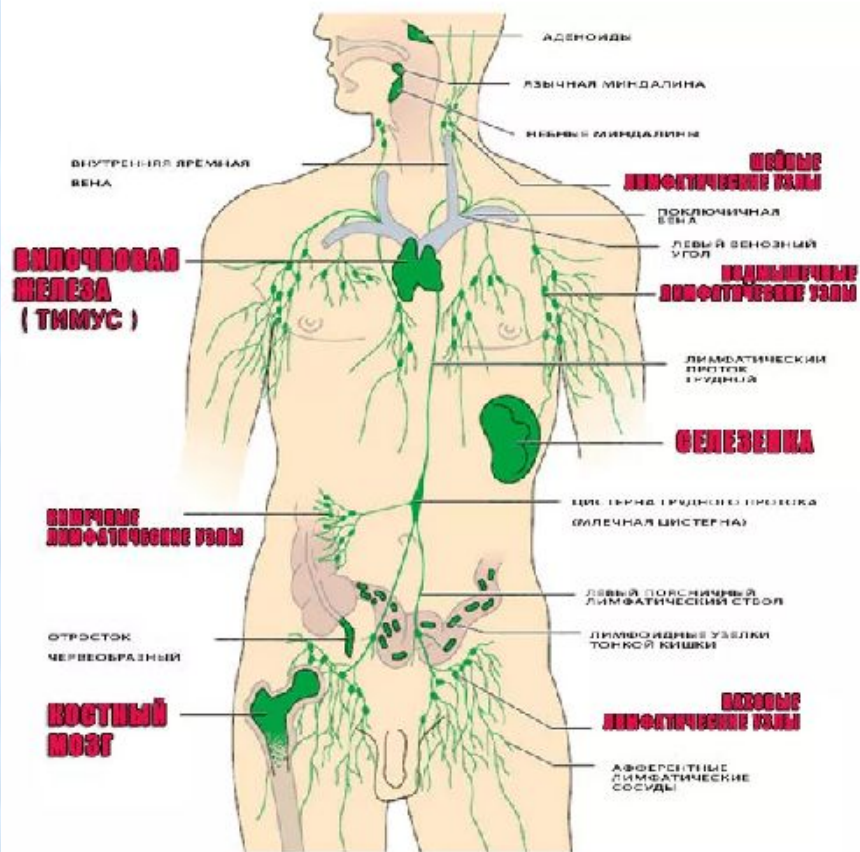




**Лаборатория ферментов репарации (д.х.н., профессор
Г.А. Невинский)**

Органы иммунной системы человека



Их делят на два основных типа:

центральные органы;

периферические органы иммунной системы.

Центральные органы – это красный костный мозг и тимус, называемый ещё вилочковая железа.

Периферические органы – это селезенка, все лимфатические узлы на теле и пейеровы бляшки.

Красный костный мозг

Это вещество, которое заполняет всё внутреннее пространство костной губчатой ткани. Самая большая концентрация красного костного мозга содержится в самых концах длинных костей.

Основные функции красного костного мозга – это кроветворение и формирование иммунитета, так называемый иммуногенез. Он всегда работает в постоянном режиме и воспроизводит кровяные клетки — лейкоциты, эритроциты и тромбоциты.

Тимус (вилочковая железа)

Это эндокринная железа, которая расположена в верхней части грудной клетки, за грудиной. Она играет важнейшую роль в формировании иммунитета и стимулирует развитие «тимусных клеток» в ткани.

Эти клетки распознают и атакуют попавшие в организм извне чужеродные вещества, вирусы и бактерии, а также они контролируют выработку антител.

Основные функции селезёнки:

- высвобождение накопленной крови, повышение общего кровоснабжения организма и обогащение тканей тела кислородом;
- разрушение отживших эритроцитов;
- служит как главный источник лимфоцитов;
- является фильтром для всякого рода опасных бактерий, производит антитела и обеспечивает организму детоксикацию

Лимфатические узлы

Это многочисленные органы иммунной системы. У взрослого человека их около пятисот. Они расположены по пути тока лимфы. Это такие образования круглой или овальной формы, размер которых от 2 до 20 мм. Находятся они в местах слияния лимфатических сосудов — под мышками, в паху, в шее, в области таза.

Лимфатический узел состоит из соединительнотканной капсулы и лимфоидной ткани. Он служит барьером для распространения инфекции и раковых клеток по организму. В лимфатическом узле образуются лимфоциты, которые активно участвуют в уничтожении чужеродных веществ и клеток.

Основные функции лимфатических узлов: задержка бактерий и вирусов по пути тока лимфы; кроветворная функция.

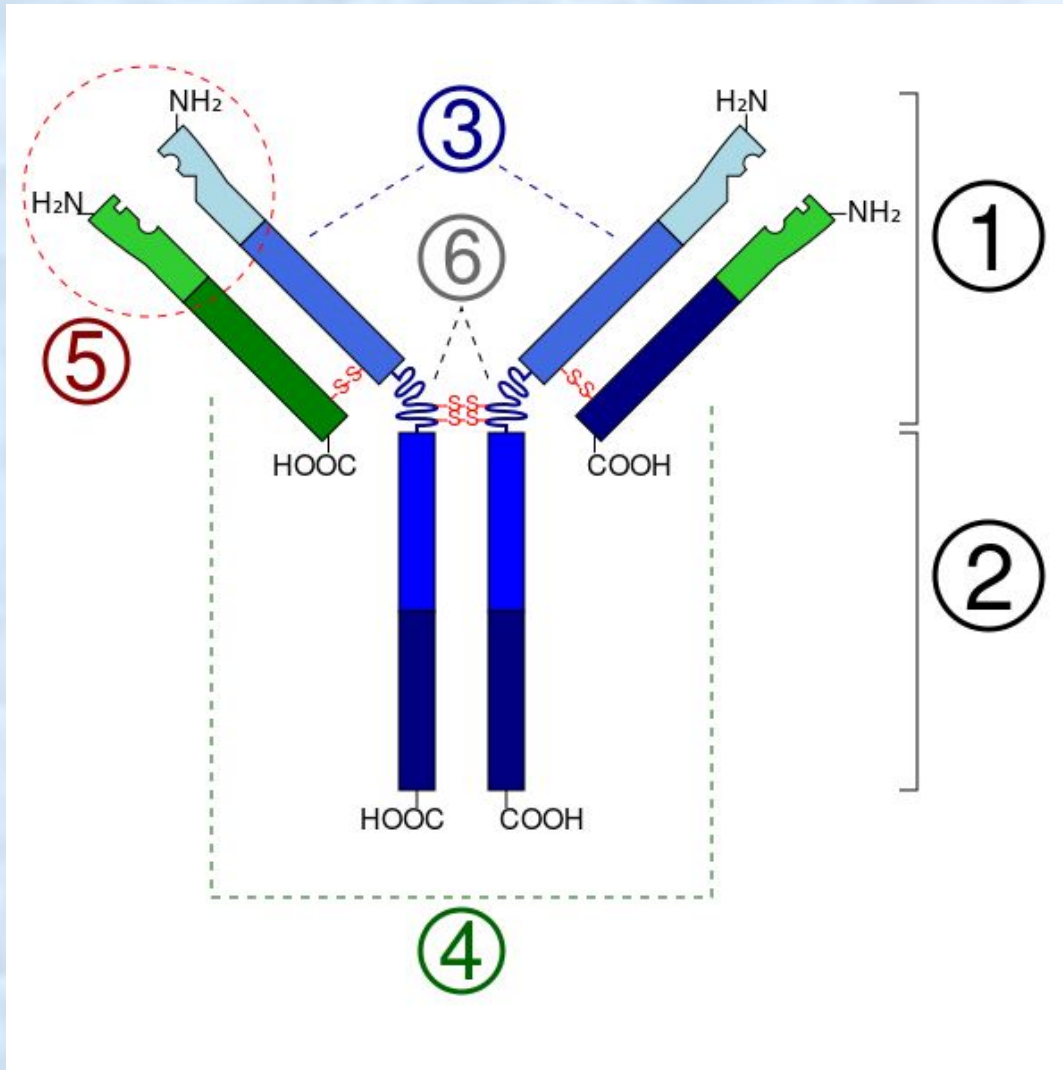
Пейеровы бляшки

Это узелковые скопления овальной или круглой формы, которые находятся в лимфоидной ткани. Располагаются они в слизистой оболочке тонкой кишки. Их диаметр — от 0,5 до 3 мм.

Основные функции пейеровых бляшек:

- участие в процессе созревания Т- и В-лимфоцитов;
- формирование иммунного ответа организма.

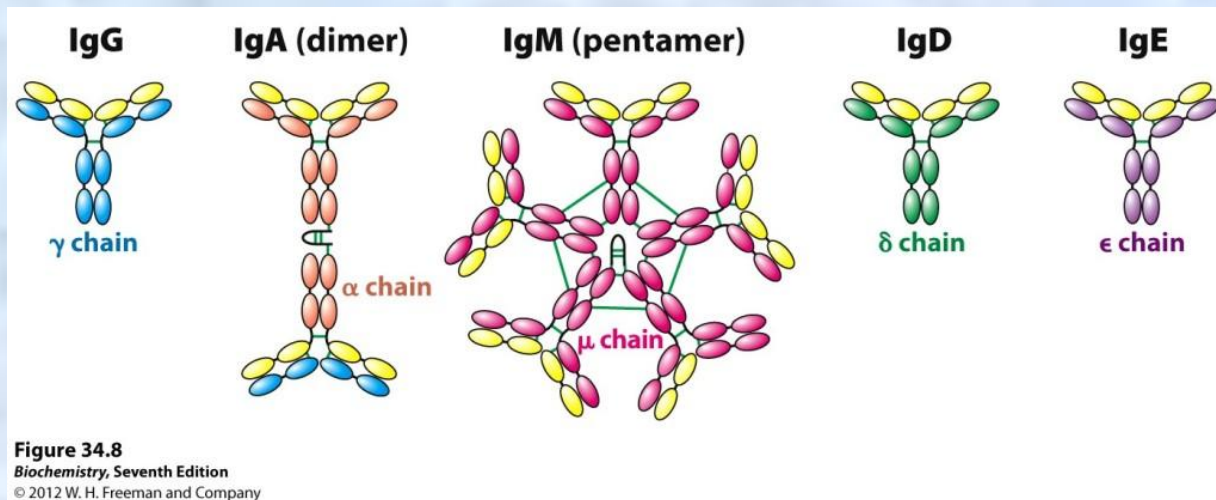
Общий план строения иммуноглобулинов класса IgG



Общий план строения иммуноглобулинов класса IgG:

- 1) Fab;
- 2) Fc;
- 3) тяжёлая цепь;
- 4) лёгкая цепь;
- 5) антиген-связывающийся участок;
- 6) шарнирный участок

Это основной класс иммуноглобулинов, содержащихся в сыворотке крови (70-75% от всех антител); представлен четырьмя подклассами (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), обеспечивает иммунитет, направленный на нейтрализацию вредных токсических веществ



IgM начинает вырабатываться сразу после попадания неизвестного чужеродного агента в организм, являясь первой линией защиты от антигенов; в норме его количество – **около 10%** от общего числа иммуноглобулинов; антитела класса M - наиболее крупные

IgA В сыворотке крови его содержание - **около 15-20%** от всех иммуноглобулинов; он находится в основном в мономерной форме, а в молоке – димерной форме (**sIgA**), где две молекулы соединены секреторным компонентом. Его основная функция – защита слизистых оболочек от микроорганизмов и других чужеродных веществ, поэтому его также называют секреторным; иммуноглобулины класса A обнаруживаются в секретах слюнных и слезных желез, молоке, на слизистых оболочках дыхательной и мочеполовой систем

Иммуноглобулин **E (IgE)** В норме практически отсутствует в крови; участвует в возникновении аллергических реакций, защите от паразитарных инфекций

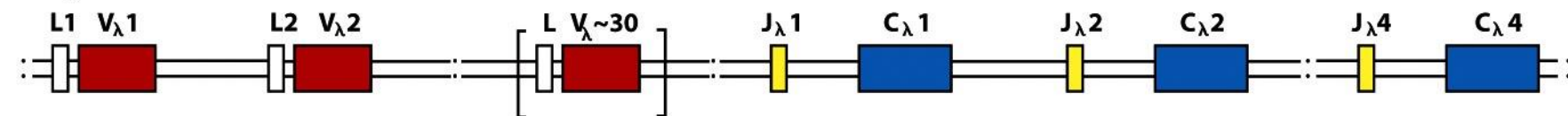
IgD В норме его концентрация в крови крайне мала (менее 1% от общего количества антител), а функции до конца неясны

ГЕНЕТИКА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

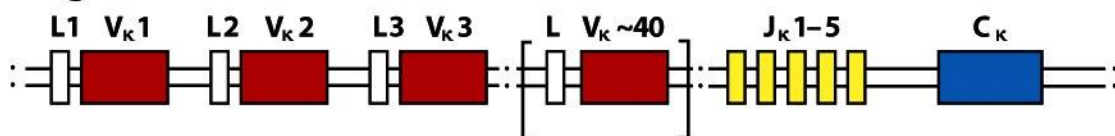
В биологии существует принцип «один ген — одна полипептидная цепь». Однако в случае Ig есть несколько генов, которые кодируют одну полипептидную цепь.

Иммуноглобулины контролируются и создаются тремя семействами генов, расположенными в разных хромосомах. Одно семейство генов кодирует синтез всех классов тяжелых цепей (H), другое — синтез легких каппа-цепей (каппа-L), а третье — синтез легких ламбда цепей (лямбда-L).

λ light-chain locus



κ light-chain locus



Heavy-chain locus



Figure 4-4 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Number of functional gene segments in human immunoglobulin loci			
Segment	Light chains		Heavy chain
	κ	λ	H
Variable (V)	40	30	40
Diversity (D)	0	0	25
Joining (J)	5	4	6

Figure 4-3 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Исходные структуры генов ДНК, используемые для создания ДНК, кодирующих синтез иммуноглобулинов

V – переменные сегменты ДНК (variable)

J – связывающие сегменты ДНК (joining)

D - сегменты разнообразия (diversity)

C – константные части будущих цепей

Исходная зародышевая ДНК для создания легких цепей

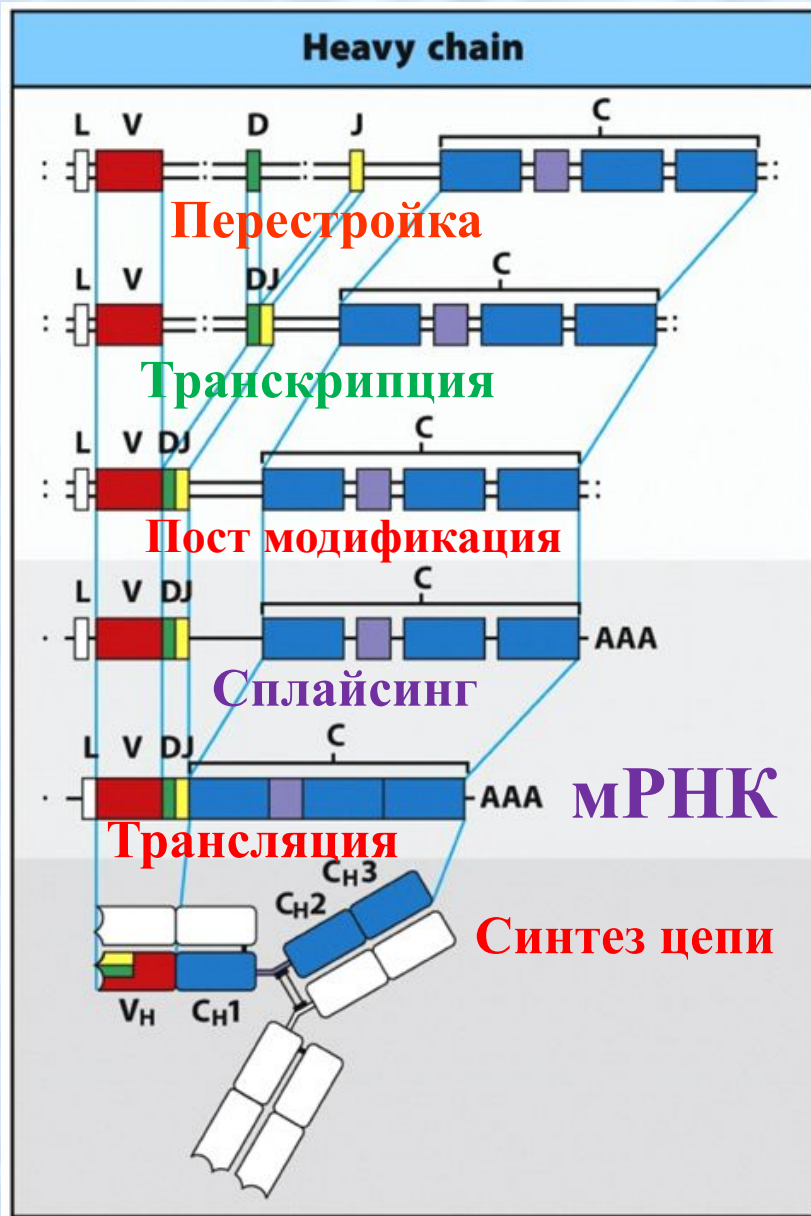


Перестройка ДНК из разных фрагментов V и J сегментов

Кодирующая ДНК для каждой из легких цепей иммуноглобулинов собирается в зависимости от антигена из разных сегментов, извлекаемых из отдельных кластеров переменного сегмента ДНК
В начале получается первичный РНК-транскрипт

Затем в результате сплайсинга первичного транскрипта образуется мРНК

мРНК поступает на рибосому и в результате трансляции происходит синтез легкой цепи антител



Перестройка зародышевой ДНК для тяжелых цепей происходит из разных фрагментов V, J и D сегментов

Кодирующая ДНК для каждой из тяжелых цепей иммуноглобулинов собирается в зависимости от антигена из разных сегментов, извлекаемых из отдельных кластеров переменного сегмента ДНК

В начале получается первичный РНК-транскрипт

Затем идет его пост-модификация с добавлением AAA -фрагментов

Затем в результате сплайсинга первичного транскрипта образуется мРНК

мРНК поступает на рибосому и в результате трансляции происходит синтез тяжелой цепи антител

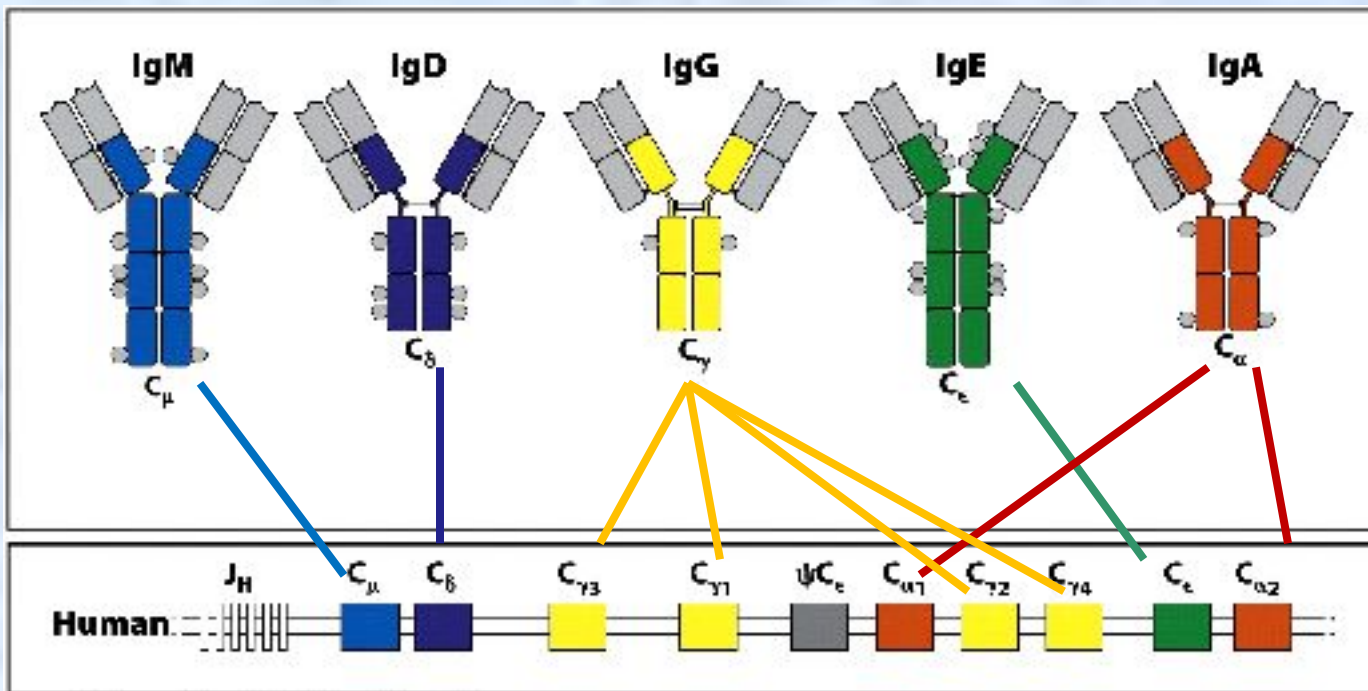


Figure 1-17 Immunobiology, 7ed, © Garland Science 2008

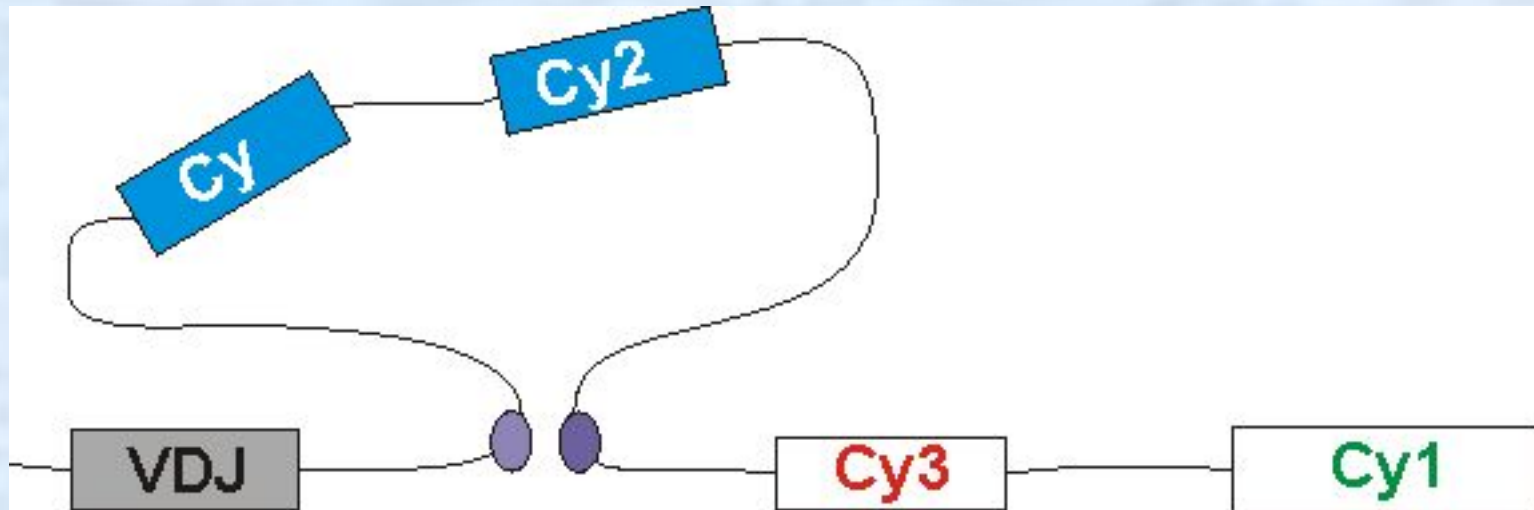
При синтезе антител разных классов происходит переключение к набору фрагментов из разных частей константных частей зародышевых ДНК тяжелых цепей. Структура и мол. массы тяжелых цепей разных и целых антител отличаются.

	Immunoglobulin								
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
Heavy chain	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	μ	α_1	α_2	δ	ϵ
Molecular weight (kDa)	146	146	165	146	970	160	160	184	188
Serum level (mean adult mg ml ⁻¹)	9	3	1	0.5	1.5	3.0	0.5	0.03	5×10^{-5}
Half-life in serum (days)	21	20	7	21	10	6	6	3	2

Переключение синтеза генов, кодирующих иммуноглобулины одного класса на другой происходит с помощью рекомбинации ДНК

Например, сначала происходит синтез IgM, а позже IgG

Схема переключения с синтеза IgM на IgG3

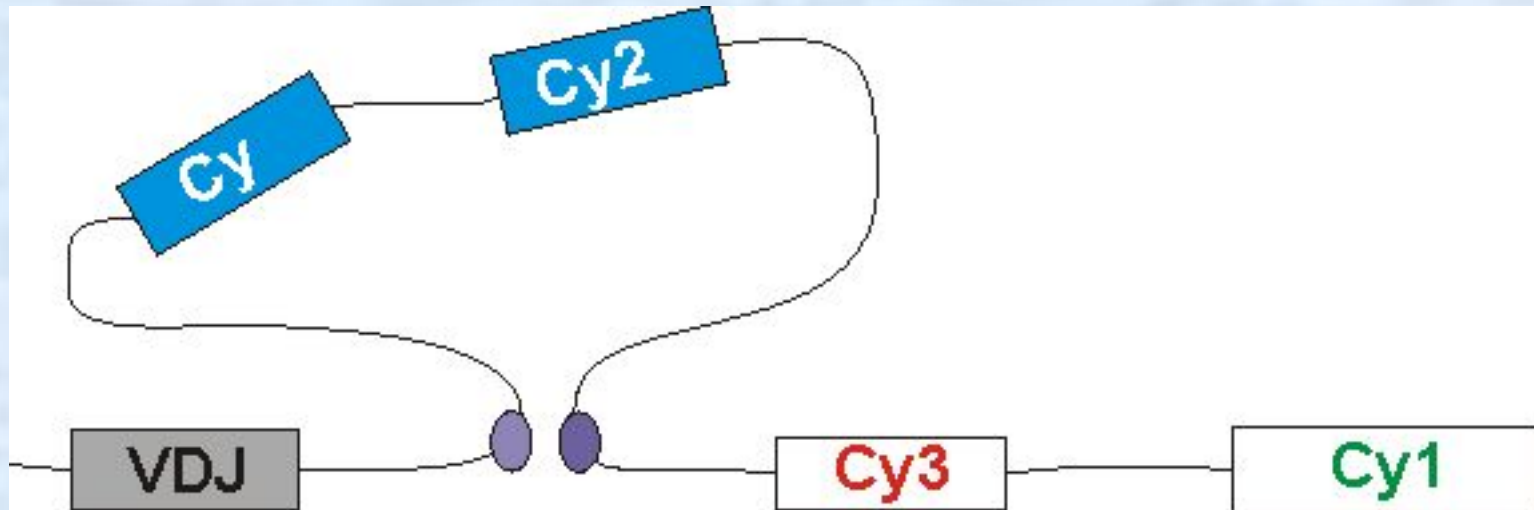


Рекомбинацию ДНК катализируют специальные ферменты *рекомбиназы*.

Переключение синтеза генов, кодирующих иммуноглобулины одного класса на другой происходит с помощью рекомбинации ДНК

Например, сначала происходит синтез IgM, а позже IgG

Схема переключения с синтеза IgM на IgG3



Рекомбинацию ДНК катализируют специальные ферменты *рекомбиназы*. В ДНК есть сигнальные последовательности для начала рекомбинации, которые фланкируют основные последовательности. Самый первый акт при рекомбинации осуществляют *гетеродимерные эндонуклеазы*

В результате рекомбинации в непрерывную цепь ДНК соединяется по *одному сегменту V-, D и J-областей* - этот процесс называется ***VDJ-рекомбинацией***

Вся остальная ДНК V-, D и J-областей **вырезается и выбрасывается** из генома. Поэтому приобретение B-лимфоцитом в результате своей дифференцировки специфичности по отношению к антигену происходит раз и навсегда и строго необратимо на уровне ДНК.

В каждом единичном B-лимфоците получается своя специфическая уникальная комбинация ***VDJ*** для тяжелой и ***VJ*** для легкой цепей

Теоретически В результате рекомбинаций число вариантов антител по одной специфичности к одному антигену исходя из правил случайной рекомбинаторики Каппа цепь - **200 ВАРИАНТОВ** V-области

Ламбда-цепь - **120 вариантов** V-области

Всего **320 ВАРИАНТОВ** V-области легкой цепи

Для тяжелой цепи **всего -9000 ВАРИАНТОВ**

В целом, в молекулах иммуноглобулинов разные цепи легких и тяжелых цепей объединяются в тетрамер L_2H_2 также случайным образом.

В ИТОГЕ: число случайных сочетаний составляет примерно
около **трех миллионов**

Дополнительное разнообразие получается в результате гипермутагенеза - **ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ**

Не все варианты рекомбинаций абсолютно правильные – эффективные

Под неточностью формирования VDJ понимают тот факт, что иногда при рекомбинации происходит включение лишних нуклеотидов, которые возникают на концах сегментов при вырезании одноцепочечных петель ДНК и достройки хвостов ферментами репарации.

Это приводит к тому, что добавление некодируемых нуклеотидов сдвигает рамку считывания в матричной РНК.

Платой за неточность и синтез неверных иммуноглобулинов является то, что 2/3 лимфоцитов со временем погибает и остается только примерно 30 %, синтезирующих наиболее эффективные антитела.

При этом в реальной действительности количество лимфоцитов, синтезирующих антитела против одного антигена намного меньше, чем это возможно теоретически

Одним из четких показателей повышенной техногенной нагрузки у различных групп населения является повышенный процент индивидов, проявляющих признаки аутоиммунных заболеваний

Самыми опасными факторами риска для возникновения аутоиммунных заболеваний являются: повышенный уровень радиоактивности и повышение концентрации вредных веществ (мутагенов, канцерогенов, токсичных соединений)

В настоящее время известно около 80 различных аутоиммунных заболеваний, среди которых наиболее широко распространены:

Системная красная волчанка

Полиартрит и полимиозит

Рассеянный склероз

Аутоиммунный тиреоидит

В норме иммунная система человека четко различает “свое” и “чужое”. В крови здоровых людей отсутствуют антитела к собственным компонентам: белкам, ДНК, РНК, полисахаридам, липидам и т.д. или концентрация таких антител очень низкая.

Основной составляющей патогенеза аутоиммунных заболеваний является наработка аутоантител – антител к собственным компонентам организма.

Повышенный титр антител к ДНК наблюдается в первую очередь у больных системной красной волчанкой. Однако ввиду того, что иммунные заболевания имеют разные фазы протекания: пассивное или активное обострение, ремиссия и т.д. повышенный по сравнению с нормой титр анти-ДНК антител обнаруживается только у 30-38 % больных.

Кроме того, повышенный титр анти-ДНК антител наблюдается у больных с полимиозитом (38 %), рассеянным склерозом (17-18 %), и ряде других аутоиммунных заболеваний (6- 20 %).

Фундаментальным и наиболее исследованным свойством иммуноглобулинов является их способность связывать и нейтрализовать самые разнообразные по структуре соединения – антигены.

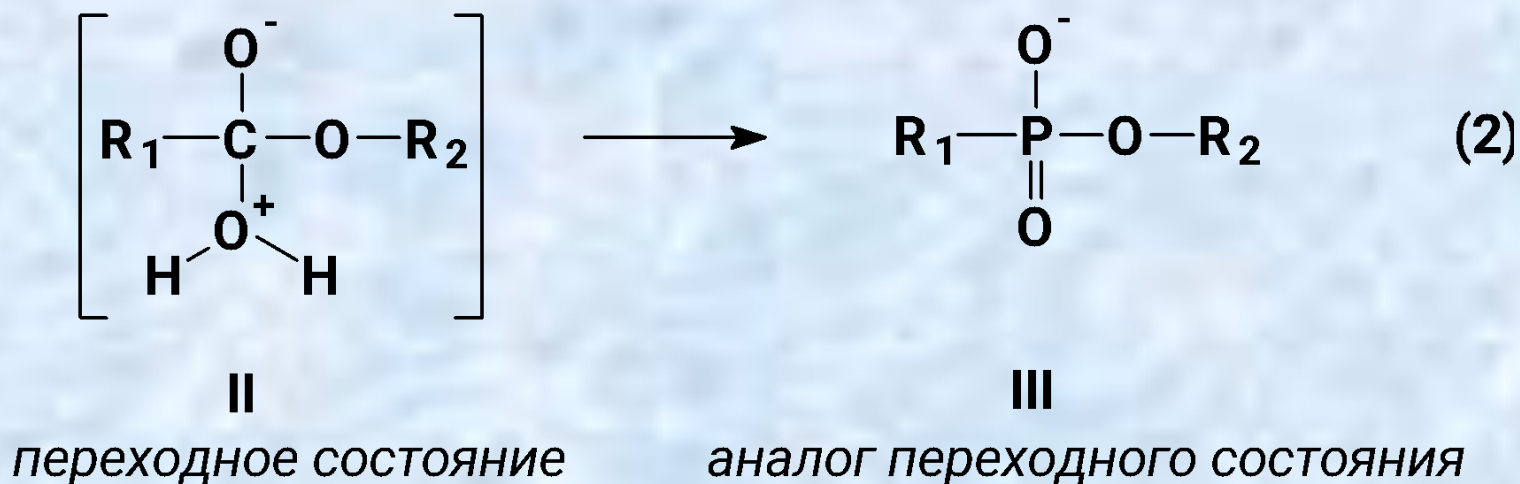
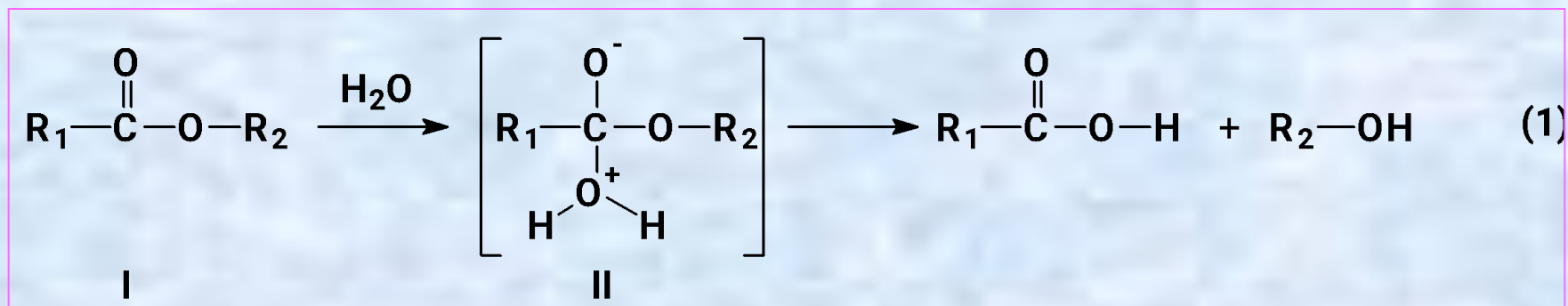
Однако за последние два десятилетия открыты первые природные антитела с каталитической активностью, катализирующие самые разные химические реакции

Антитела-ферменты (AntiBody - enzyme) получили название “абзимы” (ABZYME)

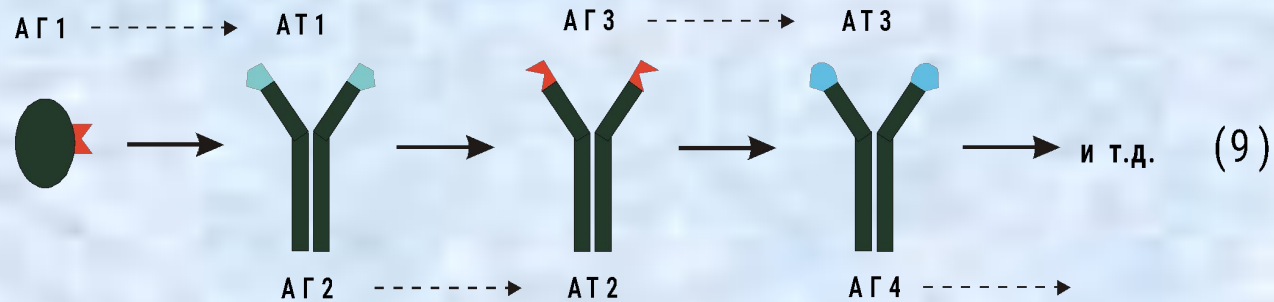
Такие антитела появляются в биологических жидкостях больных различными аутоиммунными заболеваниями

В настоящее время показано существование двух путей наработки антител ферментов.

Первый путь – наработка антител к молекулам, моделирующим переходные состояния химических реакций



Еще одним путем генерации индуцированных абзимов является аутоиммунизация организма различными ферментами и наработка антител против активных центров ферментов.



Активный центр фермента в этом случае играет роль первого антигена (**АГ1**), на который вырабатываются первые идиотипические **АТ1**, которые являются слепком с активного центра фермента. **АТ1** в свою очередь также являются антигеном, на который вырабатываются вторичные –антиидиотипические **АТ2**, которые содержат элементы, соответствующие внутреннему образу активного центра фермента и могут обладать каталитической активностью. Согласно сети Эрне могут быть вплоть до нескольких этапов наработки антител – экспериментально показано формирование **АТ4**

К настоящему моменту открыты природные абзимы, гидролизующие:

- 1. Белки**
- 2. ДНК**
- 3. РНК**
- 4. Полисахариды**
- 5. Нуклеотиды (АТФ и т.д.)**

ФОСФОРИЛИРУЮЩИЕ:

- 1. Белки**
- 2. Липиды**
- 3. Полисахариды**

С функциями фермента пероксидаз и оксидоредуктаз

К настоящему моменту показано, что ДНК-гидролизующие абзимы отсутствуют у здоровых доноров, но есть в крови пациентов с :

1. Системная красная волчанка

2. Рассеянный склероз

3. Полиартрит и полимиозит

4. Аутоиммунный тиреоидит (Тиреоредит Хашимото)

5. ВИЧ-инфекция

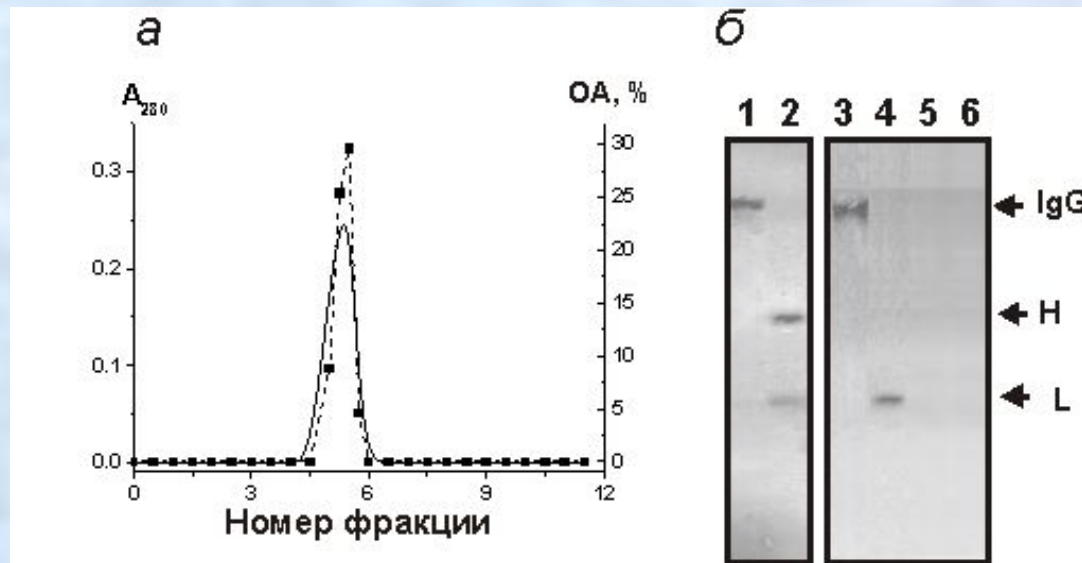
6. Клещевой энцефалит

7. Вирусный гепатит

8. Шизофрения

9. Сахарный диабет

10. Кровь и молоко лактирующих женщин

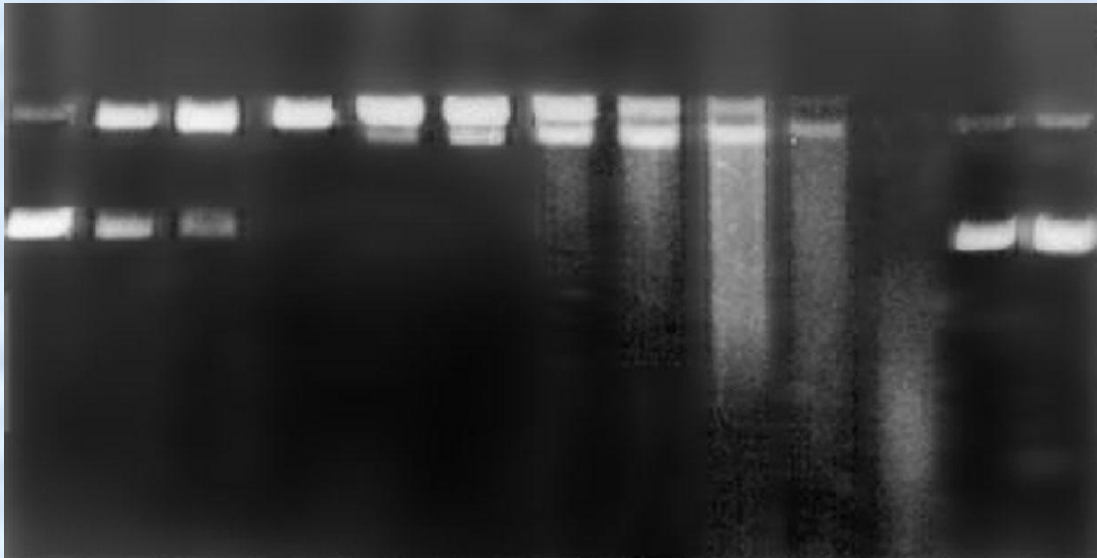


- а) Совпадение положения пиков IgG и ДНКазной активности при гель-фильтрации в кислом буфере
- г) Совпадение положения полос белковых и ДНКазной активности после SDS-PAGE с использованием геля, содержащего ролимерную ДНК

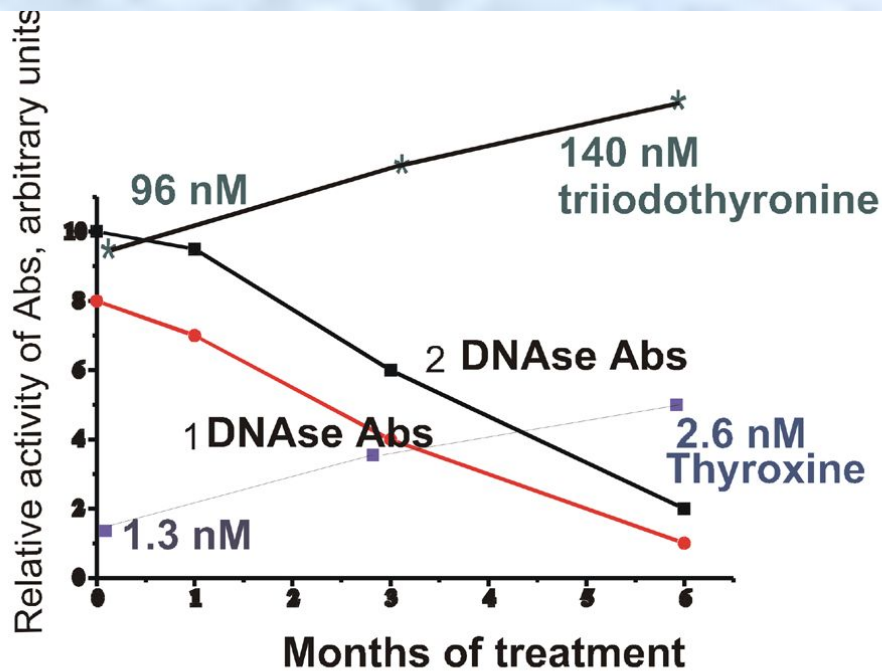
Относительная активность ДНК-гидролизующих антител очень сильно зависит от пациента

Относительная активность антител 10 пациентов

K₁ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 K₂ K₃



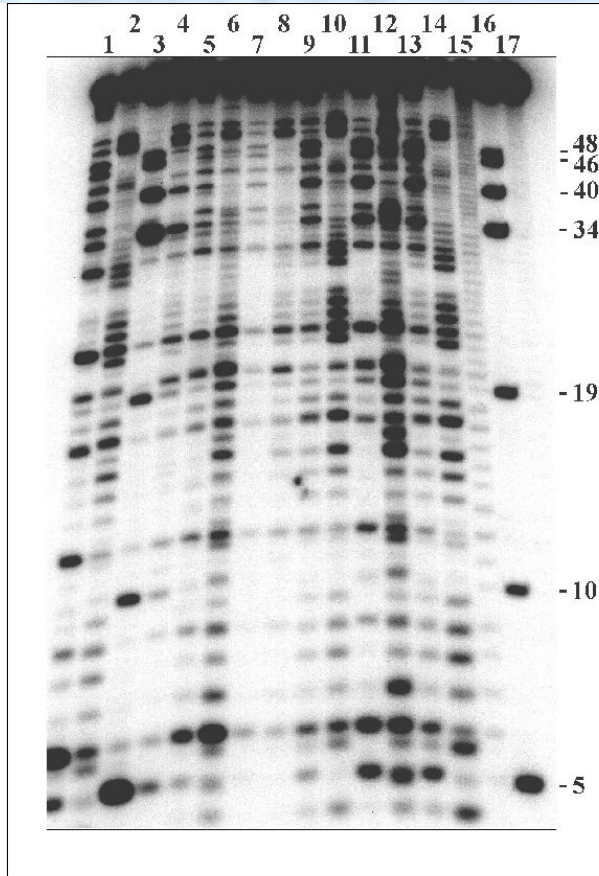
Показано, что анализ относительной активности антител в гидролизе ДНК может быть использован для оценки глубины аутоиммунных реакций при аутоиммунных заболеваниях



Эффект лечения больных аутоиммунным тиреоидитом плаквинилом

Падение активности ДНК-гидролизующих антител и нормализация концентрации гормонов при лечении больных аутоиммунным тиреоидитом иммунокорректирующим препаратом плаквинилом сопряжено с нормализацией остальных биохимических и иммунологических индексов заболевания

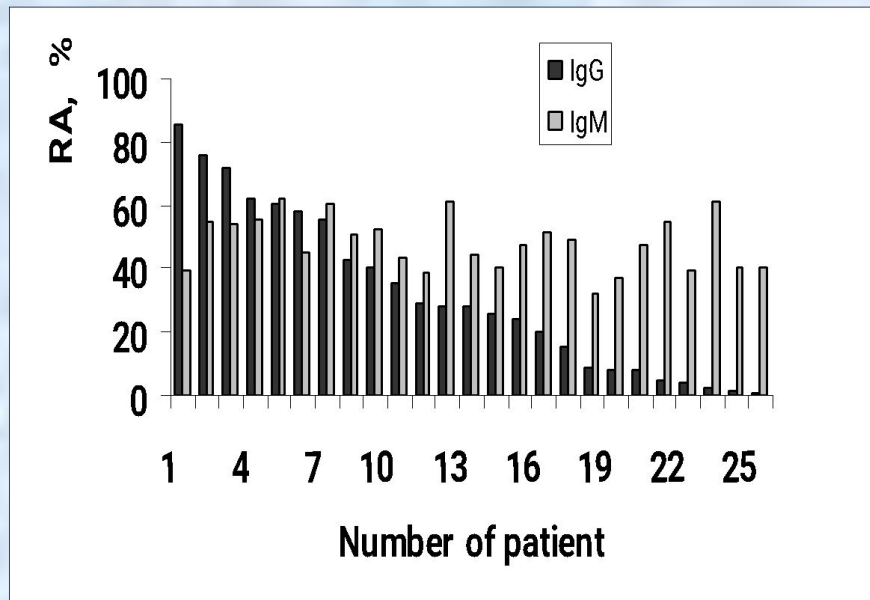
Относительная активность и субстратная специфичность РНК-гидролизующих антител очень сильно зависит от типа аутоиммунного заболевания



**Гидролиз тРНК антителами
Из крови пациентов с
Разными заболеваниями
происходит по разным
сайтам**

**ВАРИАЦИИ субстратной специфичности антител из крови
больных различными аутоиммунными заболеваниями и молока
лактующих женщин (гидролиз тРНК^{Phe})**

Впервые показано, что абзимы крови больных рассеянным склерозом специфично гидролизуют основной белок миелина – белково-липидной оболочки аксонов, такие активности появляются на ранних стадиях заболевания и анализ их активности может быть использован для диагностики заболевания.



Активность IgG антител существенно ниже, чем IgM абзимов; у здоровых доноров такой активности иммуноглобулинов нет

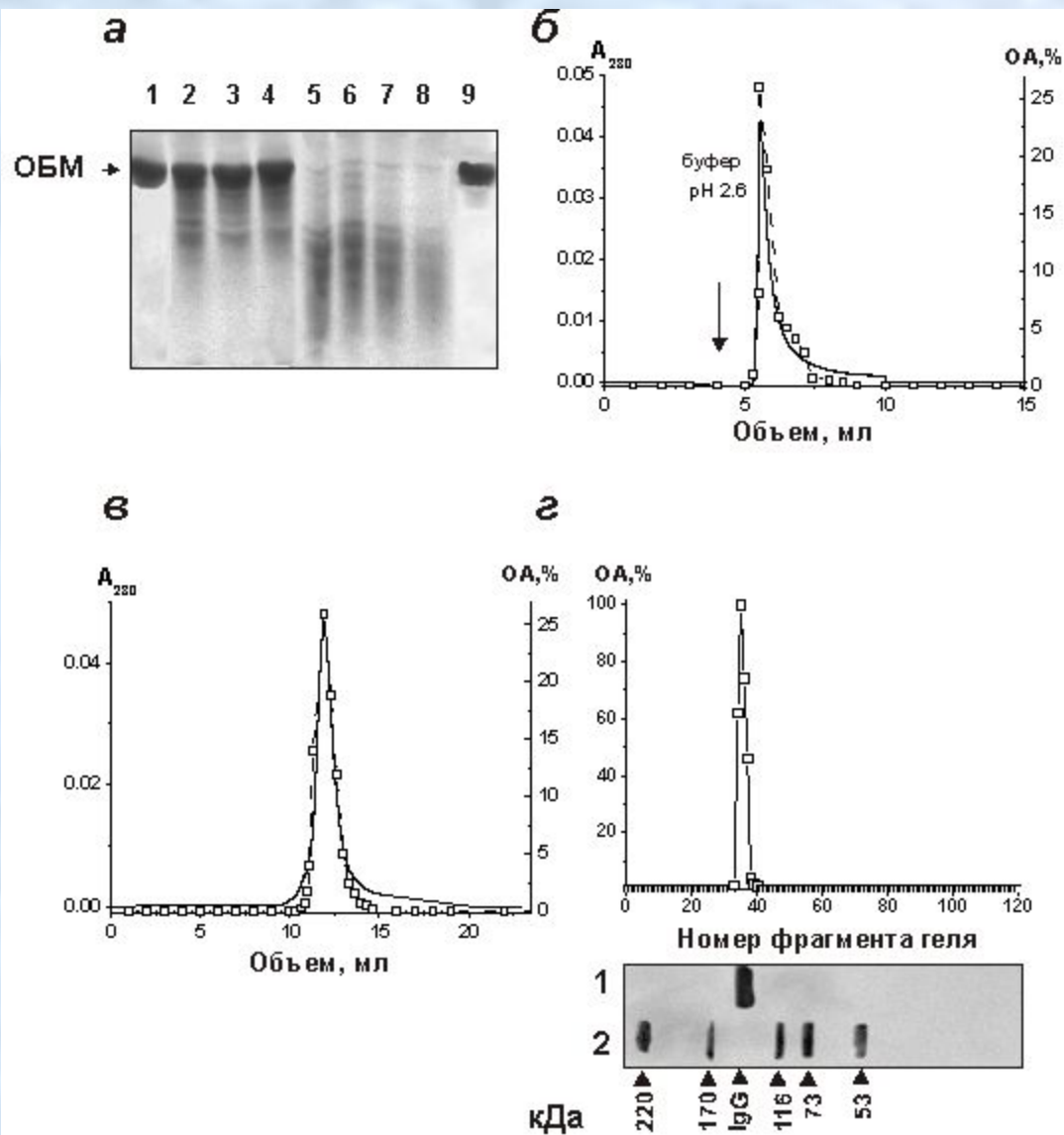
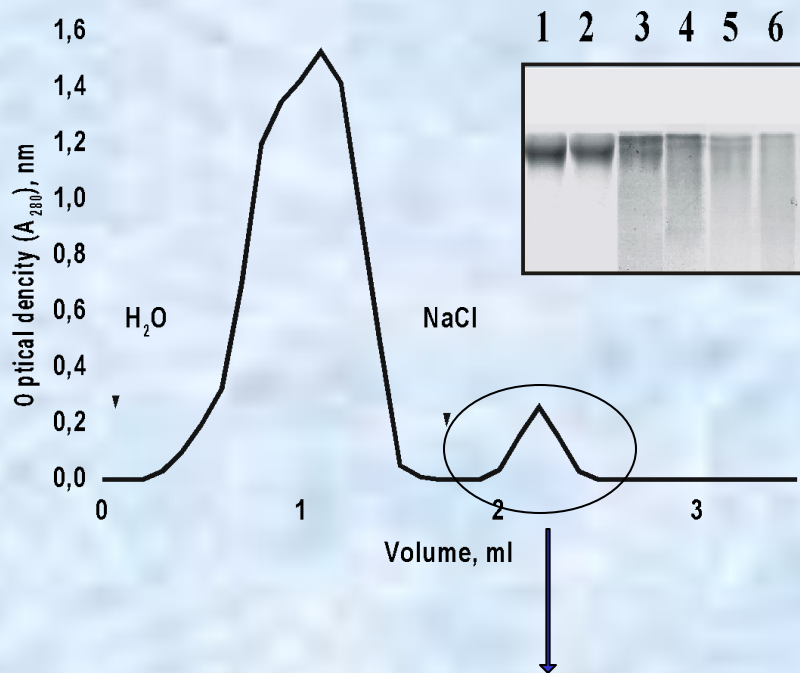


Рис. 2

- а) Гидролиз ОБМ**
- б) Адсорбция АТ человека антителами мышей против IgG и элюция кислым буфером**
- в) Совпадение положения пиков IgG и активности при гель-фильтрации в кислом буфере**
- г) Совпадение положения пиков IgG и активности После SDS-PAGE**

На примере антител, гидролизующих основной белок миелина, нами впервые показано, что антитела с протеолитической активностью могут быть металло-протеазами



Небольшая фракция антител имеет сродство к сорбенту Chelex, связывающему металлы. Эта фракция антител гидролизует основной белок миелина только в присутствии ионов металлов:

Дорожка 1 – hMBP инкубированный без АТ, дорожки 2 – 6 в присутствии IgG: 2 – без Me²⁺ ионов, 3 – 5 мМ CaCl₂ 4 – 5 мМ CuCl₂, 5 – 5 мМ MnCl₂ 6 – 5 мМ MgCl₂.

Металло-протеаза

Зависимые и независимые от ионов металлов антитела, гидролизующие основной белок миелина обнаружены в крови пациентов с:

1.Рассеянный склероз

2.Системная красная волчанка

3.Шизофрения

В крови больных ВИЧ-инфицированных больных кроме ДНК-. РНК- гидролизующих, обнаружены антитела гидролизующие вирусные обратную транскриптазу и интегразу, а также казеин человека

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Анализ продуктов гидролиза антителами и классическими протеазами обратной транскриптазы

Дорожки 1-3 - антитела;

4, 5 –трипсин;

6, 7 – протеиназа К;

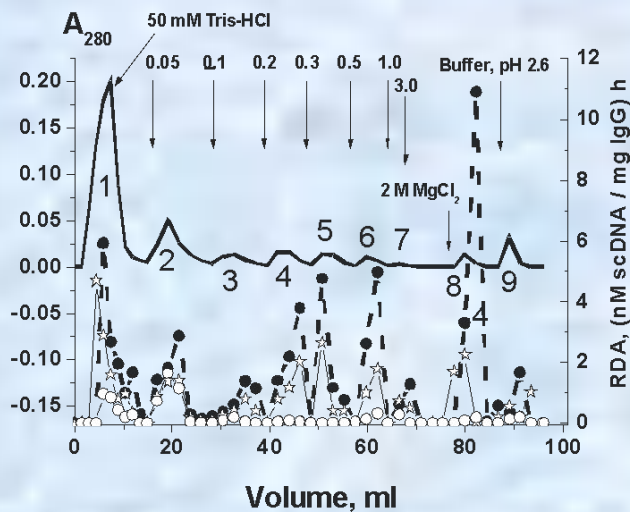
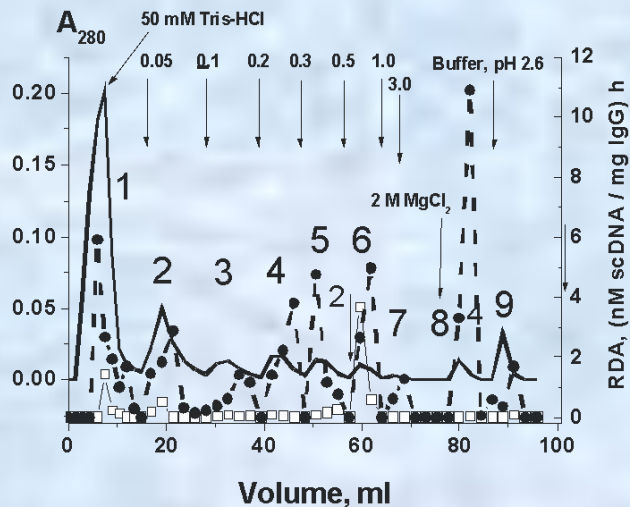
8 – химотрипсин;

9 –контроль без протеазы.

Продукты расщепления антителами и протеазами существенно различаются

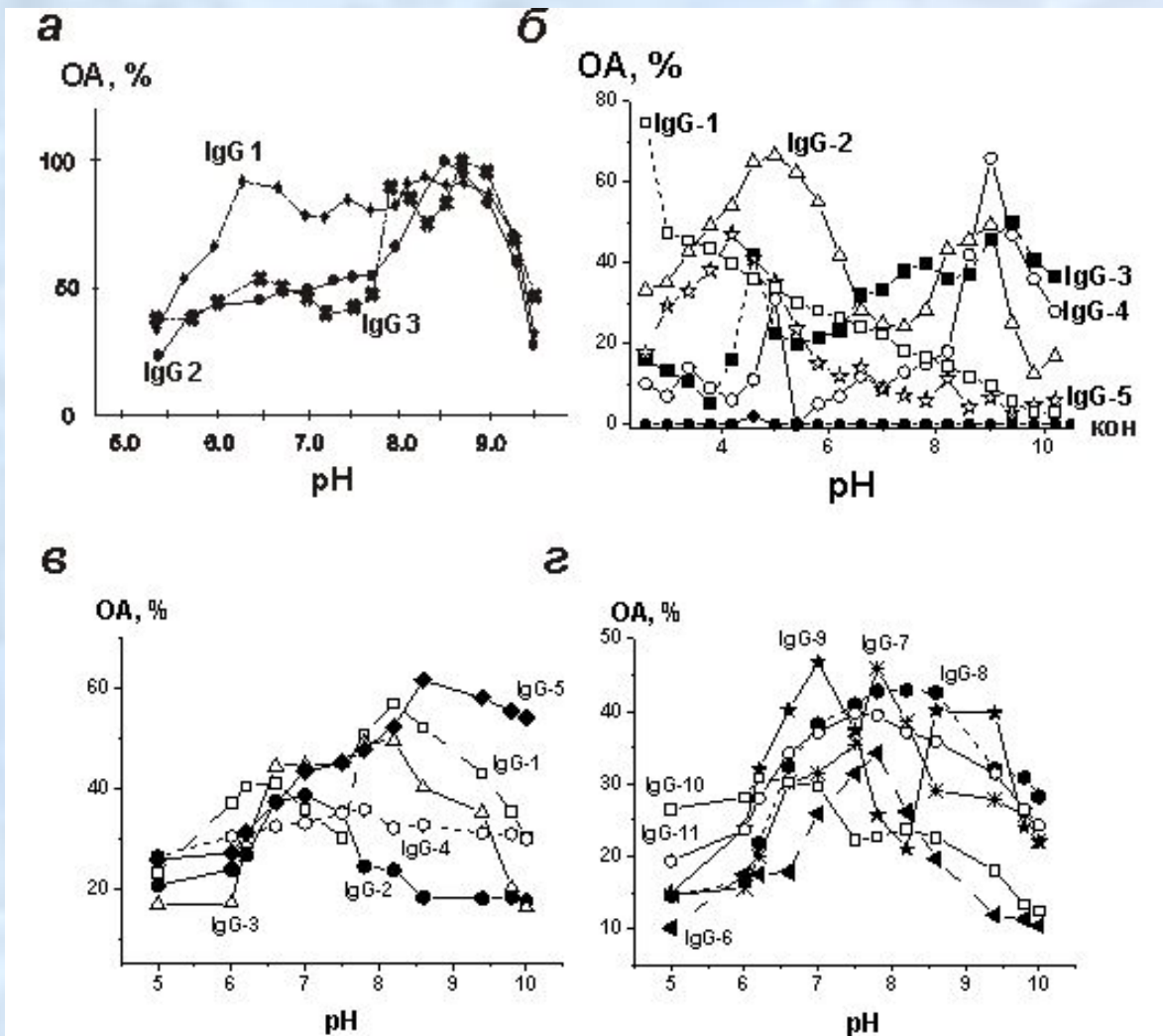
Как указывалось ранее, теоретически количество антител против одного антигена может быть очень большим – до одного миллиона. Реально их образуется в организме человека намного меньше, но все равно много.

У больных АИЗ может формироваться в зависимости от индивида и его заболевания относительно узкий или достаточно обширный набор моноклональных ДНК-, РНК- и белок- и других гидролизующих абзимов в составе поликлональных IgG, IgA и IgM, которые исключительно гетерогенны и могут содержать легкие цепи как k-, так l-типа, быть антителами разных классов и подклассов, проявлять максимальную активность при различных значениях рН, иметь различные суммарные заряды, характеризоваться разным сродством к ДНК, РНК и белкам, проявлять различную зависимость активности от ионов одно- и двухвалентных металлов, самое разное сродство к антигенам-субстратам, а абзимы с протеолитической активностью могут быть протеазами четырех разных типов – сериновыми, тиоловыми, кислыми и металло-протеазами.



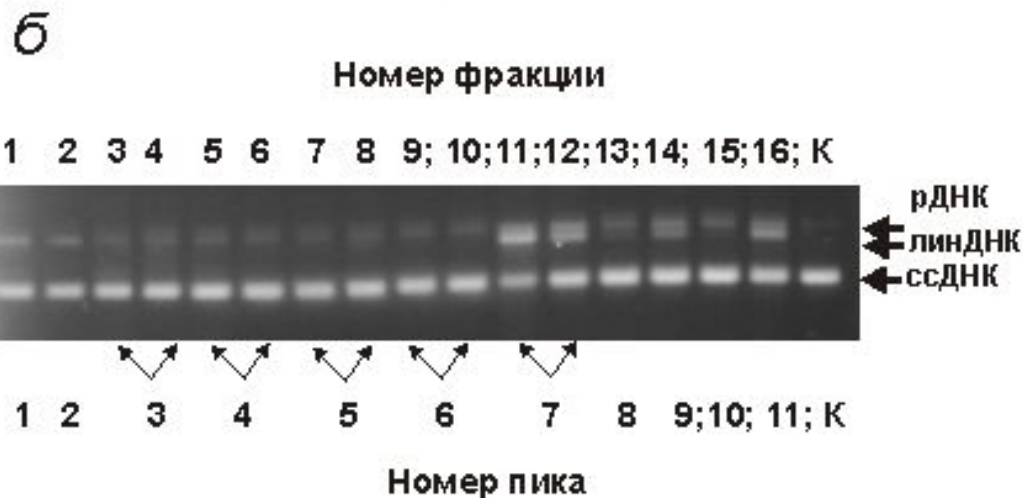
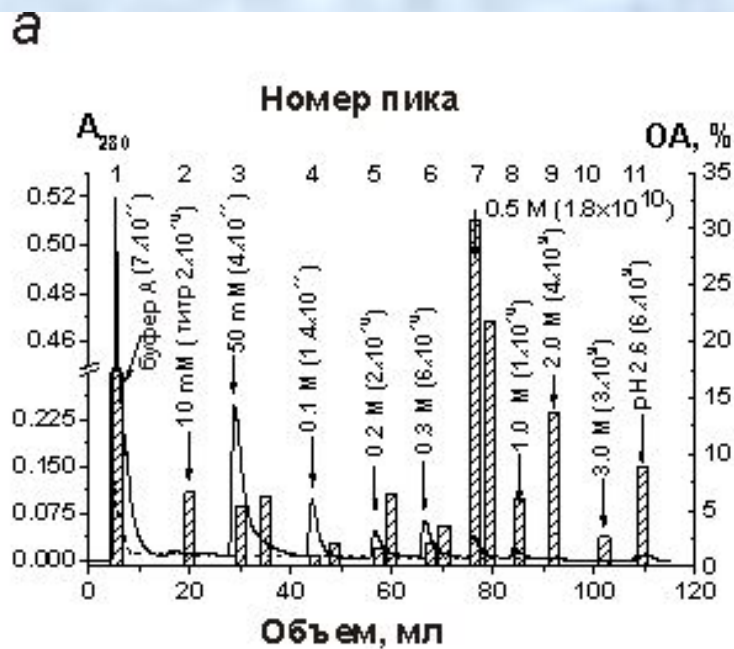
Одним из путей разделения разных абзимов является аффинная хроматография на сорбентах с иммобилизованными субстратами.

Например, аффинная хроматография антител на ДНК-целлюлозе приводит к разделению IgG с ДНКазной активностью на очень большое число подфракций. Эти подфракции демонстрируют различное сродство к ДНК и различные уровни относительной активности в присутствии и отсутствии ионов разных металлов (Mg^{2+} , Mn^{2+} и Ca^{2+}).

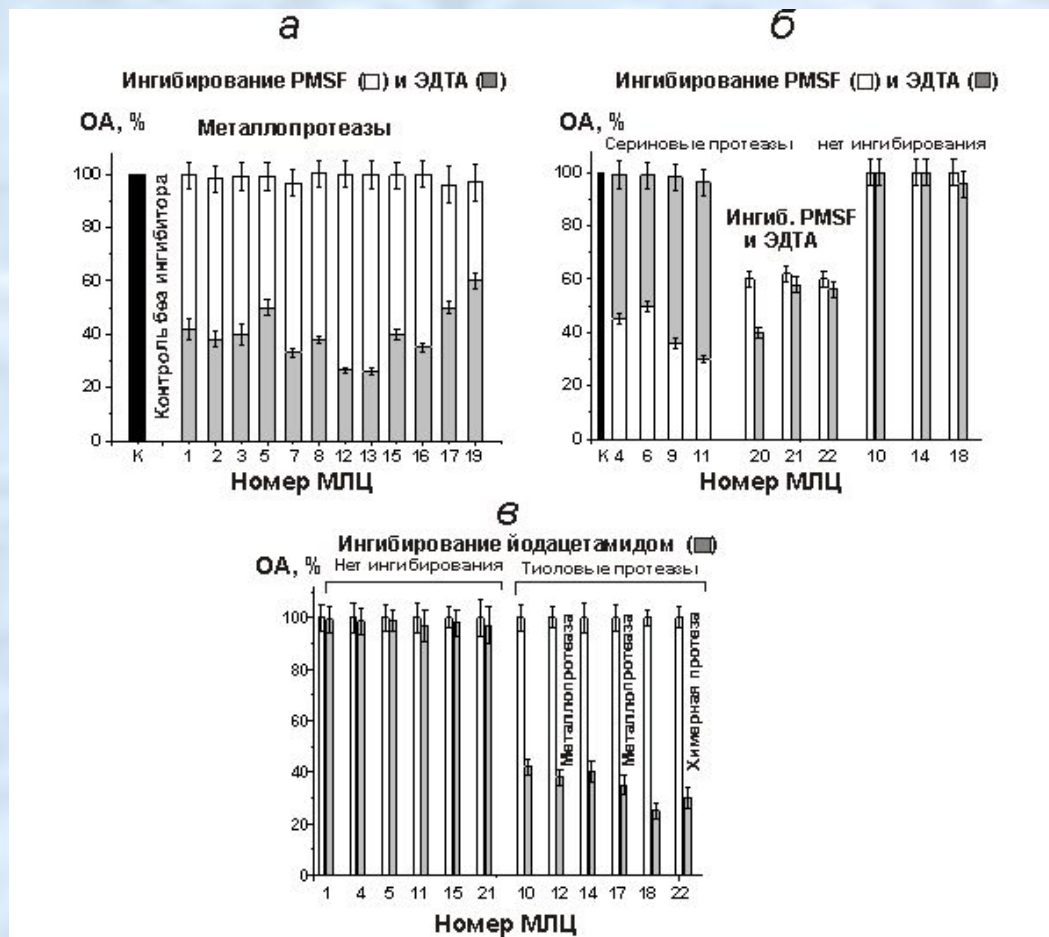


Множество разных рН оптимумов в гидролизе ДНК антителами из крови разных больных СКВ

Такое же множество разных рН оптимумов наблюдается в гидролизе антителами из крови разных больных РНК, белков, полисахаридов Нуклеотидов и т. д.



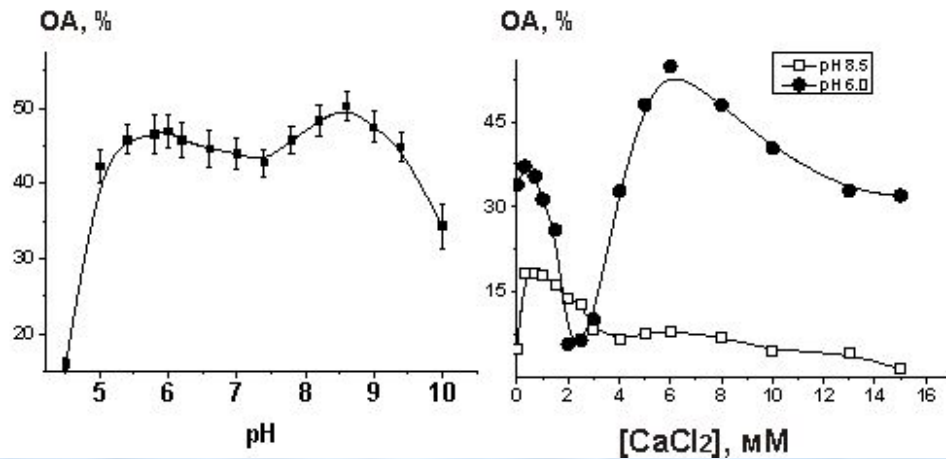
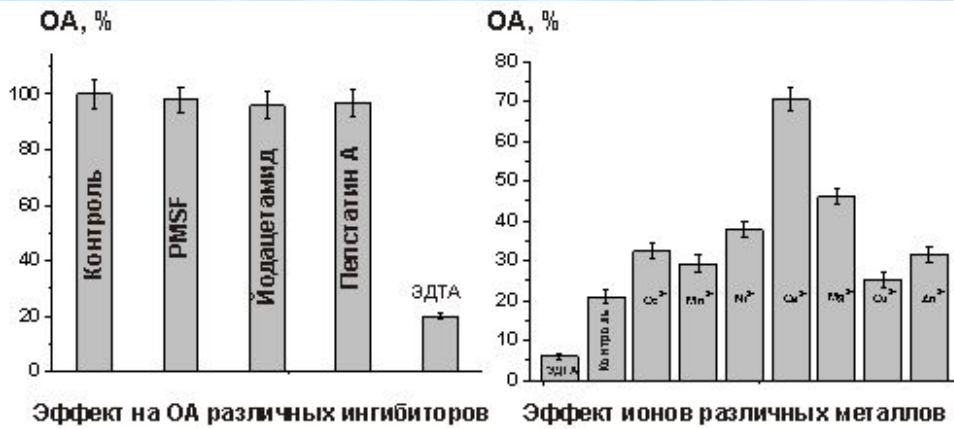
Аффинная хроматография фаговых частиц на ДНК-целлюлозе: (—) и (---), поглощение при 280 нм материала, соответствующего частицам с плазмидами, содержащими и несодержащими кДНК легких цепей, соответственно. Столбики соответствуют относительной активности.



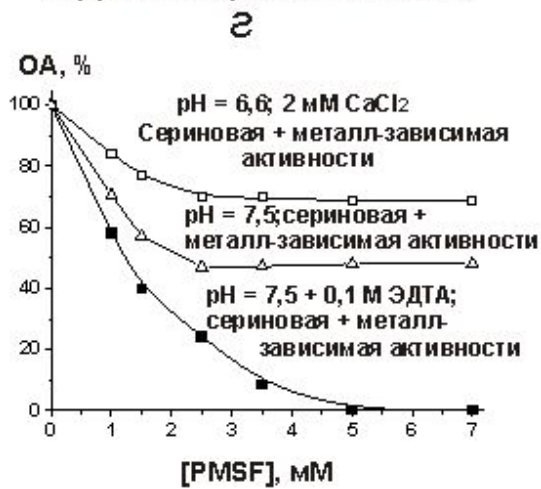
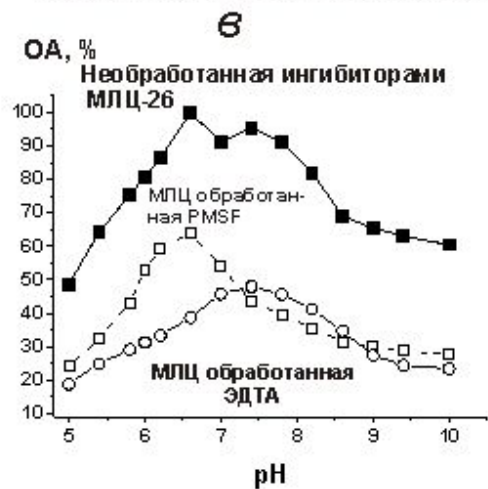
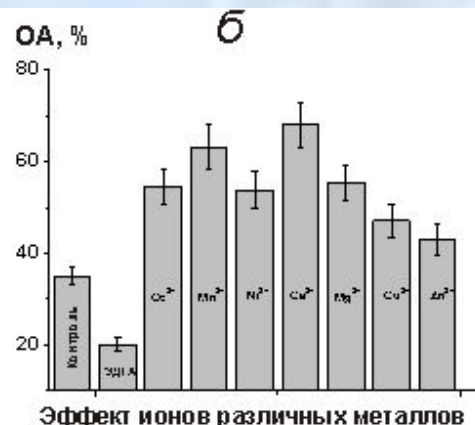
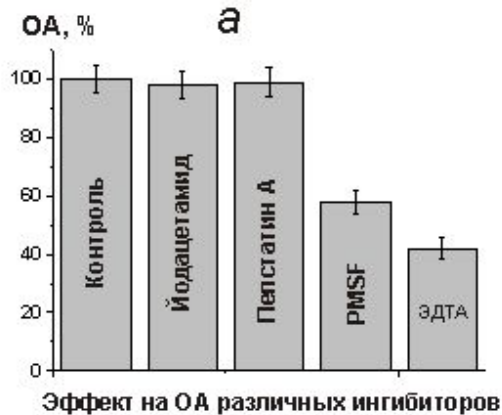
Относительная активность (ОА, %) 22 МЛЦ в гидролизе ОБМ после их предынкубации со специфическими ингибиторами трех типов протеаз; 50 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF, 1 мМ йодацетамид.

Было показано, что 12 из 22 препаратов МЛЦ (1–3, 5, 7, 8, 12, 13, 15–17 и 19) являются металлопротеазами; четыре МЛЦ (4, 6, 9, и 11) оказались сериновыми протеазами; Эффекты PMSF и ЭДТА в случае трех МЛЦ (20, 21 и 22) были сопоставимыми: ~40% и 40–60 %, соответственно Совершенно необычными оказались свойства трех других МЛЦ (18, 14 и 10); ЭДТА и PMSF не снижали активности этих препаратов. Они оказались тиоловыми протеазами.

Относительная активность моноклональной NGTA1-Me-pro в гидролизе ОБМ до и после ее предынкубации со специфическими ингибиторами протеаз четырех типов (а), в присутствии ЭДТА и ионов различных металлов (2 мМ) (б) и при различных рН реакционной смеси (в). Зависимость активности МЛЦ-25 от концентрации CaCl_2 при 6,0 и 8,5 (г)

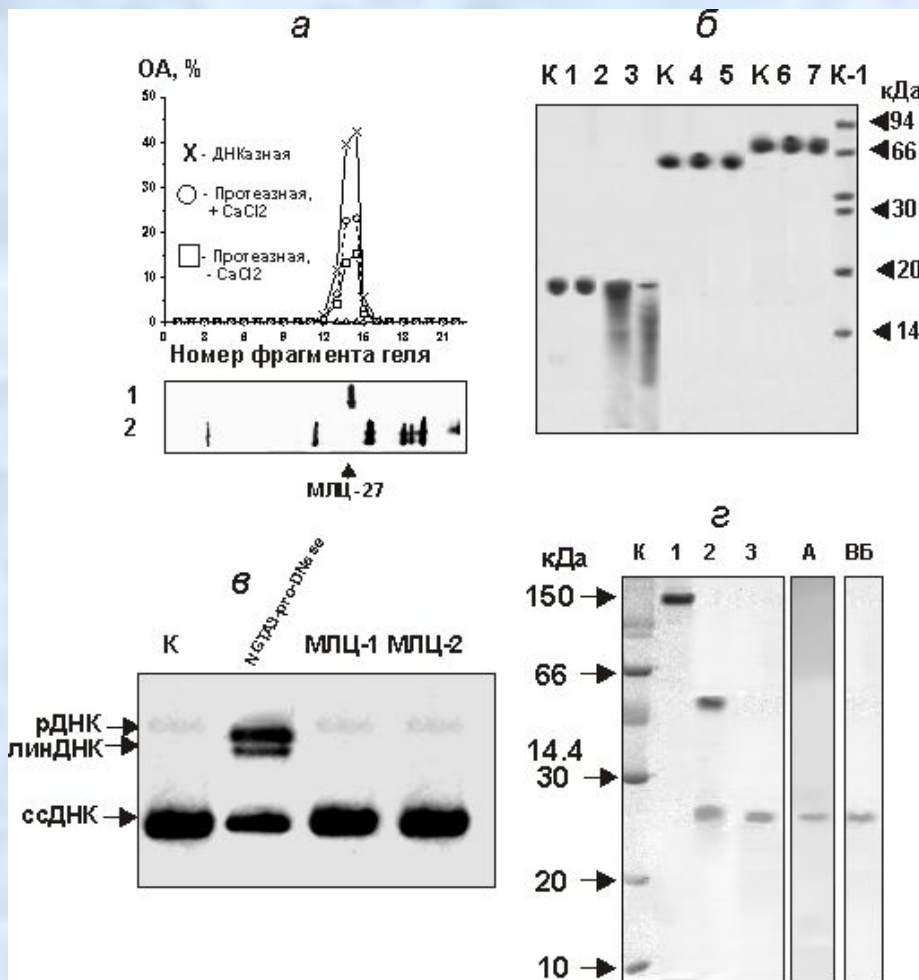


Моноклональная легкая цепь с **двумя активными центрами с металлопротеазной активностью**



Моноклональная легкая цепь с **двумя активностями:** **сериновой** и **металлопротеазной**

Относительная активность (ОА, %) NGTA2-Me-pro-Tr (МЛЦ-24) в гидролизе ОБМ до и после ее преинкубации со специфическими ингибиторами протеаз четырех типов (**а**), в присутствии ЭДТА и ионов различных металлов (2 мМ) (**б**) и при различных pH реакционной смеси до и после обработки с помощью PMSF и ЭДТА (**в**). Зависимость МВР-гидролизующей активности от концентрации PMSF при различных pH реакционной среды (**г**).



**Моноклональная
легкая цепь с тремя
активностями:
Сериновой
Металлопротеазной
ДНКазной**

Современная теория кроветворения, основанная на унитарной теории отечественного гистолога А.А. Максимова, различает **шесть классов кроветворных клеток**. Нормальное кроветворение поликлональное, т.е. с одновременным участием многих клеточных клонов. **Все клетки крови происходят из единой родоначальной клетки — полипотентной стволовой кроветворной клетки**. При делении стволовая клетка образует две клетки, одна из них сохраняет свойства стволовой, а другая обладает способностью к дифференцировке во все без исключения клетки крови.

1. **Мегакариоцитарному**, заканчивающемуся образованием тромбоцитов.
- 2) **Эритроидному**, приводящему к формированию безъядерных, переносящих кислород эритроцитов крови;
- 3) **Гранулоцитарному** - с тремя дополнительными направлениями дифференцировки, заканчивающимися образованием трех самостоятельных клеточных типов: базофилов, эозинофилов и нейтрофилов.

4) **Моноцитарно-макрофагальному.** На территории костного мозга дифференцировка в данном направлении завершается образованием моноцитов, мигрирующих в кровь; окончательные зрелые их формы в виде тканевых макрофагов локализуются в различных органах и тканях, где они получили специфические названия: гистиоциты соединительной ткани, звездчатые ретикулоциты печени, макрофаги селезенки, макрофаги лимфатических узлов, перитонеальные макрофаги, плевральные макрофаги, клетки микроглии нервной ткани.

5) **Т-клеточному.** Данный росток дифференцировки на территории костного мозга проходит только самый начальный этап развития: формирование предшественника Т-клеток (пре-Т-клеток) от лимфоидной стволовой клетки; основные события по созреванию различных субпопуляций клоноспецифических Т-клеток разворачиваются в тимусе ;

6) **В-клеточному.** В отличие от Т-клеточного направления развития В-клеточная дифференцировка характеризуется практически полной завершенностью; в связи с этим не случайно костный мозг относят к центральному органу иммунитета.

Кроме развивающихся В-клеток в постнатальном костном мозге присутствуют зрелые плазматические и Т-клетки. Следовательно, у человека костный мозг функционирует и как важный вторичный лимфоидный орган.

Большинство антиген-презентирующих клеток также образуется в костном мозге, хотя их гемопоэтический предшественник остается неизвестным.

Мы будем анализировать пять типов гемопоэтических предшественников

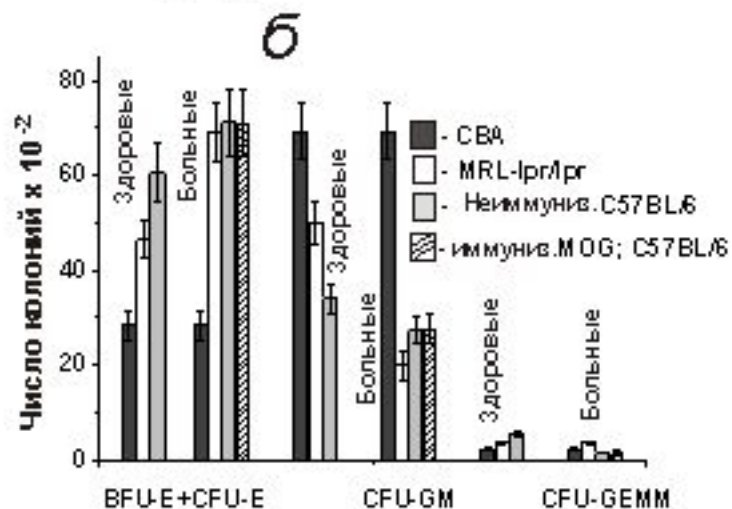
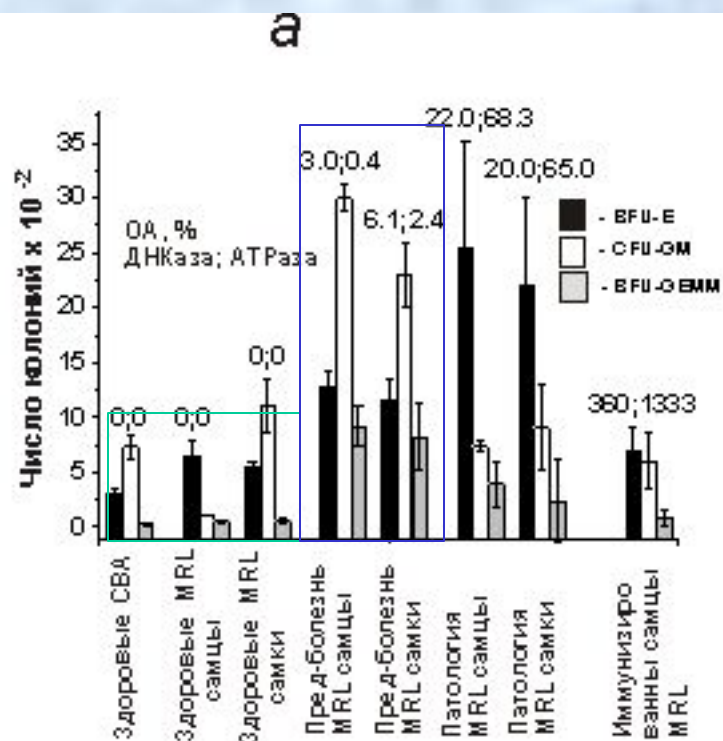
1. BFU-E, erythroid burst-forming unit (early erythroid colonies);

2. CFU-GM, granulocytic-macrophagic colony-forming unit,

3. CFU-E, erythroid burst-forming unit (late erythroid colonies)

4. CFU-GEMM, granulocytic-erythroid-megacaryocytic-macrophagic colony-forming unit

5. Lymphocytes (T and B-cells)



Было показано, что по сравнению с нормой до болезни в состоянии спонтанного появления предболезни у СКВ и ЕАЕ мышей происходит первое, а затем при переходе к глубокой патологии дополнительное изменение профиля дифференцировки стволовых клеток костного мозга

Профили дифференцировки предшественников гомопоэтических клеток крови BFU-E + CFU-E (total erytroid cells) CFU-GM, BFU-GEMM) в костном мозге MRL-lpr/lpr мышей (a).