центра антитела) цитолиз клетки-мишени может быть достигнут при концентрации иммунотоксина, практически безвредной для организма (рис. 4.56). Известны варианты этого подхода — использование вместо токсина радионуклида, комплексообразование двух антител с разной специфичностью, направленной против опухолевого антигена и эффекторной клетки (для их сближения). Однако эти подходы при их очевидной привлекательности пока не нашли широкого практического применения из-за недоста-



**Рис. 4.55.** Схема строения гуманизированных моноклональных антител, используемых в иммунотерапии. В мышиных моноклональных антителах генно-инженерными способами замещены на человеческие все домены, кроме вариабельных (а), или все участки молекулы, кроме гипервариабельных (б)



**Рис. 4.56.** Схема структуры и действия иммунотоксина: а — иммунотоксин получают конъюгацией моноклонального антитела к молекулам клетки-мишени с токсической субъединицей растительного токсина; б — антитела обеспечивают доставку иммунотоксина к клетке-мишени. Его интернализация обеспечивает освобождение токсической субъединицы в непосредственной близости к внутриклеточным молекулам-мишеням; в — на этом принципе основано усиление цитолитического действия моноклональных антител в отношении опухолевых клеток

точной эффективности и возможного риска проявления общетоксического эффекта препаратов.

### **Цитотерапия и генотерапия**

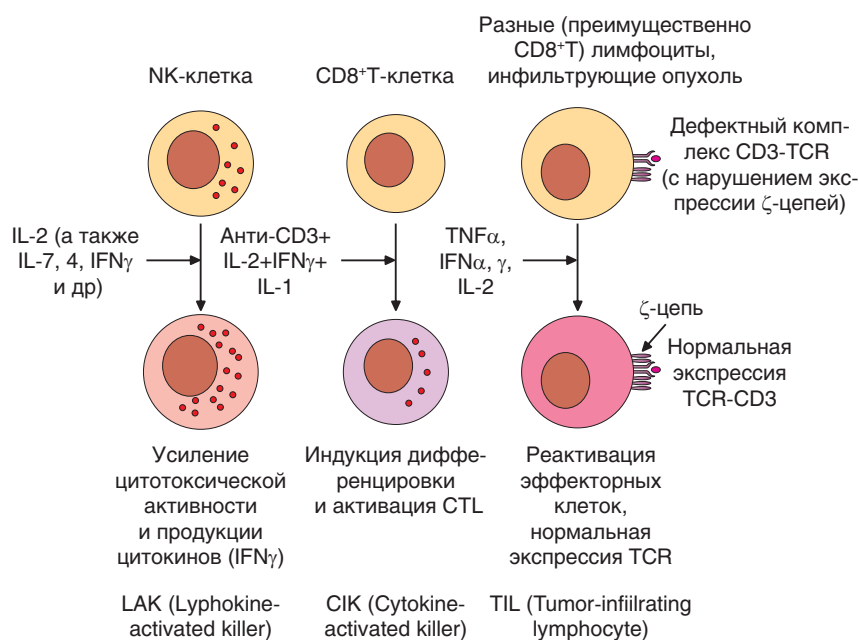
В связи с тем, что цитокиноterapia злокачественных опухолей нередко сопровождается осложнениями, было разработано направление биотерапии, основанное на использовании клеток иммунной системы, обработанных цитокинами вне организма. Оно получило наименование адаптивной (от *adoptive* — приемный) иммуноцитотерапии (табл. 4.26). Принцип данного подхода состоит в том, чтобы вынести этап действия на иммуноциты токсичных цитокинов за пределы организма и вводить в него уже активированные аутологичные клетки. Известно 3 варианта клеток, используемых в адаптивной цитотерапии — LAK-, CIK- и TIL-клетки (рис. 4.57). О LAK-клетках неоднократно говорилось выше. Это NK-клетки, стимулированные *in vitro* IL-2 или другими цитокинами в течение 5–7 сут, в результате чего они приобретают способность лизировать более широкий спектр трансформированных клеток, чем обычные NK-клетки. CIK-клетки — это мононуклеары (или очищенные CD8<sup>+</sup> T-клетки), активированные моноклональными антителами к CD3 с добавлением смеси IL-2, IL-1 и IFN $\gamma$ , что обеспечивает поликлональную пролиферацию только T-лимфоцитов и их дифференцировку в цитотоксические T-клетки. О TIL-клетках говорилось выше (см. 4.1.2.3). Реактивация цитокинами *in vitro* значительно повышает их способность лизировать опухолевые клетки. Главная сложность обусловлена ограниченной доступностью TIL. Эта проблема отпадает при прорастании опухолей в серозные полости, в экссудате которых TIL присутствуют обычно в достаточных количествах. Главная проблема всех методов цитотерапии, помимо трудоемкости получения клеток и риска развития побочных эффектов, — отсутствие методов прицельной доставки вводимых клеток в опухоль.

**Таблица 4.26.** Клетки, применяемые при адаптивной цитотерапии

Название клеток	Источник	Индукторы и активаторы	Механизм действия	Показания при иммунопатологии
Кроветворные стволовые клетки	Костный мозг. Кровь	G-CSF — для мобилизации в кровь	Замещение дефектов кроветворения и иммунодефицита	Замещение при иммунодефицитах, в частности, после воздействия радиации и химиопрепаратов
Лимфокин-активированные киллеры (LAK)	Кровь	IL-2	Активированные NK-клетки проявляют повышенную противоопухолевую активность	Меланома, первичный рак почки, возможно, другие иммунозависимые опухоли

Окончание табл. 4.26

Название клеток	Источник	Индукторы и активаторы	Механизм действия	Показания при иммунопатологии
Цитокин-индуцированные киллеры (CIK)	Кровь	Анти-CD3 <sup>+</sup> ; совместное действие IL-2, TNF $\alpha$ и IL-1	Активированные Т-лимфоциты проявляют повышенную противоопухолевую активность	То же
Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (TIL)	Асцит из серозных полостей при прорастании в них опухолей	Совместное действие TNF $\alpha$ , IL-2, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$	Активированные лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, реактивируются и проявляют высокую противоопухолевую активность	Любые злокачественные опухоли
Регуляторные Т-клетки	Кровь	IL-2, TGF $\beta$ , толерогенные дендритные клетки	Ослабление аутоиммунных и нормальных иммунных процессов	Профилактика реакции «трансплантат против хозяина». В перспективе — лечение аутоиммунных процессов, повторных выкидышей и т.д.



**Рис. 4.57.** Клетки, используемые для иммунотерапии опухолей. Их природа и механизм действия. Проиллюстрирован принцип получения трех основных типов эффекторных клеток, используемых при иммуноцитотерапии опухолей

Разрабатывают также методы сочетания цитотерапии с генотерапией. Последняя состоит в переносе клеток, в которые предварительно трансфецированы гены, кодирующие вещества с противоопухолевой активностью, чаще всего цитокины (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-12 и др.). Гены могут внедрять в сами опухолевые клетки, в клетки стромы опухоли или в TIL. Трансфецированные клетки вводят в опухоль, в которой они секретируют цитокины, что обеспечивает их оптимальную доставку к мишеням — опухолевым клеткам или эффекторным клеткам иммунной системы.

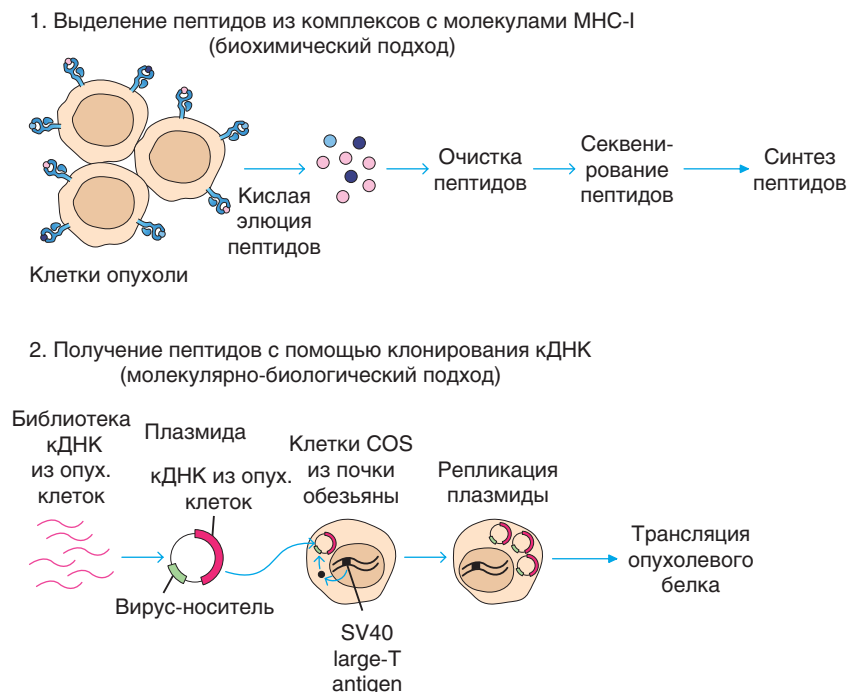
Генотерапию используют (пока в очень ограниченном масштабе) для лечения первичных иммунодефицитов. Наиболее успешным оказалось использование этого подхода для лечения варианта ТКИН с дефицитом аденозиндезаминазы. В аутологичные клетки костного мозга больного трансфецируют ген *ADA* и трансплантируют их в организм. При успешном встраивании перенесенных клеток в костный мозг генетический дефект устраняется. Известно несколько других примеров устранения генетических дефектов, являющихся причиной иммунодефицита, с помощью генотерапии — перенос гена  $\gamma$ (с)-цепи для устранения X-сцепленной формы ТКИН и др.

### **Лечебные вакцины**

Лечебные вакцины, предназначенные для терапии злокачественных опухолей, аутоиммунных заболеваний и аллергии, находятся в процессе разработки.

Основой для создания вакцин практически всегда служат дендритные клетки. С их применением связан ряд проблем. Одна из них состоит в получении дендритных клеток избранного типа в достаточных количествах. Существует 2 подхода для выделения и размножения *in vitro* дендритных клеток — их дифференцировка из стволовых клеток или из моноцитов. Последний подход предпочтительнее в связи с большей доступностью исходных клеток — моноцитов. Моноциты культивируют в присутствии GM-CSF и IL-4; для их созревания в систему обычно добавляют TNF $\alpha$ . Вторая проблема состоит в выборе разновидности клеток для создания вакцины, что определяется поставленными задачами: в случае онковакцин необходимо усилить противоопухолевый иммунитет, при аллергии и аутоиммунных процессах — ослабить аллергическую гиперчувствительность или иммунный ответ на аутоантигены. В связи с этим в качестве основы вакцин используют дендритные клетки различных типов и степени зрелости. Основой онковакцин должны служить зрелые миелоидные дендритные клетки (DC1), желателно стимулированные IL-12 и/или IFN $\gamma$ . При этом желателно дополнительное воздействие на клетки PAMP-содержащих стимуляторов врожденного иммунитета, действующих через TLR. Для получения алерговакцин и вакцин для подавления аутоиммунных процессов необходимо использовать плазмоцитоидные (DC2) или незрелые миелоидные дендритные клетки, дополнительно обработанные IL-10.

Еще одна задача состоит в нагрузке дендритных клеток антигеном. В качестве антигена используют потенциально протективные молекулы — опухолеспецифические антигены или онкофетальные белки, аллергены, потенциальные аутоантигены или другие молекулы, в зависимости



**Рис. 4.58.** Получение опухолевых антигенов с помощью биохимического и молекулярно-биологического подходов. Проиллюстрировано два подхода к получению опухолевых антигенов при создании противоопухолевых вакцин. Биохимический подход основан на элюции пептидов из комплекса с мембранными молекулами МНС-I опухолевых клеток. Наиболее трудная задача — отделение опухолевых пептидов от других аутологичных пептидов, содержащихся в составе молекул МНС. Молекулярно-биологический подход (наиболее распространенный в настоящее время) состоит в клонировании генов опухолевых антигенов из библиотеки ДНК опухолевой клетки, введении клонированных генов в плазмиду, трансфекции плазмидой клетки и трансляции белка

от поставленных задач. Получение необходимых антигенов и пептидов (в частности опухолеассоциированных) для нагрузки дендритных клеток решается методами молекулярной биологии (рис. 4.58). Процесс нагрузки должен учитывать особенности клеточной биологии и презентации антигена эффекторным клеткам. Так, в случае аллергических и аутоиммунных вакцин антиген может «подаваться» дендритным клеткам обычным путем, с помощью его введения в среду, из которой клетка может эндоцитировать молекулы и затем презентировать их в составе молекул МНС-II. При создании онковакцин такой путь также можно использовать для получения опухолеспецифических Th1-клеток. Однако наряду с этим необходимо формировать путь поступления антигена в цитозоль дендритных клеток. Это позволит презентировать его в составе молекул МНС-I, что необходимо для индукции цитотоксических Т-лимфоцитов.

**РЕЗЮМЕ**

Основное назначение иммунной системы — защита организма от патогенов. В этой защите участвуют механизмы врожденного и адаптивного иммунитета: первые полностью обеспечивают ее начальные этапы (первая линия защиты), вторые играют ключевую роль в повышении ее эффективности и специфичности иммунных процессов в эффекторной фазе иммунного ответа и при формировании иммунологической памяти. Характер реакции иммунной системы на возбудителя инфекции во многом определяется локализацией патогена и его природой.

Другие объекты, против которых направлена активность иммунной системы, — злокачественные опухоли. Полагают, что иммунная система обеспечивает удаление многих злокачественных клеток; однако она не может разрушить сформировавшуюся опухоль. Одна из многих причин слабости противоопухолевого иммунитета состоит в отсутствии экспрессии опухолевыми клетками РАРР. Однако такое же отсутствие РАРР не препятствует отторжению генетически чужеродных тканей. Для предотвращения отторжения плода в процессе эволюции сформировались многочисленные механизмы, связанные с функционированием плаценты. Помимо плода, в организме млекопитающих существует ряд других иммунологически привилегированных участков, с большей или меньшей надежностью изолированных от иммунной системы.

Защита собственных тканей организма от повреждающего действия иммунных факторов достигается благодаря наличию аутоотолерантности, формирующейся на разных уровнях (удаление аутоспецифических клонов в тимусе, индукция их анергии на периферии, повторная перестройка аутоспецифических рецепторов). Кроме того, активность аутоспецифических клонов блокируют регуляторные Т-лимфоциты. При повреждении механизмов аутоотолерантности развиваются аутоиммунные процессы, лежащие в основе многочисленных заболеваний. Другое проявление повышенной активности иммунной системы — аллергия — разновидность гиперчувствительности, при которой взаимодействие антигена (аллергена) с IgЕ-антителами, фиксированными на тучных клетках, вызывает неадекватную реакцию, обусловленную выбросом содержимого гранул тучных клеток и синтезом активных веществ.

Большую группу заболеваний образуют иммунодефициты. Существует значительное число первичных иммунодефицитов, обусловленных мутациями генов, отвечающих за развитие и функционирование клеток иммунной системы. Приобретенные (вторичные) иммунодефицитные состояния развиваются под влиянием цитотоксических воздействий, голодания, нарушений метаболизма, эндокринной патологии, инфекционных заболеваний, особенно вирусных. Наиболее тяжелая форма приобретенных иммунодефицитов — ВИЧ-инфекция/СПИД, при которых вирус поражает клетки иммунной системы. Наконец, иммунocyты могут претерпеть злокачественное перерождение, что приводит к развитию лейкозов и лимфом.

В практическую медицину активно внедряются методы иммунодиагностики, иммунопрофилактики и иммунотерапии. Основная задача профилактической иммунологии — разработка вакцин с целью индукции иммунологической памяти к инфекционным агентам в обход инфекционного заболевания. В последние годы понятие «вакцина» стали трактовать шире, чем в период зарождения иммунологии. Разрабатывают вакцины, предназначенные для лечения злокачественных опухолей, аутоиммунных и аллергических заболеваний. Интенсивно разрабатываются подходы к лечению иммунопатологии и злокачественных опухолей, основанные на использовании принципов и методов иммунологии.

## ПОСЛЕСЛОВИЕ

В предисловии к книге упоминалось о том, что за десятилетие, разделяющее выход книги «Основы иммунологии» (1999, Медицина) и настоящего издания, в иммунологии произошли кардинальные изменения, сделавшие невозможным простое переиздание предыдущей книги с внесением в нее поправок, касающихся новых научных данных, полученных за этот срок. Теперь, после изложения материала новой книги, уместно задаться вопросом, в чем состоят эти столь глубокие изменения.

Об одном из них неоднократно упоминалось: благодаря концепции Ч. Дженеуэя (*C.A. Janeway*) и экспериментальным разработкам его последователей коренным образом изменились представления о структуре иммунитета. Прежде всего приобрело четкие формы учение о распознавании «чужого» в рамках врожденного иммунитета, что окончательно закрыло тему неспецифического иммунитета, как несуществующего. Далее: осмыслены иерархические взаимоотношения филогенетически древнего врожденного иммунитета и молодого адаптивного иммунитета: оказалось, что активация врожденного иммунитета является обязательным условием запуска адаптивного иммунитета. В результате сложилось стройное учение о «двухъярусном» иммунитете, компоненты которого взаимосвязаны и взаимно обогащают друг друга.

Как известно, на роль связующего звена между врожденным и адаптивным иммунитетом в наибольшей степени могут претендовать дендритные клетки. Их изучение стремительно развивалось в последнее десятилетие не только в связи с вышесказанным «сочлениением» врожденного и адаптивного иммунитета. Этим клеткам все более обоснованно приписывается роль основного «распорядителя» направлений развития адаптивного иммунитета, тогда как Т-хелперы оказываются в большей степени исполнителями «инструкций» дендритных клеток. Дендритные клетки оказались в центре внимания исследователей также при разработке путей иммунопрофилактики и иммунотерапии — в качестве основы вакцин, не только противoinфекционных, но и противоопухолевых, антиаллергических или направленных на лечение аутоиммунных заболеваний.

На протяжении прошлого десятилетия утвердилось новое учение о регуляторных Т-клетках, восполнившее «зияние», создавшееся после деазуирования супрессорных клеток. На основе изучения естественных регуляторных Т-клеток сложились новые представления о механизмах поддержания аутоотолерантности. Маятник этих представлений (элиминация клонов — супрессия) вновь резко сместился в зону супрессии.

На протяжении срока, разделяющего выход двух книг, коренным образом изменилось учение о формировании и динамической регуляции структуры периферического отдела иммунной системы. Наиболее заметное проявление этих изменений состоит в осмыслении функции хемокинов и их роли в организации лимфоидной ткани. Не менее существенно и достаточно неожиданно было выяснение активного характера взаимоотношений лимфоидных и стромальных клеток при морфогенезе вторичных лимфоидных органов. Наконец, сделаны первые шаги в понимании гомеостаза лимфоидных популяций и баланса между популяциями наивных лимфоцитов и клеток памяти.

Активное сближение иммунологии и молекулярной биологии не могло не принести плоды еще в одной области: близок к завершению процесс изучения молекулярных основ первичных иммунодефицитов, о чем совсем недавно оставалось лишь мечтать. Вообще, применение методов молекулярного анализа и активного манипулирования на уровне генов позволило получить точные и окончательные ответы на многие вопросы, касающиеся функции иммунологически значимых молекул и клеток. Это позволяет надеяться на то, что процесс превращения иммунологии в точную науку становится реальностью.

Таковы самые принципиальные достижения иммунологии за истекшее десятилетие. Значительно сложнее оценить научные успехи, которые предстоит достичь в ближайшее время. Попытки предсказания глобальных достижений науки, как правило, бесплодны. Лишь исходя из уже наметившихся тенденций можно с определенной степенью уверенности предвидеть основные пути развития иммунологии и, следовательно, ее достижения в обозримом будущем.

Беру на себя смелость указать на два возможных принципиальных прорыва в иммунологических знаниях, которые можно ожидать в ближайшее десятилетие. Одно из них — углубление знаний о роли дендритных клеток в запуске иммунного ответа и формировании ареактивности до уровня, обеспечивающего успешное практическое применение этих знаний при создании вакцин. Дело в том, что несмотря на интенсивные усилия, направленные на создание вакцин на основе дендритных клеток, реальные успехи, достигнутые на этом поприще, более чем скромны. В ближайшие годы возможно два сценария развития этой темы: или наши знания пополнятся до уровня, который позволит решить практические аспекты проблемы, или мы откажемся от этого пути, что будет сопряжено с принципиальным изменением иммунологической парадигмы.

Вторая область, в которой можно ожидать теоретических прорывов, имеющих важнейшие практические последствия — существенное углубление и расширение наших знаний о клетках памяти. Следует признать, что наши современные представления о клетках памяти схематичны, что составляет очевидный контраст с подробными и обширными знаниям о других разновидностях клеток иммунной системы. Как известно, индукция клеток памяти составляет основу противoinфекционной вакцинации, а стремление к созданию вакцин породило иммунологию как самостоятельную науку. В связи с этим принципиальная значимость этого ожидаемого прорыва представляется вполне очевидной.

Основываясь на опыте функционирования предыдущей книги 1999 г. издания, автор рассчитывает на то, что в ближайшие 3–5 лет эта новая книга окажется полезным руководством для иммунологов, стремящихся углублять свои знания. Будем надеяться также на возможность переиздания книги с внесением в нее уточнений, что позволит продлить срок ее активного существования до десятилетия, после чего другим автором будет написана новая книга подобного рода.

*А.А. Ярилин*

## ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

### А

Авидность 278  
Агаммаглобулинемия  
    Брутона 650–652, 663, 669  
Аденилатциклаза 186, 226  
Аденовирус 527  
Адреналин 150, 502  
Адьювант 552, 712  
    Фрейнда 420, 593, 636  
Азота оксид 138, 185  
Азурацидин 55, 140  
Активатор плазминугена тканевый 659  
Активационный мотив ITAM 128  
Активная форма кислорода 134  
Актин 96, 103  
Алармин 94  
Аллерген 609, 611  
Аллергия 17  
Аллоантиген 282, 554  
Аллотипия 241  
Аллотрансплантация 554  
Альбумин 182  
Амилоид  
    Р 181  
    сывороточный 106  
Амин биогенный 185  
Аминопептидаза N 53, 63  
Аминоптерин 466  
Анафилаксин 106, 180  
Ангиотензин 144  
Анемия 672, 675  
Анергия 270, 574  
Аннексин V 369, 707  
Антагонизм цитокинов 206  
Анти-антитело 265  
Антиген 29, 263  
    VLA 414  
        гистосовместимости 282  
        кожных лимфоцитов (CLA) 98  
        опухолевый трансплантационный 543  
        поздний активационный 414  
        простаты специфический  
        сывороточный 543  
Антигенность 263  
Антиидиотип 509  
Антитело 17, 30, 231, 263  
    генно-инженерное 468  
Аполипопротеин 147  
Апоптоз 39  
    запуск 664, 688  
Апoptосома 368  
Аппарат Гольджи 68, 121, 147, 291, 460  
Аппендикс 33

Арилсульфатаза 55, 140  
Армированный макрофаг 148  
Артрит 729  
    ревматоидный 603, 670  
Аспарагинил эндонуклеаза 362  
Аспергиллез 685  
Астма бронхиальная 626  
Атаксия-телеангиоэктазия 654, 673  
Атопия 500  
Аутоантитело 265  
Аутоиммунитет 588  
Аутотрансплантация 554  
Аутофагия 292  
Аффинность антитела 277  
Ацетилгалактозамин 63  
Ацетилглюкозамин 63

### Б

Базофил 58  
Бактерицидность фагоцитов 133  
Бактерицидный пептид 141  
Барьер гематотимический 350  
Белая пульпа 375  
Белок  
    BPI 54  
    С-реактивный 175  
    ERM 96  
    WASP 131, 672  
    главный щелочной 145, 540  
    катионный 140  
    М 523  
    макрофага воспалительный 118  
    маннозосвязывающий 182  
    моноцита хемотаксический 118  
    острой фазы 181  
    ретинолсвязывающий 182  
    С-реактивный 106, 181  
    теплового шока 29  
    эозинофилов главный 446  
    эозинофилов катионный 57, 145, 446, 540  
Библиотека комбинаторная 468  
Биологическая опасность 94  
Бласт 455  
Болезнь  
    Аддисона 604  
    базедова 499, 602  
    гемолитическая новорожденных 631  
    гранулематозная  
        хроническая 137, 655  
    Грейвса 602  
    задержки роста 561

Крона 579, 605, 729  
лаймская 485  
сывороточная 634  
трансплантат против хозяина 560  
Ходжкина 641  
Чагаса 596  
Брадикинин 190, 659  
Бурса Фабриция 302, 358

**В**

Вазопрессин 361  
Валентность антигена 267  
Вариабельный домен 232  
Вариоляция 15  
Васкулит волчаночный 654  
Вещество  
  Н 565  
  Ландштейнера-Винера 102  
  Льюиса-sLex 98  
Вирус  
  гриппа 157  
  кори 527  
  саркомы Шоупа 526  
  Сендай 157, 465, 502  
  Эпштейна–Барр 129, 526, 643, 674  
Витлиго 605  
Витронектин 84, 125, 180  
Волчанка системная красная 369, 606  
Воспаление 78  
  аллергическое 429  
В-центробласт 260  
Вырожденность хемокиновых  
  рецепторов 113

**Г**

Галактоза 63  
Галактозидаза 55, 67  
Галактоцерамид 337  
Галектин 95  
Ганглиозид GQ 361  
Гаптен 266  
Гаптоглобин 181, 182  
Гельсолин 369  
Гемагглютинин 523  
Гепарин 60, 108, 150, 618  
Гепаринсульфат 116  
Гиалуронидаза 351  
Гидроксил-радикал 137  
Гидроксильный радикал 137  
Гипер-IgE-синдром 672  
Гипер-IgM-синдром 403, 651

Гипервариабельный участок  
  вариабельного домена 238  
Гипертиреозидизм 600  
Гиперчувствительность 607  
Гипоксантин 466  
Гипотиреозидизм 600  
Гистамин 150, 185, 422, 618  
Гистаминаза 185  
Гистидинкарбоксилаза 60, 618  
Гистоплазмоз 685  
Главный комплекс  
  гистосовместимости 30, 281  
Гликозамингликан кислый 60, 618  
Гликопротеин  
  вариантспецифический 525  
Гликофорин 179  
Глицерофосфатаза кислая 55, 140  
Глюкоза 63  
Глюкуронидаза 57, 140  
Гомеостатическая пролиферация 386  
Гонадотропин хорионический 543, 584  
Гормон  
  адренокортикотропный 502  
  меланоцит-стимулирующий 581  
  роста 502  
  соматотропный 503  
Гранзим 141, 150, 182, 438  
  В 164, 484  
Гранула  
  азурофильная 140  
  бирбека 74, 381  
Гранулема 445  
Гранулематоз Вегенера 729  
Гранулолизин 150

**Д**

Дважды негативные Т-клетки 320  
Дегидрогеназа 60  
Дегрануляция 143  
Дезаминаза цитидина 260  
Дерматит  
  атопический 626  
  контактный 637  
Детерминанта секвенциальная 275  
Дефензин 55, 95, 141, 529  
Дефект IgA селективный 672  
Диабет сахарный 601  
  ювенильный 499  
Диаминоксидаза 185  
Диацилглицерол 113, 288, 409  
Дигидроэпиандростерон 422  
Динамин 224

Дисгенезия тимуса 349, 650, 666  
Дисплазия эктодермальная 670  
Дисплей фаговый 468  
Дитиотреитол 232  
Домен 232  
    контроля комплемента 171  
    фон Виллебрандта 101

**Е**

Естественный киллер 149

**Ж**

Желатиназа 55  
Железа вилочковая 318

**З**

Заболевание аутоиммунное 588  
Зародышевый центр 454

**И**

Идиотип 242, 508  
Идиотипия 241  
Идиотоп 242  
Избыточность системы  
    хемокинов 113  
Избыточность системы  
    цитокинов 205  
Изоагглютинин 566  
Изоглобтригексозилцерамид 337, 485  
Имидазолацетат 185  
Иммунизация бустерная 717  
Иммунитет 28  
    адаптивный 26, 231  
    врожденный 25, 89  
    противоопухолевый 541  
    трансплантационный 555  
Иммунный комплекс 39  
Иммунный ответ  
    адаптивный 37, 430  
    вторичный 468  
    клеточный 432  
    мукозальный 486  
Иммунный синапс 471  
Иммуногенность антигена 265  
Иммуноглобулин  
    мембранный 242  
    строение 232  
Иммуноглобулины 231

Иммунодефицит  
    возрастной 695  
    врожденного иммунитета 665  
    вторичный 686  
    комбинированный тяжелый 655  
    первичный 646  
    приобретенный 676  
    физиологический 694  
Иммунологическая память 44, 468  
Иммунологическая толерантность 270  
Иммунология молекулярная 22  
Иммунотерапия 720  
Иммунотоксин 730, 731  
Импринтинг 491  
Инволюция тимуса  
    акцидентальная 357  
Ингибирующий мотив ITIM 129  
Индоламин 506  
Индукцибельная NO-синтаза 67  
Индукцируемая пролиферация 386  
Инозитол трифосфат 113, 409  
Инсулин 502, 503  
Интеграза 523  
Интегрин 98  
Интерлейкин  
    1 208  
    10 510  
    13 429  
    15 361  
    17 214  
    18 210  
    2 426  
    33 210  
    4 428  
    5 429  
    6 213  
    7 360  
Интерферон 218  
Инфламмосома 95, 209

**К**

Кадхерин E 489  
Калретикулин 291  
Калликреин 659  
Калнексин 291  
Кальмодулин 96  
Кальциневрин 409  
Кальцитонин 581  
Кандидоз 685  
Карбоксилпептидаза 60  
Каркасный участок  
    вариабельного домена 238

- Карман субэпителиальный 487  
Каскад  
  МАР 90, 411  
  комплемента 167  
Каспаза 164  
  1 88, 208, 548  
  10 591  
  3 439  
  8 212, 591  
  9 144, 368  
Каталаза 67, 139  
Кателицидин 55, 95, 142  
Катепсин 57, 67, 121, 150, 182  
  G 144  
  L 142  
Кахексия 213, 561  
Качение 98, 383  
Кератиноцит 381  
Киллерная активность  
  фагоцитов 143  
Киноноген 659  
Кинуренин 585, 693  
Кислая фосфатаза 57, 145, 150  
Кислород синглетный 137  
Кислота  
  арахидоновая 67, 106  
  гиалуроновая 527  
  липотейхоевая 534  
  миколовая 288, 521  
  мочевая 95  
  ретиновая 491  
  сиаловая 63  
  хлорноватистая 137  
Кластер активационный  
  супрамолекулярный 394  
Клетка  
  LAK 165, 427  
  вуалевая 392  
  дендритная 71  
  дендритная миелоидная 37  
  дендритная плазмоцитонидная 73  
  естественная киллерная 149  
  интердигитальная 75, 374, 392  
  Купфера 71  
  Лангерганса 73, 288, 381, 555, 636  
  мезангиальная 71  
  миоидная 357  
  памяти 40, 469  
  плазматическая 40  
  стволовая кроветворная 47  
  тучная 58  
  Ходжкина 641  
  Штеренберга 641  
Кокцидиомикоз 685  
Коллаген 102  
Коллагеназа 55, 57, 121, 351  
Коллектин 171, 177  
Колхицин 143  
Кольцо  
  Вальдейера 379  
  рекомбинационное 255  
Комплекс  
  CD3 247  
  иммунный 39  
  литический 178  
  рекомбинационный V(D)J 255  
Комплемент 167  
Комплементарность 276  
Конверсия фенотипа 475  
Конвертаза амплифицирующая 173  
Конкавалин А 706  
Константный домен 232  
Координаты Скэтчарда 278  
Корецептор 31  
  Т-клетки 249  
Кортизол 502  
Кортизончувствительный  
  тимоцит 354  
Костимуляция 399  
Костный мозг 344  
Крапивница 610  
Краситель  
  алциановый синий 61  
  нитросиний тетразолий 657, 704  
  синька Эванса 610  
  толуидиновый синий 61  
  трипановая синь 281  
  эозин 281  
Красная пульпа 374  
Криптококкоз 685  
Криптопатч 359  
Кристалл  
  Шарко—Лейдена 57  
Ксенотрансплантация 554
- Л**  
Лактоферрин 54, 141  
Ламеллоподия 114  
Ламинин 65, 102, 351  
Лангерин 74, 381  
Лейкоз 639  
Лейкотриен 58, 106, 147, 186  
Лектин улитки UEA1 327  
Лепра 520  
Лизофосфатидилсерин 539

Лизоцим 54, 67, 140  
Лимитин 219  
Лимфатический узел 33  
Лимфогранулематоз 641, 644  
Лимфоидная ткань, ассоциированная  
со слизистыми оболочками 33  
Лимфоидный орган 31, 342  
    вторичный 371  
    первичный 344  
Лимфокин 191, 426  
Лимфома  
    неходжкинская 685  
Лимфома Беркита 643  
Лимфопоз 31  
Лимфоцит  
    В1 34, 310  
    В2 34, 301  
    В маргинальной зоны 34  
    инфильтрирующий опухоль ???  
    Т 314  
    Т регуляторный 35, 333  
    Т цитотоксический 35, 329, 436  
    Т-хелпер 35, 317  
Лимфоцитарная ниша 385  
Липаза липопротеиновая 147, 213  
Липид А 84, 175  
Липоарабиноманнан 521, 534  
Липокалин 182  
Липоксигеназа 57  
Липоксин 186  
Липополисахарид 175, 534  
Липофосфолипаза 57  
Лихорадка сенная 625  
Локус гистосовместимости 282  
Люминол 704  
Люцигенин 704

## М

Макроглобулин 170  
Макрофаг 63, 71  
    армированный 148  
Манноза 63, 240  
Маннозидаза 55  
Маркер линейный 303  
Мастоцит 58  
Медиатор липидный 186  
Меланома 543  
Меркаптопуринол 232  
Металлопротеиназа 182, 352  
Мет-энкефалин 361  
Миастения гравис 357, 605  
Миелопероксидаза 54, 67, 137

Миелопоз 47  
Микоз грибовидный 641  
Микседема 599  
Миндалина 33, 379  
Минитело 468  
Митоген лаконоса 708  
М-клетка 33, 377  
Модуль сериновых протеаз 171  
Мозг костный 344  
Молекула  
    адгезии 96  
    костимулирующая 38  
    стрессорная 29  
Молекулярная иммунология 22  
Монокин 191  
Мононуклеоз  
    инфекционный 643, 675  
Моноцит 63  
Мукормикоз 685  
Мурамидаза 140  
Мурамилдипептид 88  
Мурамилидаза 55  
Мутагенез соматический 260  
Муфта периаартериальная 375  
Муцин 97

## Н

Недостаточность иммунная общая  
    вариабельная 672  
Нейраминидаза 523  
Нейромедиатор 361  
Нейротоксин эозинофилов 57, 145  
Нейтрофил 52  
Некроз 364  
Нефрит волчаночный 607  
Норадреналин 150  
Нуклеотидаза 55

## О

Образ  
    опасности 29  
    патогенности 29  
Общая вариабельная иммунная  
    недостаточность 672  
Озон 137  
Оксид азота 43, 138, 185  
Оксидаза фагоцитов 134  
Окситоцин 361  
Олигодендрокит 603  
Онкостатин М 213  
Опасность биологическая 94

Опсонизация 123  
Орган  
    иммунологически  
        привилегированный 580  
    лимфоидный 31  
    первичный 344  
Орнитин 137  
Орозомукоид 182  
Осаждение по Кону 721  
Оспа 15, 718  
Остеокласт 71  
Островок Лангерганса 601  
Ответ иммунный 37  
Отек ангионевротический 179

**П**

Память иммунологическая 44  
Паннус 599  
Папаин 232  
Паралич Фельтена 577  
Паттерн 24  
Пейерова бляшка 75, 359, 373, 488, 578  
Пейеровы бляшки 33  
Пенетрантность 498  
Пентраксин 106, 182, 481, 528  
Пепсин 233  
Пептид  
    бактерицидный 141  
    вазоактивный 147, 503  
Перекачивание 97  
Перекись водорода 136  
Переливание крови 564  
Пероксидаза 57, 145  
    эозинофильная 57, 145, 446  
Пероксинитрит 138, 443, 535  
Перфорин 150, 178, 438, 484  
Плазмни 659  
Плазмоцит 39  
Пневмония пневмоцистная 672  
Пневмоцеле 672  
Подогликан 98  
Подокаликсин 98  
Полимераза 523  
Полиомиозит 729  
Полиэтиленгликоль 465  
Последовательность сигнальная 253  
Преальбумин 182  
Предшественник лимфоидный общий (CLP) 303  
Презентация антигена 38, 389  
Прекалликреин 659  
Прик-тест 629

Прогрессия опухолевая 546  
Прогестерон 422, 584  
Прокаспаза 368  
Пролиферация 386  
Проопиомеланокортин 503  
Пропердин 174  
Пропидия йодид 707  
Простагландин 61, 147, 189  
    E2 422  
Простаглицлин 185  
Протеаза нейтральная 140  
Протеаза сериновая 175  
Протеинкиназа  
    R 224  
    A 226  
    C 397, 616  
Протектин 179  
Протеогликан 147  
Протимозин 362  
Процессинг антигена 284  
Псевдоген 253  
Псориаз 604, 638, 729  
Пульпа 374  
Пурпура тромбоцитопеническая 632

**Р**

Рак 543  
Распин 357  
Рафт 161, 251, 397, 438, 471  
Реагин 609  
Реактант 181  
Реакция  
    аллергическая 609  
    Артюса 634  
    воспалительная 95  
    Джонса—Мотта 637  
    кожной базофильной  
        гиперчувствительности 637  
    Манту 635  
    Праустница—Кюстнера 610  
    трансплантат против хозяина 560  
    Шульца—Дейла 610  
Реаранжировка генов 254  
Редактирование антигенраспознающего  
    рецептора 574  
Рекомбинация генов 254  
Релаксан 422  
Ремоделирование 611  
Рецептор  
    DEC-205 292  
    Fc 126, 233  
    KIR 157

NLR 88  
RLR 88  
scavenger 65  
TLR 80  
антигенспецифический 29  
В-клеточный (BCR) 30, 242  
дектин-1 87  
лектиновый 63, 85, 292  
липопротеиновый 294  
паттернраспознающий 29, 85  
CR 129  
стрессорных молекул 31  
Т-клеточный (TCR) 30, 244  
цитокиновый  
    гемопозитиновый 198  
Рециклинг 161, 294  
    Т-киллеров 439  
Рециркуляция лимфоцитов 381  
Ринит аллергический 626  
РНКаза 57, 224  
Роллинг 98

**С**

Сайленсер 258  
Сапозин 294  
Саркома Капоши 676, 685  
Связь тиозфирная 170  
Секреторная активность фагоцитов 143  
Селезенка 33, 374  
Селектин 96  
    L 317  
Селекция агонистзависимая 335  
Семинома 543  
Сенсибилизация 609  
Серотонин 60, 150, 185  
Серпин 141, 179  
Серпоцидин 55, 140  
Сеть цитокиновая 203  
Сиалилтрансфераза 331  
Синапс  
    иммунный 394  
    цитолитический 438  
Синаптоагмин 133  
Синаптофизин 357  
Синглетный кислород 137  
Синдикан 459  
Синдром  
    APCED 329, 650, 675  
    IPeX 334  
    антифосфолипидный 607

аутоиммунный  
    лимфопролиферативный 333, 650, 674  
Барта 658  
Вискотта—Олдрича 131, 650, 672  
волчаночный 597, 659  
волчаночный нефротический 592  
Германски—Пудлак 658  
Грисцелл 658  
Диаманд 658  
ДиДжорджи 349, 650, 669  
Иова 672  
истощения 561  
Незелоф 666  
Ниймегена 674  
Оммена 668  
приобретенного  
    иммунодефицита 676  
склеродермоподобный 670  
хромосомных поломок 673  
Чедиака—Хигаси 651, 658  
Швахмана—Диаманд 658  
Шегрена 606, 654  
Синергизм цитокинов 206  
Синус маргинальный 375  
Синцитий 684  
Система  
    гипоталамо-гипофизарно-  
        гонадная 364  
    комплемента 17, 167  
    микрообидная  
        миелопероксидазная 137  
    моноклеарная  
        фагоцитирующая 63  
    ретикуло-эндотелиальная 63  
    цитокинов 203  
Склеродермия 605  
Склероз  
    рассеянный 602, 729  
    узелковый 642  
Скурфин 333  
Созревание аффинитета 40, 260  
Солитарный фолликул 379  
Солюбилизация 180  
Соматостатин 361, 581  
Спейсер 253  
Специфичность антигена 271  
Спондилартрит  
    анкилозирующий 498  
Спондилартрит 729  
Среда селективная НАТ 466  
Стронгилоидоз 685

Суперантиген 297  
Супероксидисмутаза 136  
Супероксидрадикал 136, 535  
Суперсемейство иммуноглобулинов 237  
Сфингозин-1-фосфат 331  
Сфингомиелин 368  
Сфингомиелиназа 164  
Сцинтиотрофобласт 583

**Т**

Талин 101, 161  
Телеэнцефалин 102  
Тельце  
    Гассалья 353  
    зерновидное 375  
Теория решетки 280  
Терминальная дезоксинуклетидил  
    трансфераза 304  
Тетрагидроптерин 138  
Тетраспанин 244  
Тимозин 95, 361, 504  
Тимома 357, 640  
Тимопоэтин 361, 504  
Тимоцит кортикальный 354  
Тимулин 361, 504  
Тимус 318, 345  
Тиоэфирная связь 170  
Тиреоидит  
    аутоиммунный 593  
    Хашимото 499, 602, 632  
Тиреотоксикоз 602  
Тироксин 502  
Т-лимфоцит 314  
    активация 403  
    регуляторный 512  
    стадии DN 320  
    цитотоксический 436  
Токсин столбняка 113  
Толерантность  
    иммунологическая 566  
    пероральная 486  
Толерогенность 568  
Трабекула 372  
Транзиторный фолликул 379  
Трансглутаминаза 67  
Транскриптаза обратная 523  
Трансферрин 147, 182, 414  
Трипсиноген 182  
Триптаза 60, 182  
Тромбин 106  
Тромбоксан 186, 189  
Тромбоспондин 67, 125, 147, 369

Тромбоцитопения 675  
Тропонин 357

**У**

Убиквитин 411  
Узел лимфатический 33, 372  
Участок, определяющий  
    комплементарность (CDR) 238

**Ф**

Фабрициева сумка 33, 299, 342, 358  
Фаголизосома 132  
Фагосома 132  
Фагоцитоз 122  
Фаза амплификации комплемента 173  
Фактор  
    Apaf-1 368  
    C/EBP 50  
    Eya1 348  
    FOXP3 333  
    G-CSF 216, 217  
    GM-CSF 51  
    H 173, 179  
    Hoxa3 348  
    I 179  
    Ikaros 49, 322  
    IRF 92  
    M-CSF 216, 217  
    MTR 294  
    Pax1 348  
    Pax9 348  
    RANTES 117  
    Six1 348  
    STAT 201  
агрегации тромбоцитов 58  
активирующий тромбоциты 190  
лейкемия-ингибирующий 213, 278  
нейротрофический цилиарный 213  
некроза опухоли  $\alpha$  211  
переноса 636  
рабдомиосаркомы 415  
ретинобластомы 369  
роста кератиноцитов ???  
роста нервов 59, 60  
роста сосудистый ???  
роста трансформирующий ???  
роста фибробластный ???  
стволовых клеток 218  
тимуса пептидный ???  
тимусный гуморальный 361–363

транскрипционный AP-1 ???  
хемотаксический 618  
Феномен  
Артюса 633  
клеток-пассажиов 555  
Овери 610  
Фибрин ???  
Фибриноген 99, 102, 125, 177, 181, 182  
Фибронектин 65, 102, 351, 527  
Фиколин 177  
Фитогемагглютинин 706  
Флагеллин 266  
Фолдинг 20  
Фолликул  
лимфоидный одиночный ???  
солитарный 379  
транзиторный 379  
Фолликулярная В-лимфома 643  
Фоновая пролиферация 474  
Форболмиристат ацетат 143, 707  
Формаган 704  
Фосфатаза  
кислая 57, 145, 150  
щелочная 55, 144  
Фосфатидилсерин 124, 144, 368, 539, 707  
Фосфолипаза 616  
Фосфолипаза С 448, 616  
Фрагмент  
F(ab')<sub>2</sub> 232  
Fab 232, 233  
Fc 232, 233  
Фракталкин 70, 71, 107, 108, 118, 152  
Фукоза 63  
Фукозидаза 55

**Х**

Хемоаттрактант 105  
Хемокин 106  
Хемокинез 105  
Хемотаксис 105, 118  
Химаза 60, 182, 618  
Химеризм 566  
Хитобиоза 240  
Хлорамин 137  
Холангит склерозирующий 672  
Хондроитинсульфат 60, 108, 150, 583, 618  
Хориокарцинома 543

**Ц**

Центр зародышевый 454  
Центробласт 455

Цепь  
J 240  
иммуноглобулина 231  
Церамид 164, 212, 288, 337, 369, 485  
Циклин 415, 544, 545  
Циклооксигеназа 93, 186  
Цитокератин 427  
Цитокин 35, 190  
лимфопоэтический 360  
супрессорный 510  
Цитолиз  
Fas-зависимый 439  
антителозависимый  
клеточноопосредованный ???  
Т-клеточный иммунный ???  
Цитомегаловирус 527  
Цитотрофобласт ворсинчатый 583  
Цитохалазин 143  
Цитохром с 368  
Цитрулин 597  
Цитруллин 137

**Ч**

Чужеродность антигена 264

**Ш**

Шаперон 291  
Шарнирный участок 239  
Шединг 96, 98  
Шок  
анафилактический 609  
гемотрансфузионный ???

**Щ**

Щелочная фосфатаза 55, 144

**Э**

Эйкозаноид 58, 106, 145, 186  
Экспансия пролиферативная 414  
Эластаза 57, 67, 121, 135, 141, 142, 144, 145, 182  
Элиминация клонов лимфоцитов 572  
Эмбриональный парабиоз 567  
Эндогликан 98  
Эндорфин 67  
Энцефаломиелит аутоиммунный ???  
Эозинофил 57  
Эотаксин 57, 58, 118, 302, 422, 490

Эпидермиоцит отросчатый белый 74  
Эпитоп 20, 30, 271  
Эстераза 175, 659  
    неспецифическая 67  
Эффект гормезиса 692

**Я**

Язвенный колит 579, 589, 596, 670

**5**

5'-Нуклеотидаза 55, 67, 134, 140

**В**

В-лимфобласт ???  
В-лимфоцит 313, 314, 508

**С**

С3-конвертаза 173, 180

**Ј**

Ј-цепь 236, 240

**Н**

NADPH-оксидаза 67, 134  
NO-синтаза 137  
N-ацетилглюкозаминидаза 55

**Р**

Р-селектин 119