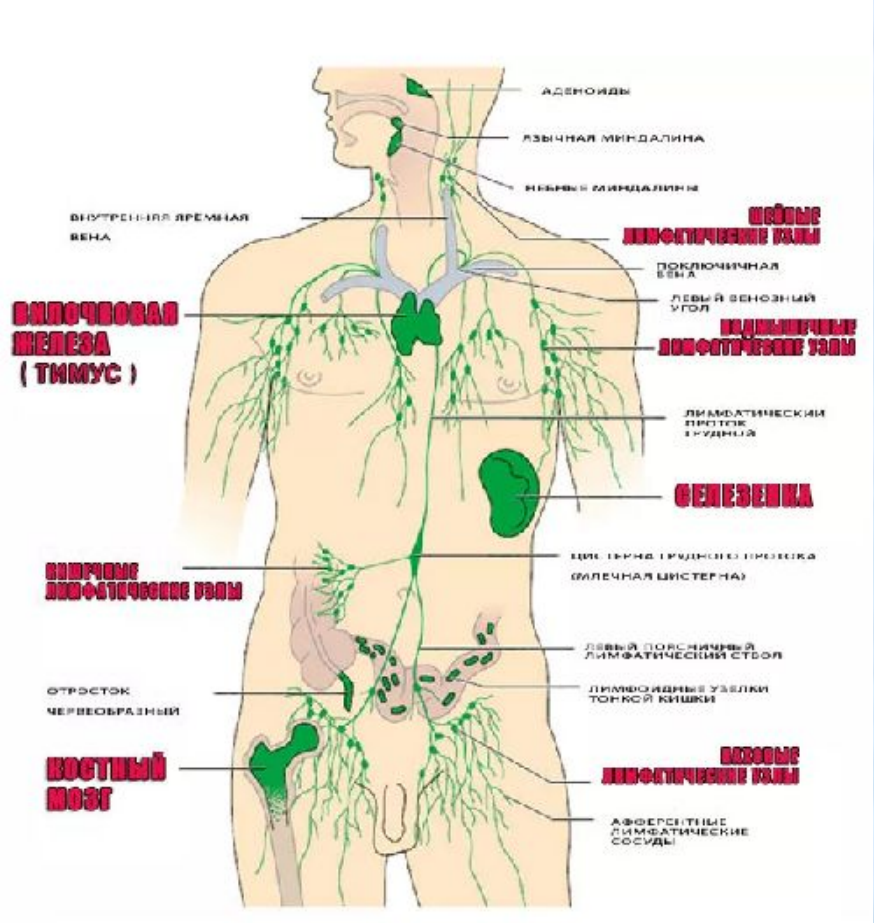
»

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

Органы иммунной системы человека



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.

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.

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

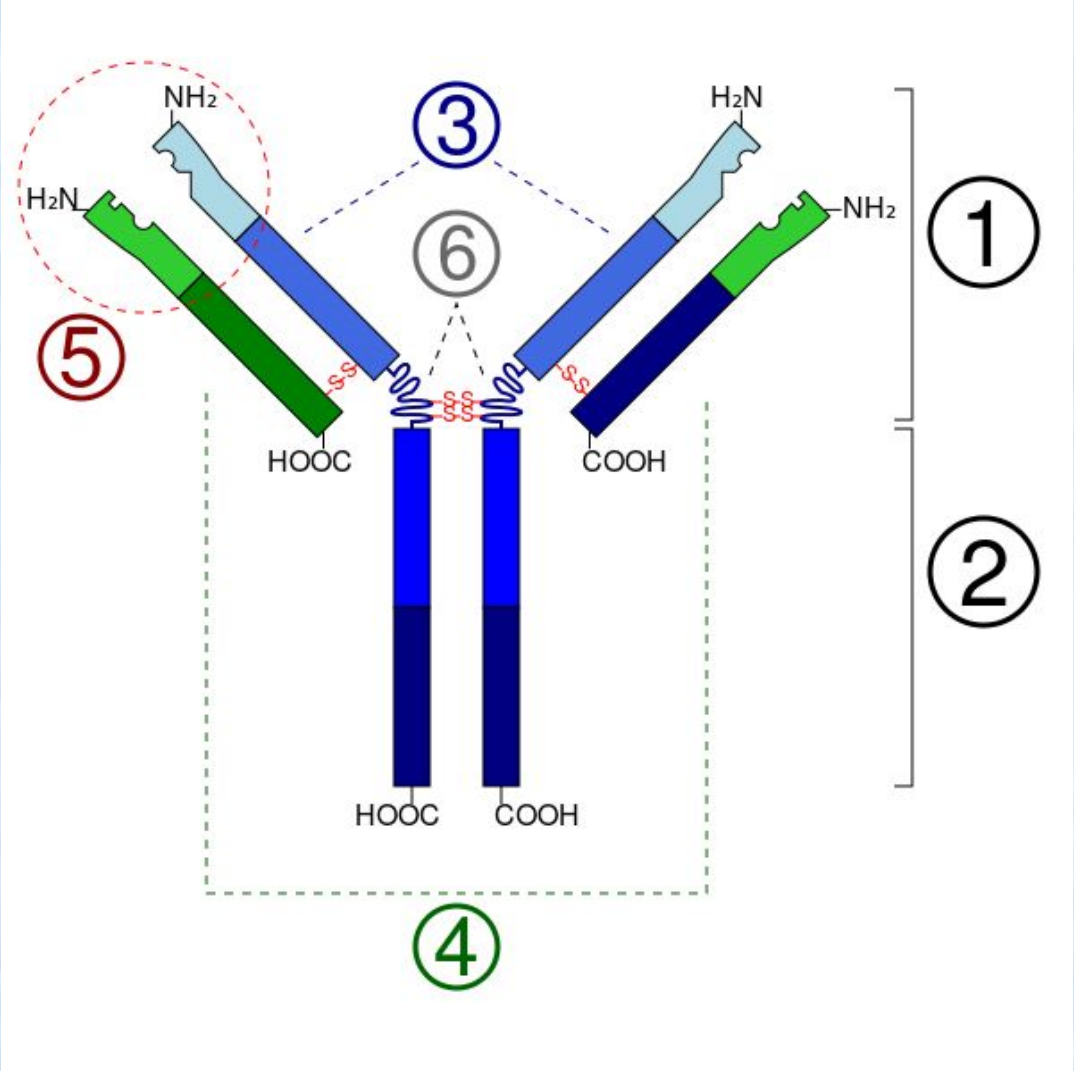
Это узелковые скопления овальной или круглой формы, которые находятся в лимфоидной ткани. Располагаются они в слизистой оболочке тонкой кишки. Их диаметр — от 0,5 до 3 мм.

Основные функции пейеровых бляшек:

участие в процессе созревания Т- и В-лимфоцитов;

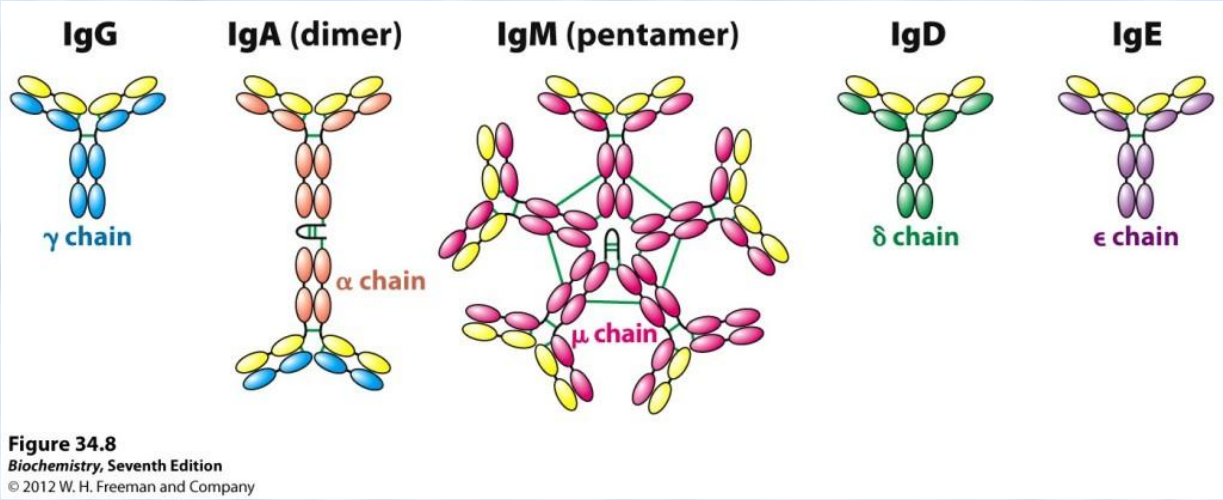
формирование иммунного ответа организма.

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 М - 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 А обнаруживаются в секретах слюнных и слезных желез, молоке, на слизистых оболочках дыхательной и мочеполовой систем

Иммуноглобулин Е (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 существовует 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).

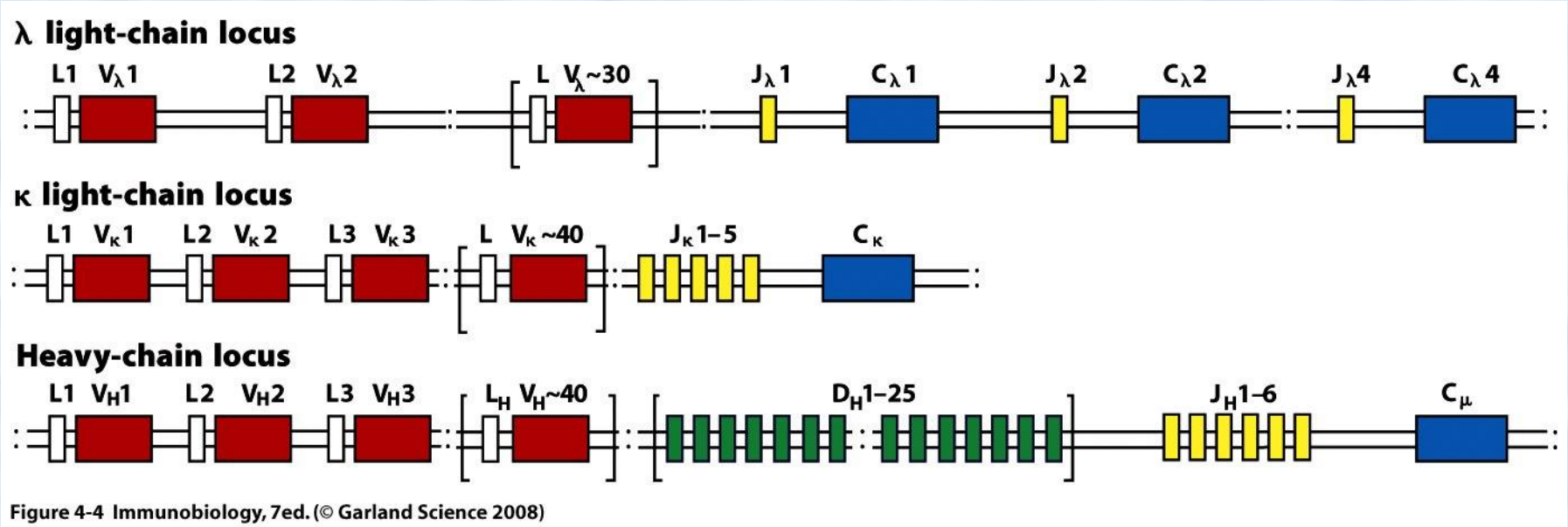


Figure 4-4 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

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 – вариабельные сегменты ДНК (variable)

J – связывающие сегменты ДНК (joining)

D - сегменты разнообразия (diversity)

C – константные части будущих цепей

Исходная зародышевая ДНК для создания легких цепей

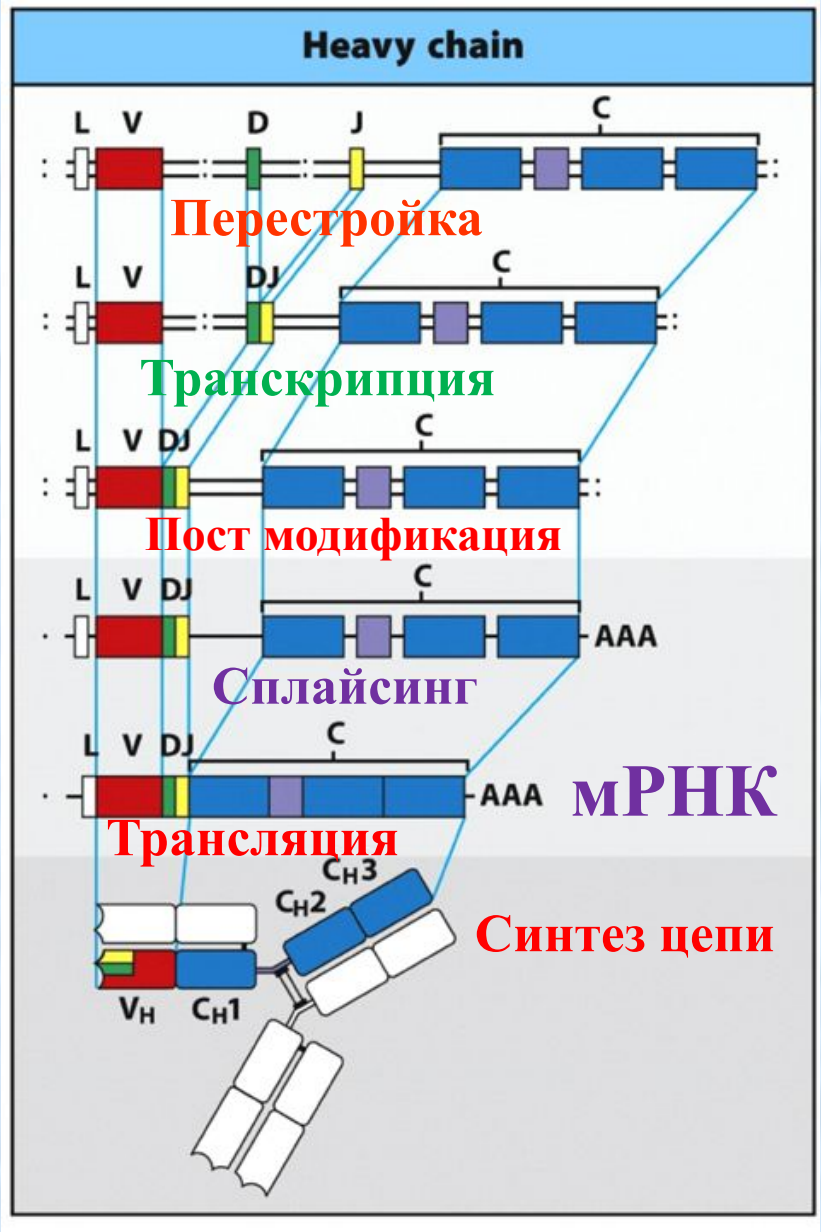
Перестройка ДНК из разных фрагментов V и J сегментов

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

В начале получается первичный РНК-транскрипт

Затем идет его пост-модификация с добавлением ААА -фрагментв

Затем в результате сплайсинга первичного транскрипта образуется мРНК

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

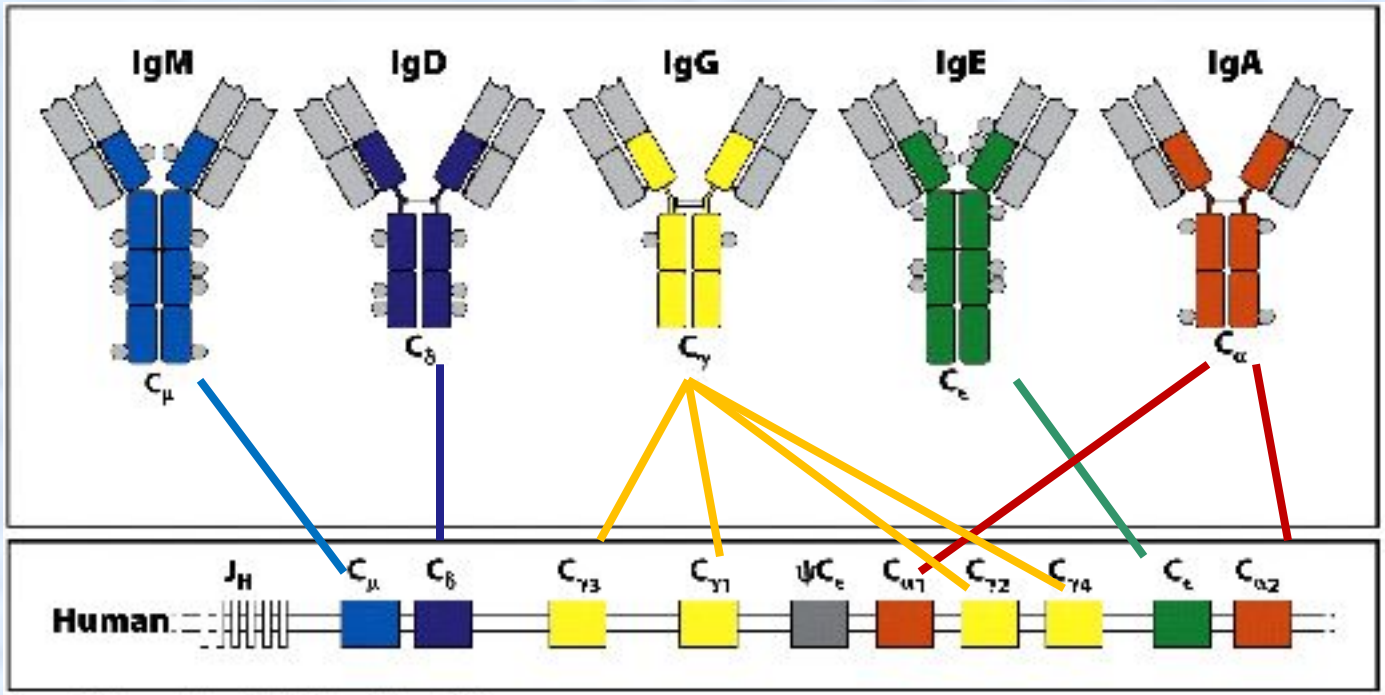


Figure 1-17 Immunobiology, 7ed.(© Garland Science 2008)

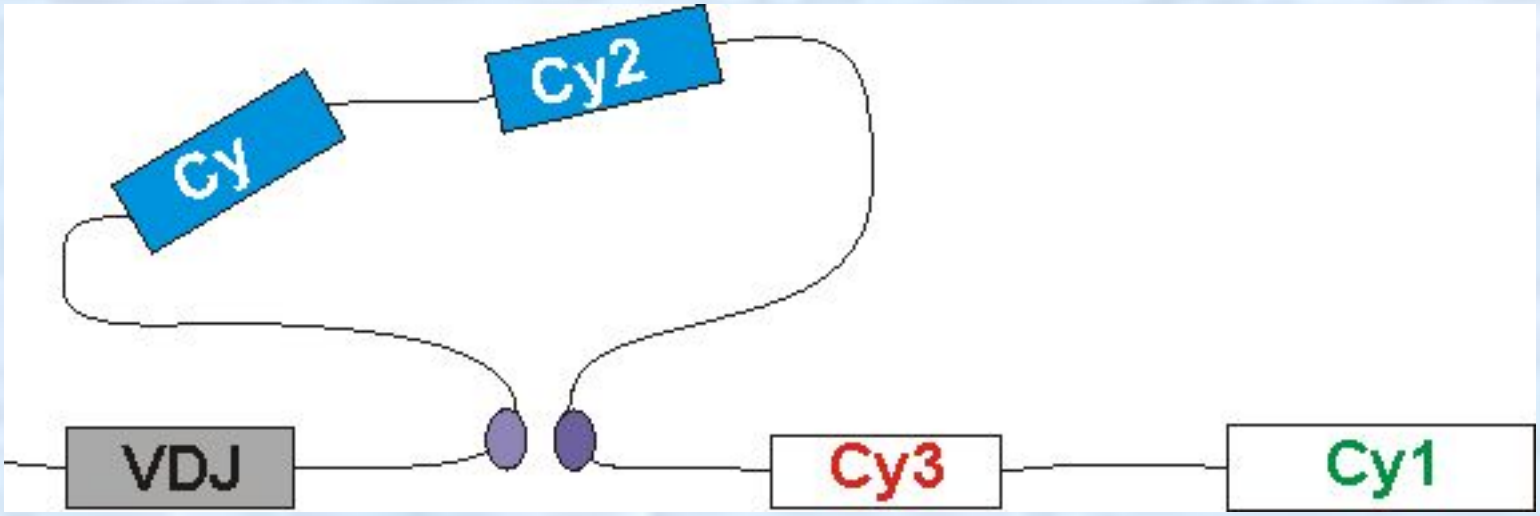
	Immunoglobulin								
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
Heavy chain	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	μ	α_1	α_2	δ	ϵ
Molecular weight (kDa)	146	146	165	146	970	160	160	184	188
Serum level (mean adult mg ml^{-1})	9	3	1	0.5	1.5	3.0	0.5	0.03	5×10^{-5}
Half-life in serum (days)	21	20	7	21	10	6	6	3	2

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.

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

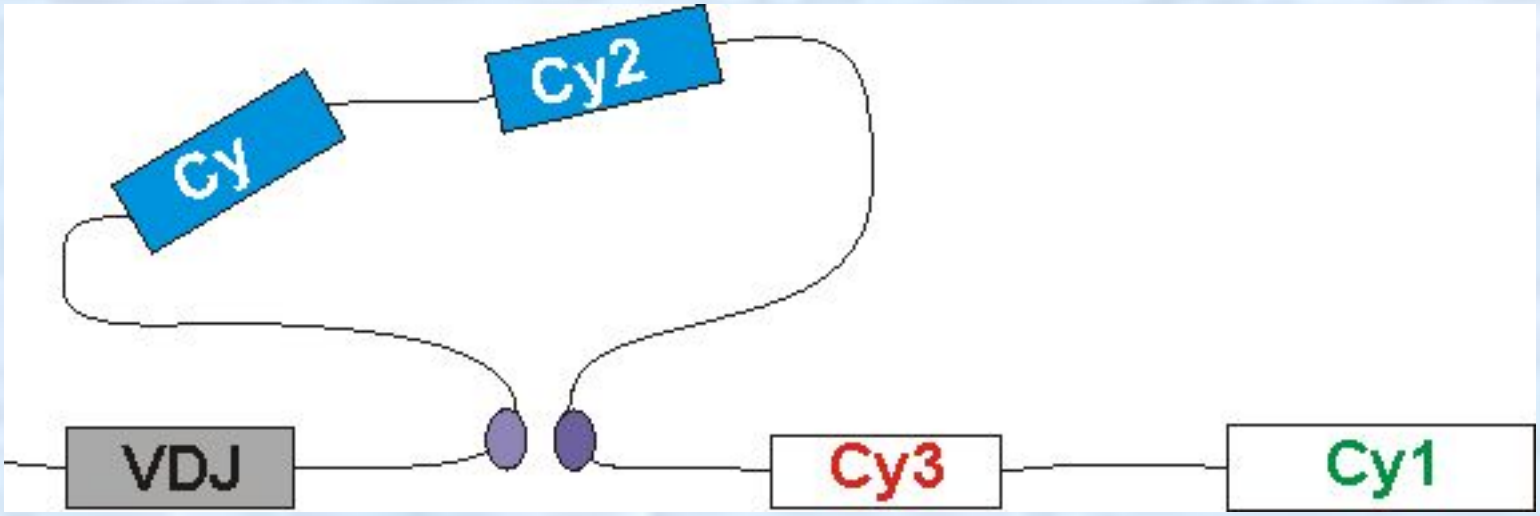


Рекомбинацию ДНК катализируют специальные ферменты *рекомбиназы* .

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 эндонукдеазы*

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 В-лимфоцитом в результате своей дифференцировки специфичности по отношению к антигену происходит раз и навсегда и строго необратимо на уровне ДНК.

В каждом единичном В-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 L2H2 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 петлей 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 тереоиодит

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.

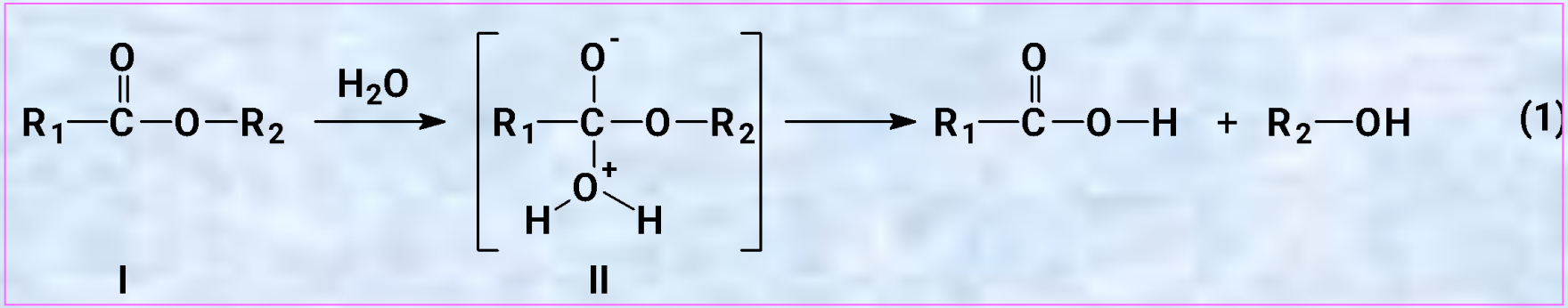
Однако за последние два десятилетия открыты первые природные антитела с каталитической активностью, катализирующие самые разные химические реакции

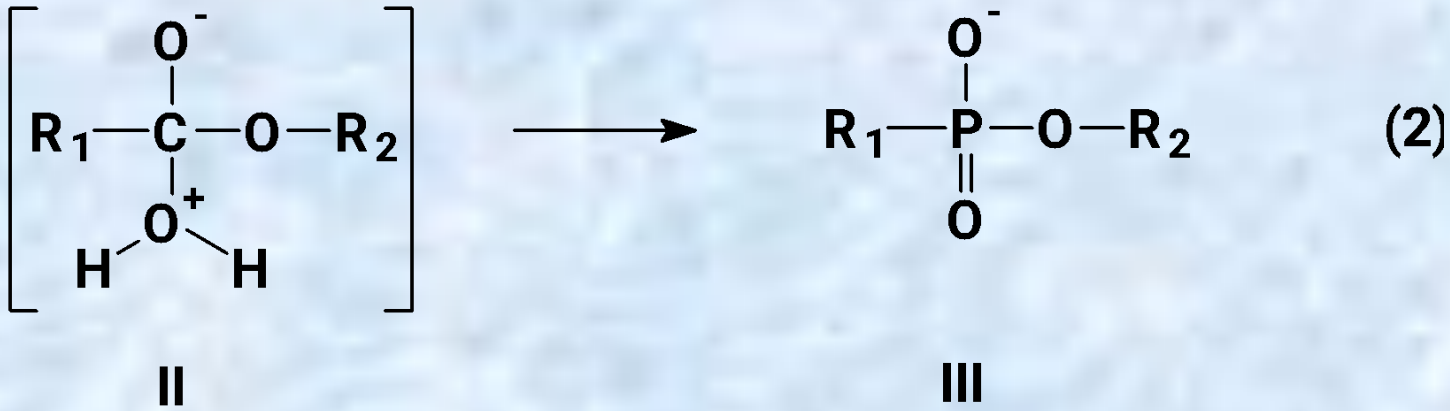
Антитела-ферменты (AntiBody - enzyme) получили название “абзимы” (ABZYME)

Такие антитела появляются в биологических жидкостях больных различными аутоиммунными заболеваниями

В настоящее время показано существование двух путей наработки антител ферментов.

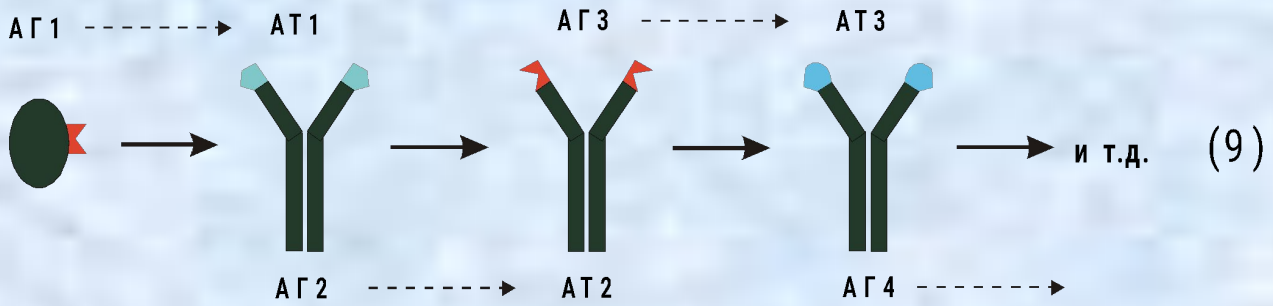
Первый путь – наработка антител к молекулам, моделирующим переходные состояния химических реакций





переходное состояние *аналог переходного состояния*

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 (АТР и т.д.)**

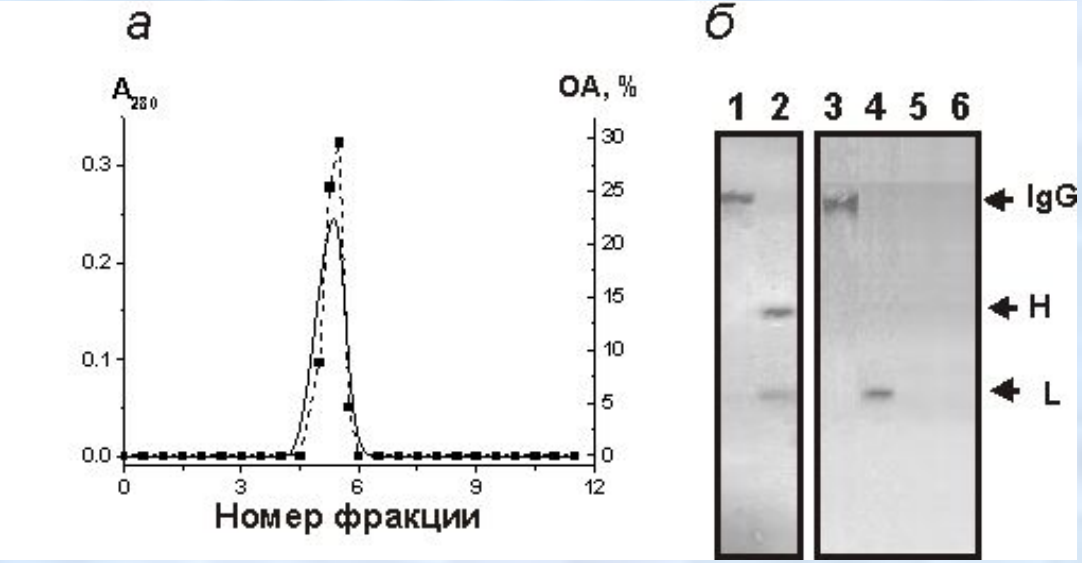
ФОСФОРИЛИРУЮЩИЕ:

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. **Аутоимунный тиреоидит (Тиреореодит Хашимото)**
5. **ВИЧ-инфекция**
6. **Клещевой энцефалит**
7. **Вирусный гепатит**
8. **Шизофрения**
9. **Сахарный диабет**
10. **Кровь и молоко лактирующих женщин**

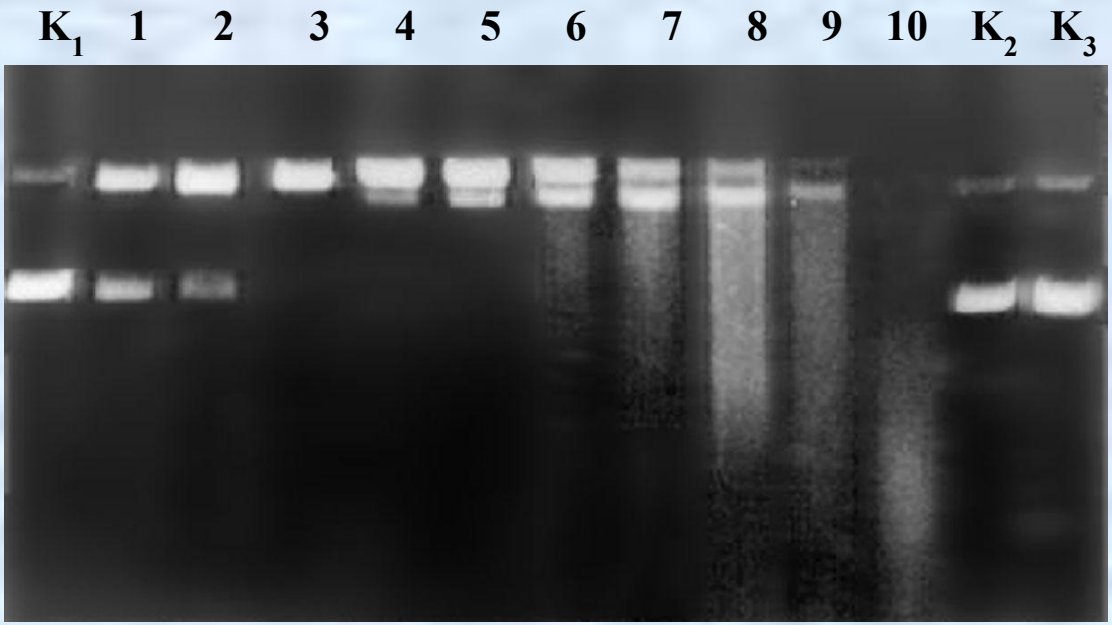


а) Совпадение положения пиков IgG и ДНКазной активности при гель-фильтрации в кислом буфере

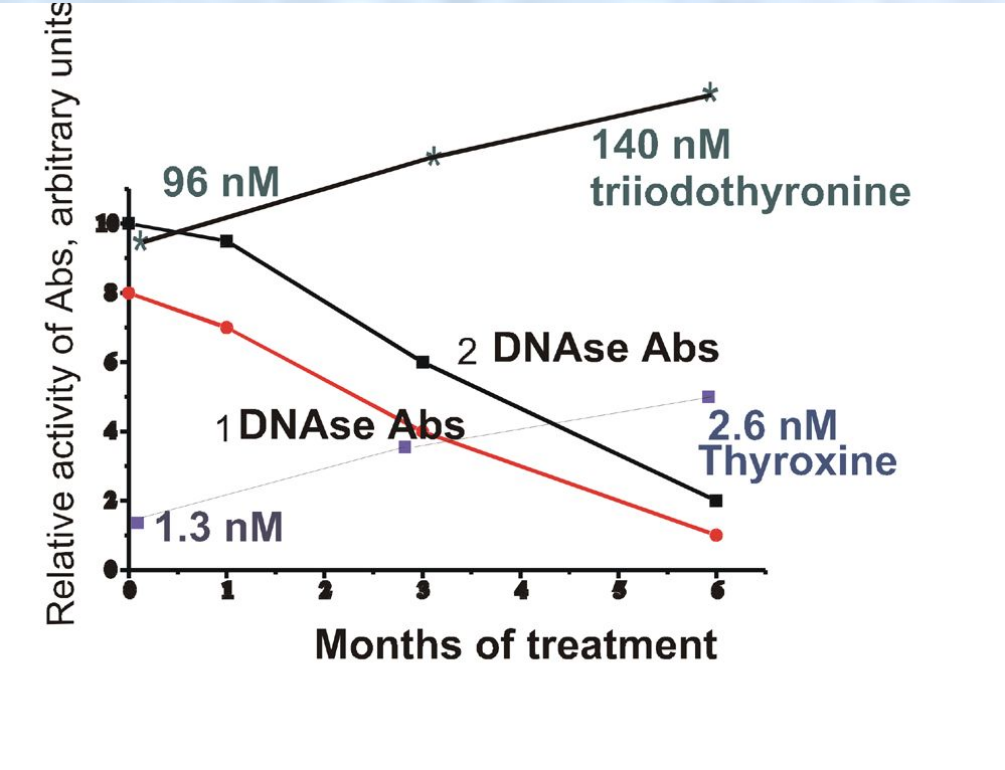
г) Совпадение положения полос белковых и ДНКазной активности после SDS-PAGE с использованием геля, содержащего ролимерную ДНК

Относительная активность ДНК-гидролизующих антитед очень сильно зависит от пациента

Относительная активность антител 10 пациентов



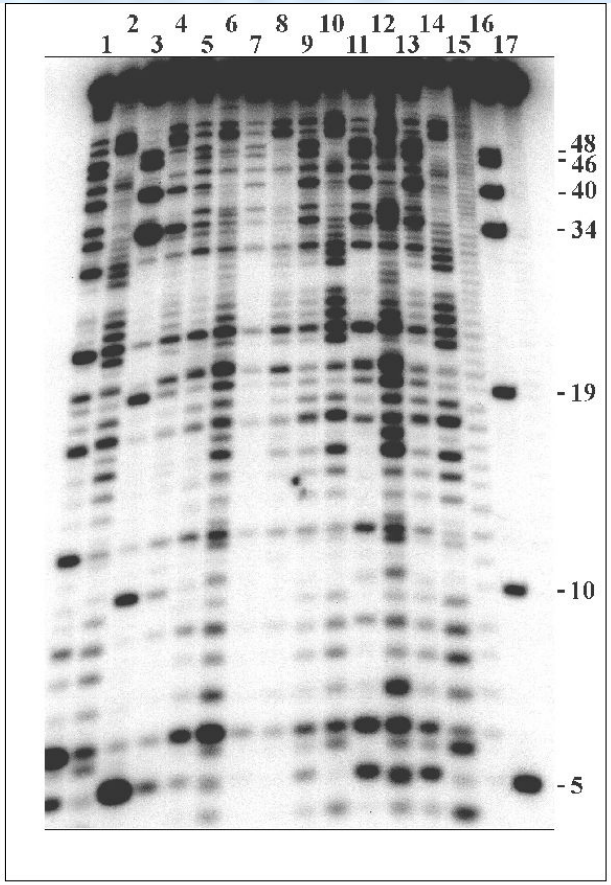
Показано, что анализ относительной активности антител в гидролизе ДНК может быть использован для оценки глубины аутоиммунных реакций при аутоиммунных заболеваниях



Эффект лечения больных аутоиммунным тиреоидитом плаквинилом

Падение активности ДНК-гидролизующих антител и нормализация концентрации гормонов при лечении больных аутоиммунным тиреиодитом иммуннокоррегирующим препаратом плаквинилом сопряжено с нормализацией остальных биохимических и иммуннологических индексов заболевания

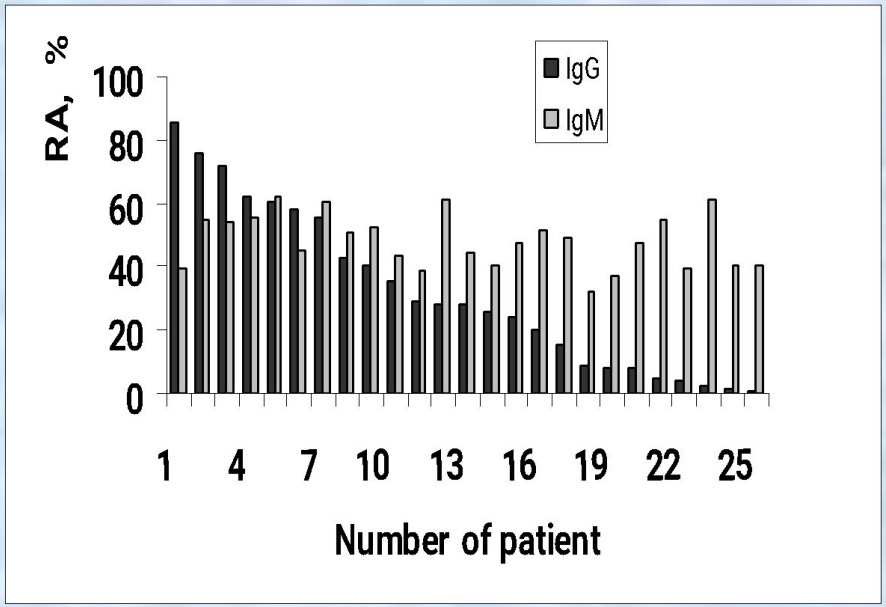
Относительная активность и субстрантная специфичность РНК-гидролизующих антитед очень сильно зависит от типа аутоиммунного заболевания



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

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

Впервые показано, что абзимы крови больных рассеянным склерозом специфично гидролизуют основный 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

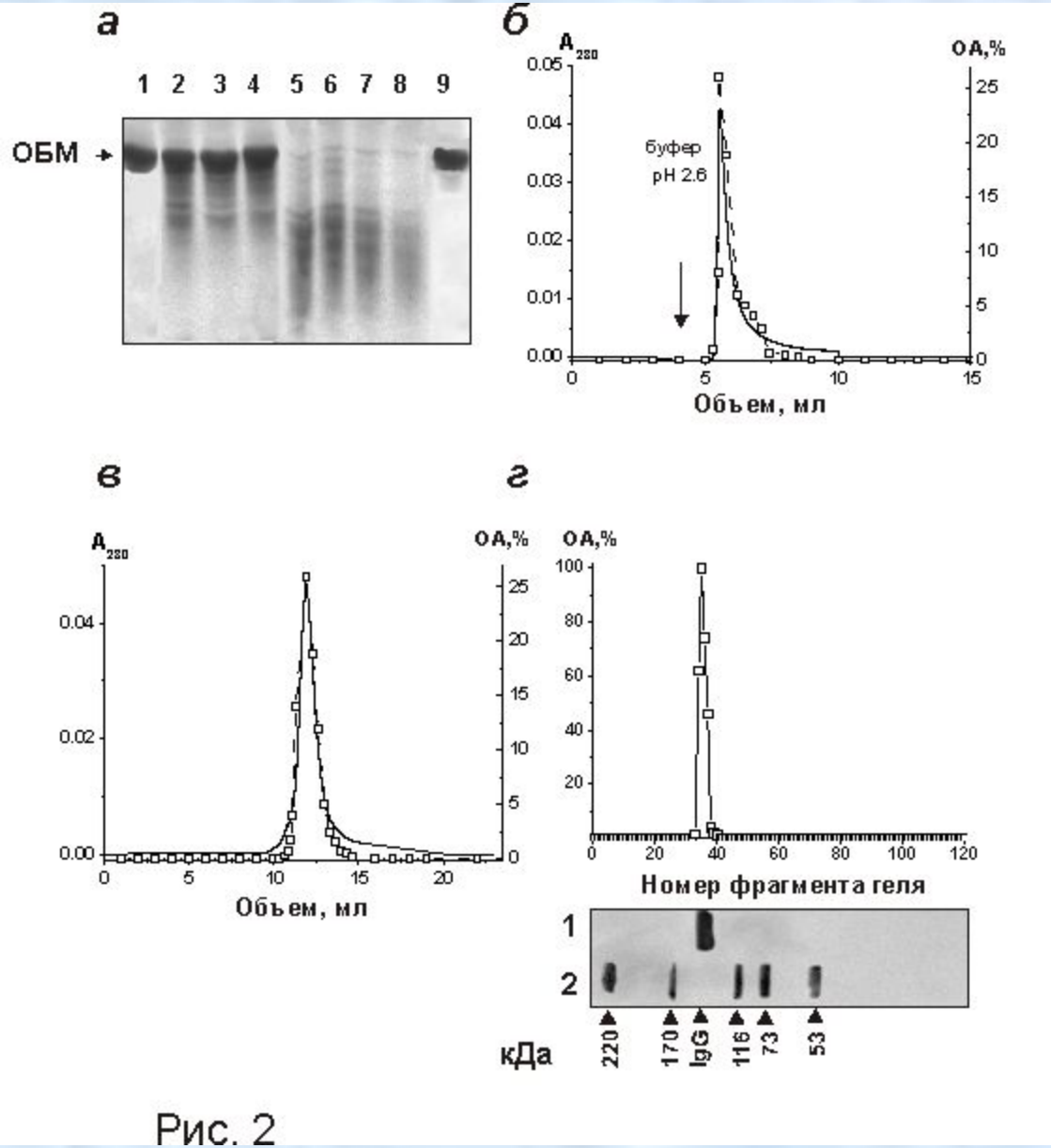


Рис. 2

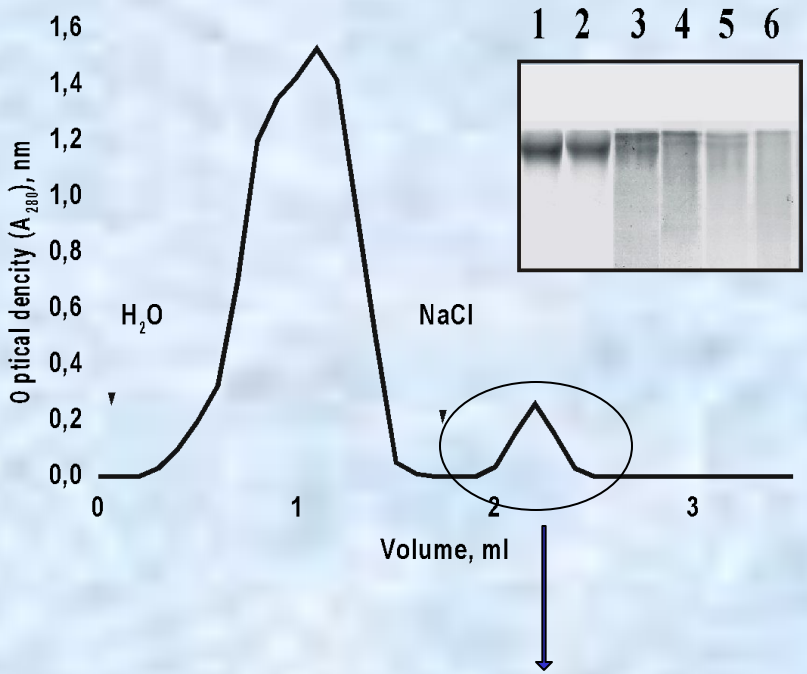
а) Гидролиз ОБМ

б) Адсорбция АТ человека антителаами 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:

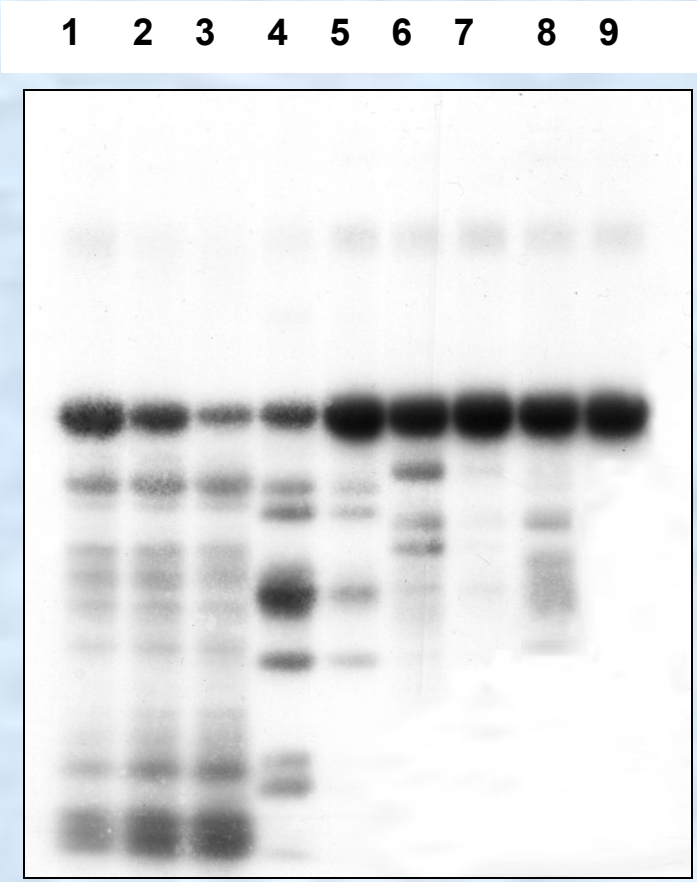
Дорожка 1 – hMBP инкубированный без АТ, дорожки 2 – 6 в присутствии IgG: 2 – без Me^{2+} ионов, 3 – 5 мМ $CaCl_2$ 4 – 5 мМ $CuCl_2$, 5 – 5 мМ $MnCl_2$ 6 – 5 мМ $MgCl_2$.

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



Анализ продуктов гидролиза антителами и классическими протеазами обратной транскриптазы

Дорожки 1-3 - антитела;

4, 5 –трипсин;

6, 7 – протеиназа К;

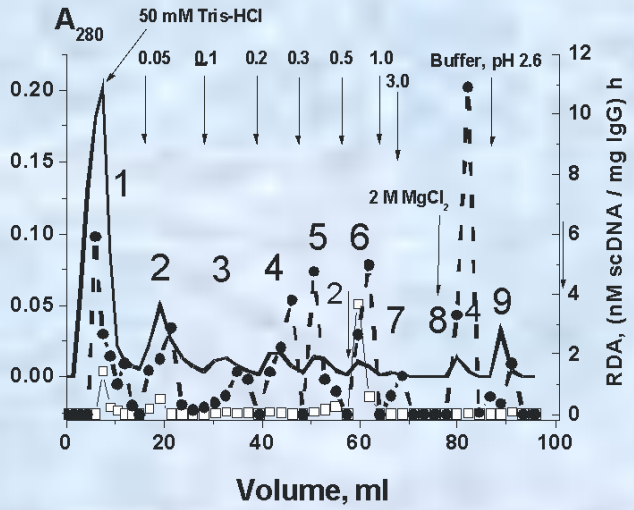
8 – химотрипсин;

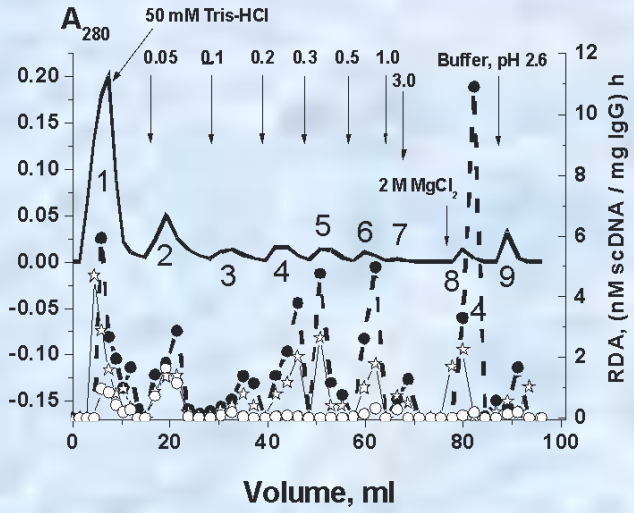
9 –контроль без протеазы.

Продукты расщепления антителами и протеазами существенно различаются

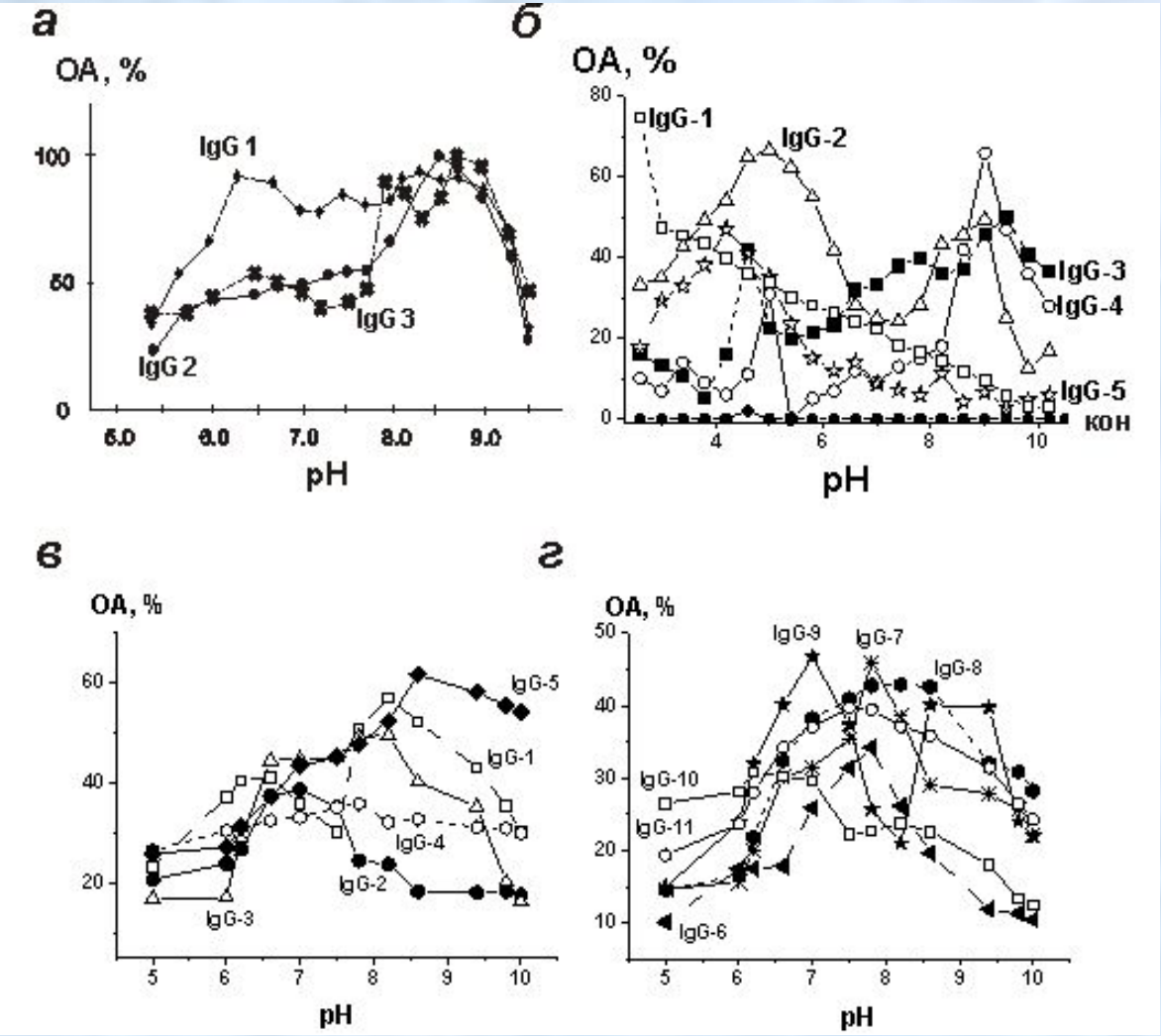
Как указывалось ранее, теоретически количество антител против одного антигена может быть очень большим – до одного миллиона. Реально их образуется в организме человека намного меньше, но все равно много.

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 pH, 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.



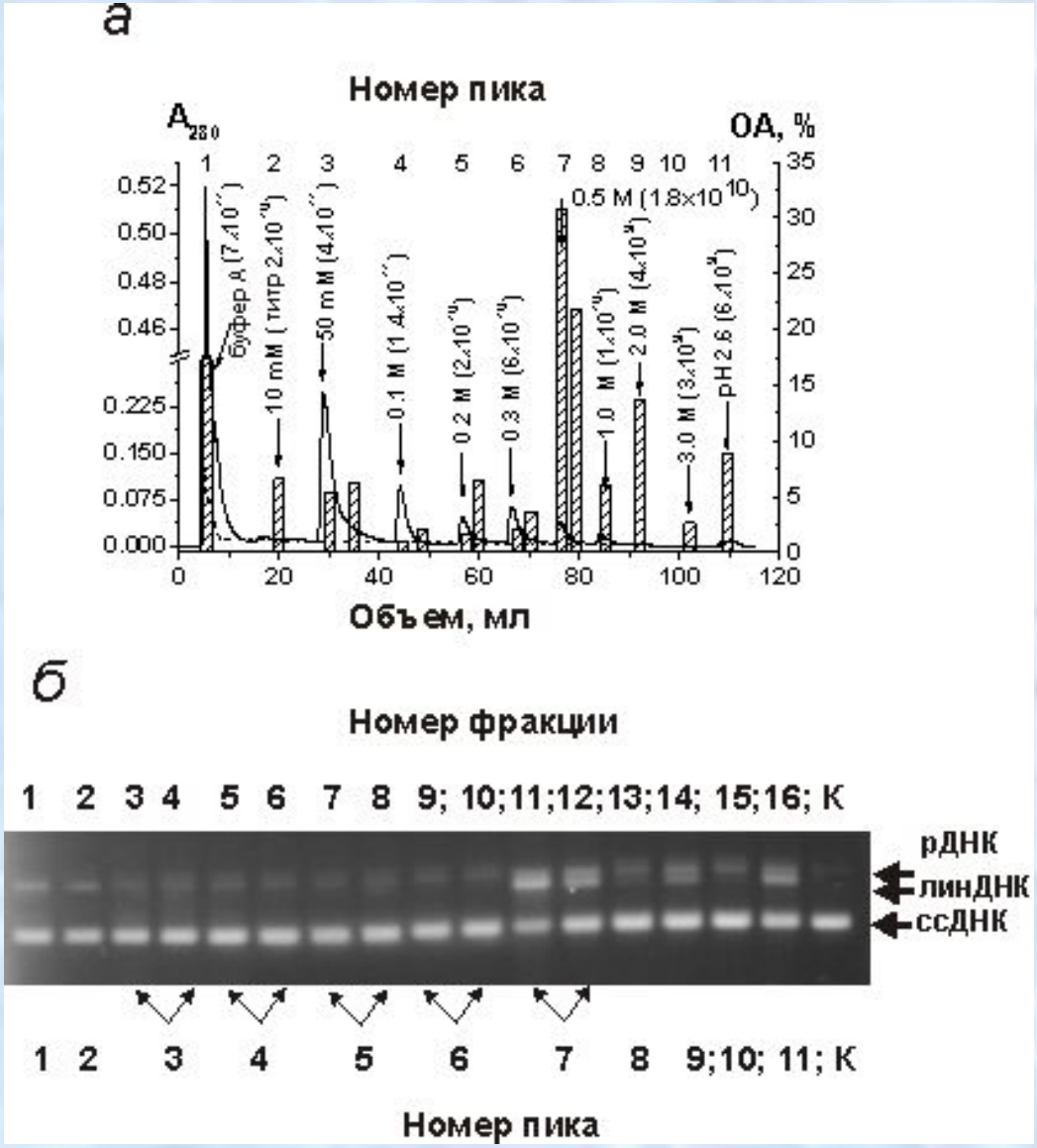


Одним из путей разделения разных абзимов является аффинная хроматография на сорбентах с иммобилизованными субстратами. Например, аффинная хроматография антител на ДНК-целлюлозе приводит к разделению IgG с ДНКазной активностью на очень большое число подфракций. Эти подфракции демонстрируют различное сродство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

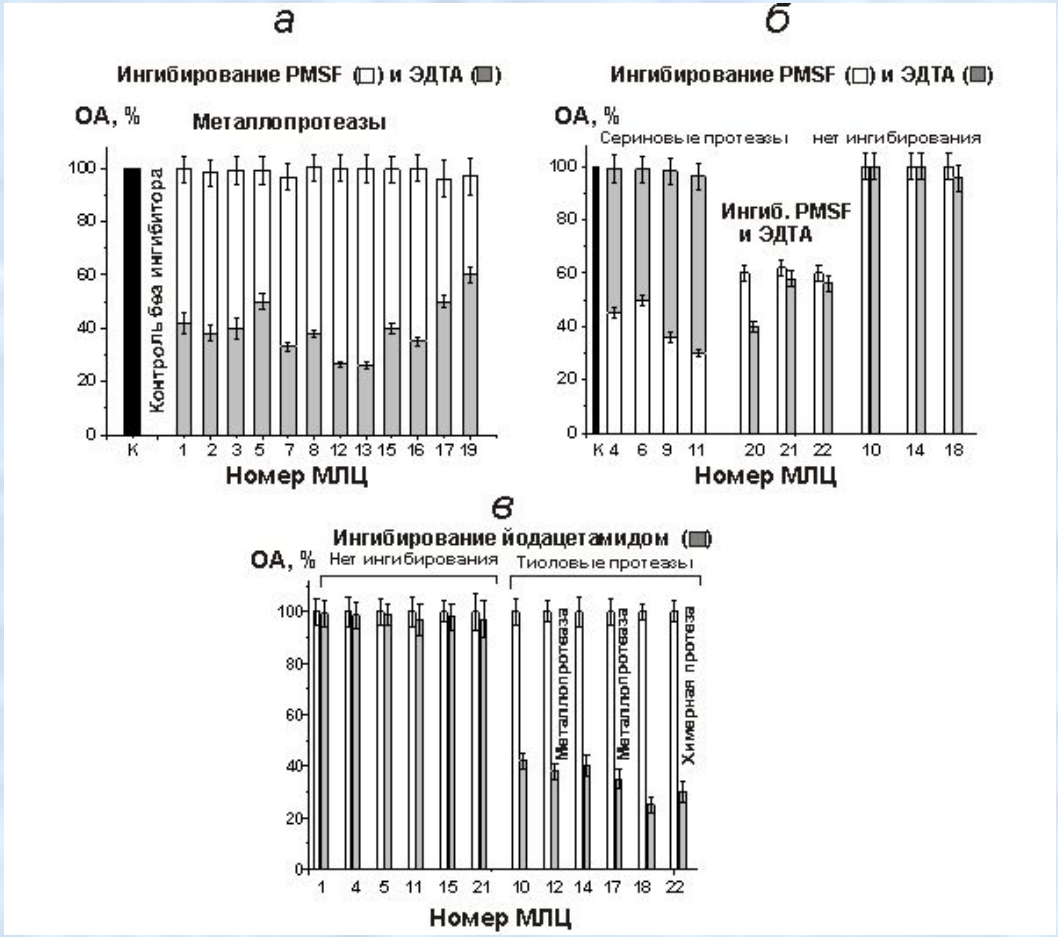


Множество разных pH оптимумов в гидролизе ДНК антителами из крови разных больных СКВ

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

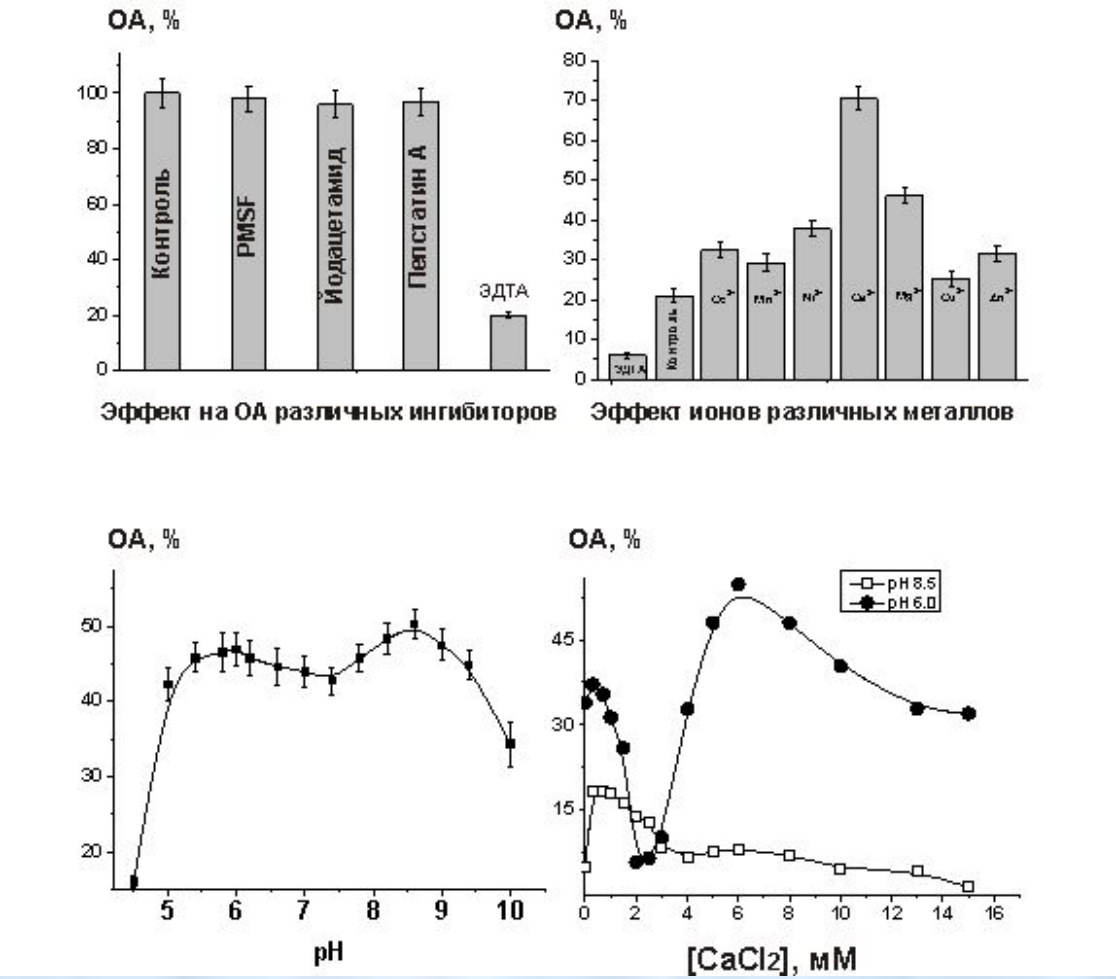


Аффинная хроматография фаговых частиц на ДНК-целлюлозе: (—) и (---), поглощение при 280 нм материала, соответствующего частицам с плазмидами, содержащими и несодержащими кДНК легких цепей, соответственно Столбики соответствуют относительной активности



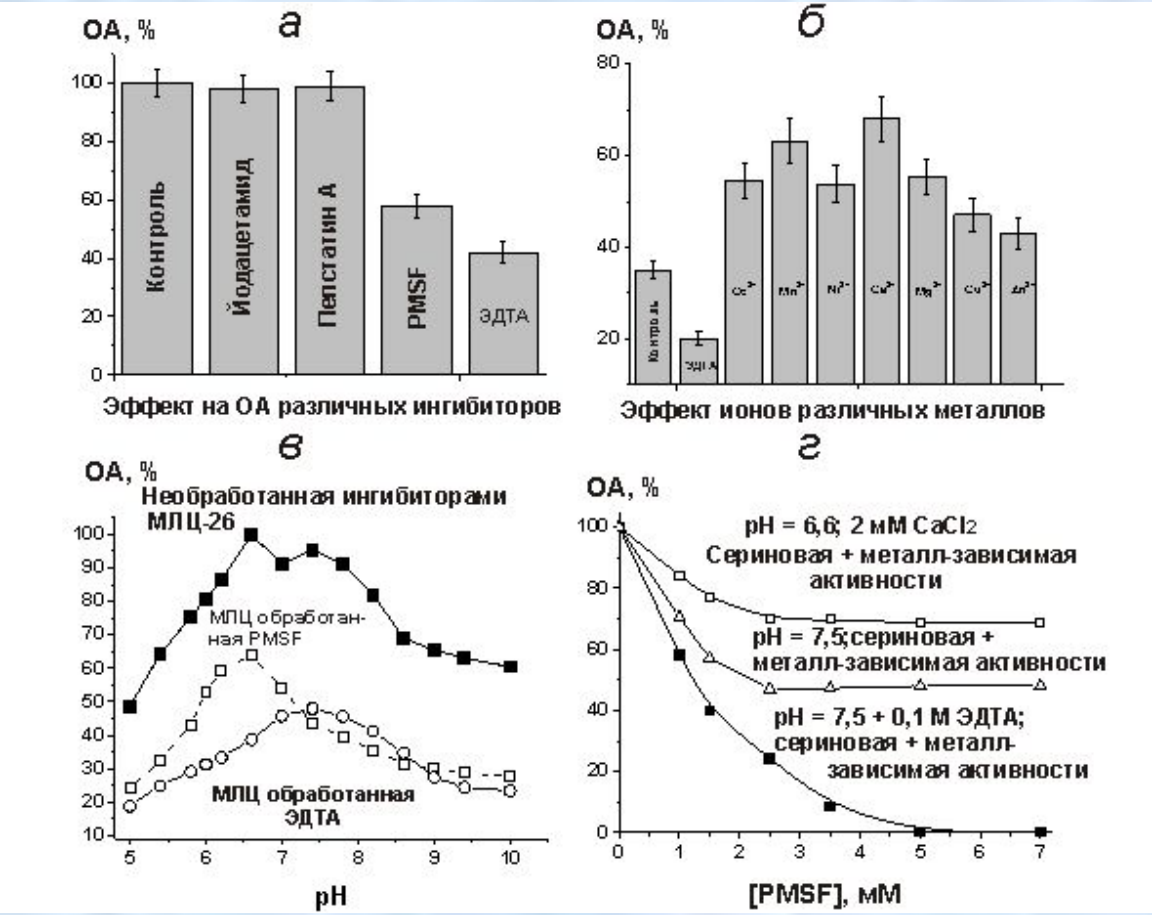
Относительная активность (ОА, %) 22 МЛЦ в гидролизе ОБМ после их предынкубации со специфическими ингибиторами трех типов протеаз; 50 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF, 1 мМ йодацетамид.

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.



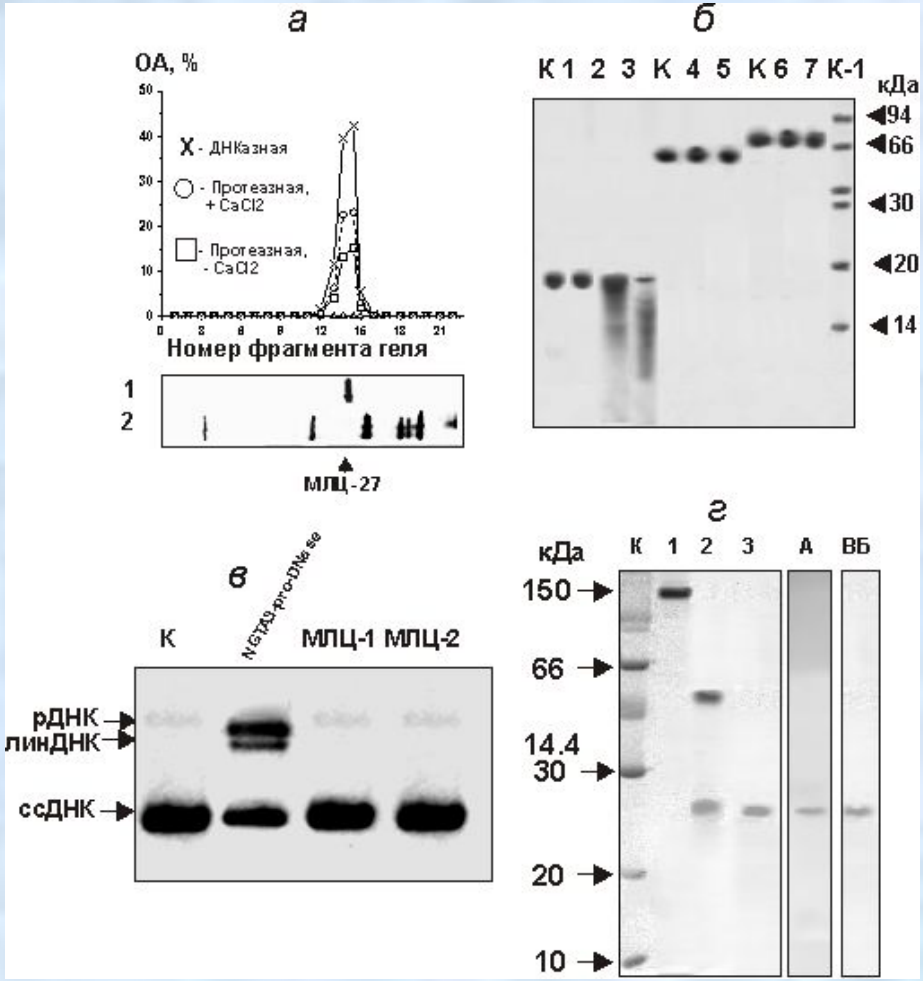
Относительная активность моноклональной NGTA1-Me-pro в гидролизе ОБМ до и после ее предынкубации со специфическими ингибиторами протеаз четырех типов (*а*), в присутствии ЭДТА и ионов различных металлов (2 мМ) (*б*) и при различных pH реакционной смеси (*в*). Зависимость активности МЛЦ-25 от концентрации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

Моноклональная легкая цепь с двумя активными центрами с металлопротеазной активности



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 прединкубации 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 MBP-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 кислородэритроцитов 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 гомопоэтических предшественников

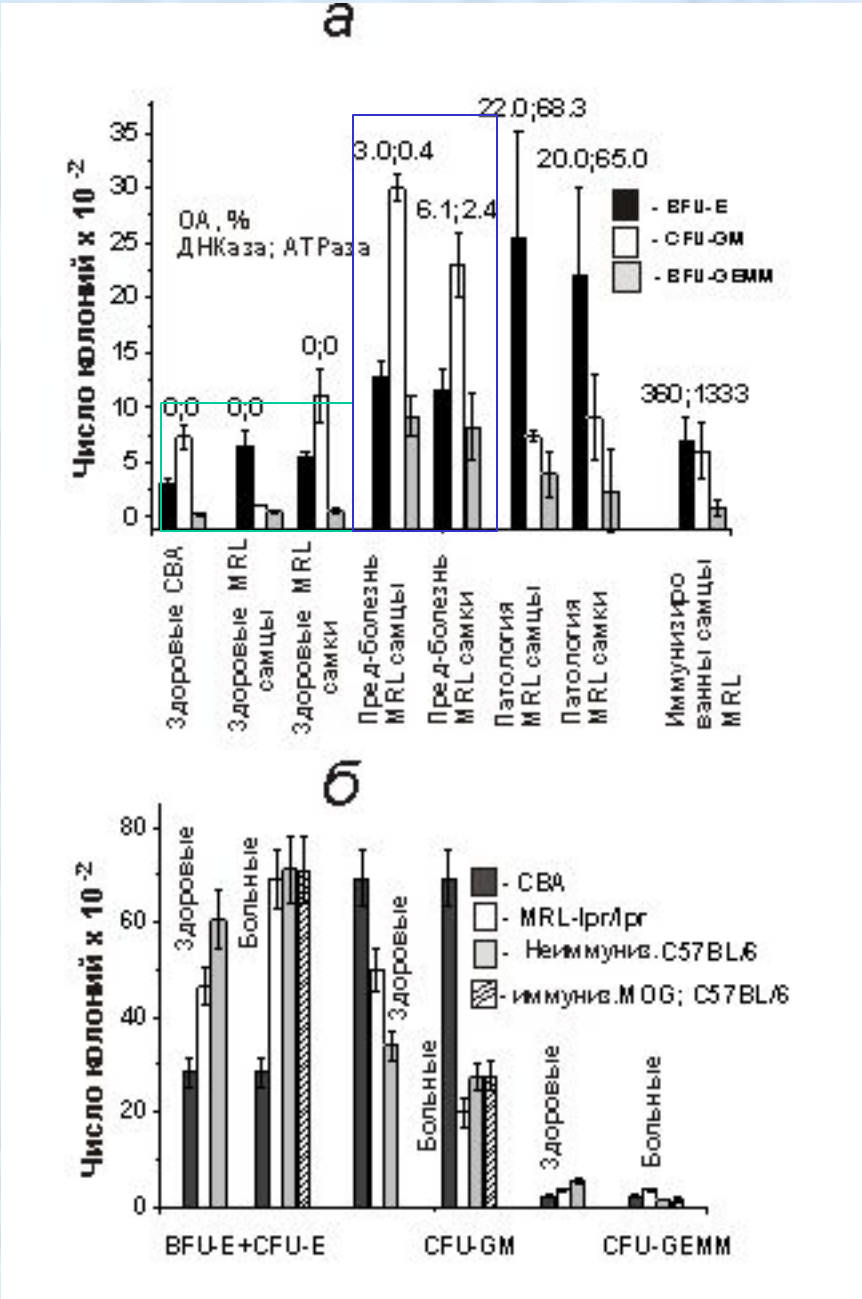
1. BFU-E, erythroid burst-forming unit (early erythroid colonies);

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 (*а*).