**Реферат**

**Развитие иммунной системы в онтогенезе**

2009

Эффективное функционирование иммунной системы зависит от взаимодействия многочисленных клеточных и гуморальных компонентов, которые в пре- и постнатальный периоды созревают с различной скоростью. Многие клетки, участвующие в иммунном ответе, происходят от недифференцированных гемопоэтических стволовых клеток. Под влиянием факторов микроокружения - взаимодействия с соседними клетками и присутствия растворимых или мембраносвязанных цитокинов - дифференцировка ГСК происходит в разных направлениях.

У млекопитающих в период внутриутробного развития ГСК присутствуют в желточном мешке, печени, селезенке и костном мозге. После рождения и в зрелом организме они обычно сохраняются лишь в костном мозге. Эти "самообновляющиеся" путем деления ГСК под влиянием разнообразных местных факторов роста и дифференцировки дают начало большинству или даже всем клеткам иммунной системы.

Из ГСК образуются клетки четырех главных рядов дифференцировки:

• эритроидного,

• мегакариоиитарного,

• миелоидного и

• лимфоидного. Антигенпрезентируюшие клетки в основном, но не исключительно, развиваются из миелоидных клеток-предшественников. Клетки миелоидного и лимфоидного рядов наиболее важны для функционирования иммунной системы.

## Миелоидные клетки

У человека миелопоэз начинается в печени, примерно на 6 неделе внутриутробного развития. Изучение роста колоний из индивидуальных стволовых клеток in vitro показало, что первая образующаяся из ГСК клетка-предшественник представляет собой колониеобразуюшую единицу, которая может дать начало образованию гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов и мегакариоцитов. Созревание этих клеток происходит под влиянием колониестимулирующих факторов и ряда интерлейкинов, в том числе ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-6. Все они играют важную роль в положительной регуляции гемопоэза и продуцируются главным образом стромальными клетками костного мозга, но также и зрелыми формами дифференцированных миелоидных и лимфоидных клеток. Другие цитокины могут осуществлять понижающую регуляцию гемопоэза.

Нейтрофилы и моноциты развиваются из общих клеток-предшественников.

## Образование нейтрофилов

Клеткой - предшественником нейтрофилов и мононуклеарных фагоцитов служит КОЕ-ГМ. При дифференцировке в нейтрофилы клетки проходят несколько морфологических стадий. Из миелобла-стов образуются промиелоциты и затем миелоциты, которые созревают и поступают в кровоток в виде нейтрофилов. Однонаправленная диффе-ренцировка клеток КОЕ-ГМ в зрелые нейтрофи-лы обусловлена появлением у них на разных стадиях развития рецепторов для специфических факторов роста и дифференцировки.

По мере созревания гранулоцитов на их поверхности исчезают или появляются поверхностные дифференцировочные маркеры. Например, клетки КОЕ-ГМ экспрессируют молекулы МНС класса II и маркер CD38, отсутствующие на зрелых нейтрофилах. К другим молекулам поверхности, экспрессируемым в процессе дифференцировки, относятся CD 13, CD 14, CD 15, CD29, VLA-4, лейкоцитарные интегрины CD1 la, Ь, с и aD в ассоциации с Р2-цепями CD 18, рецепторы комплемента и Рсу-рецепторы.

Функциональную активность гранулоцитов, находящихся на различных стадиях созревания, оценить трудно, но, по-видимому, полным функциональным потенциалом обладают только зрелые клетки. Ряд данных свидетельствует о том, что активность нейтрофилов, определяемая по фагоцитозу или хемотаксису, у плода ниже, чем в зрелом организме. Однако это может быть отчасти связано с меньшим содержанием опсонинов в сыворотке плода, а не с особенностями самих клеток. Для приобретения активности нейтрофилам необходимо непосредственное взаимодействие с микроорганизмами или с цитокинами, образующимися при иммунном ответе на антиген, в присутствии опсонинов. Это может лимитировать активность нейтрофилов на раннем этапе развития организма. Активация нейтрофилов цитокинами и хемокинами является также необходимым условием их миграции из крови в ткани.

## Образование моноцитов

При дифференцировке по моноцитарному пути из КОЕ-ГМ вначале образуются пролиферирующие монобласты. Они дифференцируются в про-моноциты и, наконец, в зрелые моноциты крови. Считается, что циркулирующие моноциты служат возобновляемым пулом для образования тканевых макрофагов, например макрофагов легких. Различные формы макрофагов составляют ' систему мононуклеарных фагоцитов.

Зрелые нейтрофилы и моноциты/макрофаги лишены CD34 и других маркеров ранних стадий дифференцировки. Однако моноциты, в отличие от нейтрофилов, продолжают экспрессировать большое количество молекул МНС класса II, необходимых для презентации антигена Т-клеткам. Моноциты синтезируют также многие из тех поверхностных молекул, которые характерны для зрелых нейтрофилов.

На стадиях дифференцировки определить функциональные возможности моноцитов, как и гранулоцитов, весьма трудно. Однако изучение in vitro некоторых миелоидных опухолей, клетки которых предположительно представляют собой моноциты на разных стадиях дифференцировки, свидетельствует о том, что как фагоцитарная активность, так и цитотоксичность, опосредуемая Fc-рецептором, достигают оптимального уровня только на стадии зрелых макрофагов. У новорожденного и взрослого человека моноциты вырабатывают цитокин ИЛ-1 с равной эффективностью, но у новорожденного эта функция слабее повышается под действием ИФу, чем у взрослого.

## Дендритные клетки развиваются из стволовых клеток костного мозга

Большинство классических антигенпрезентирующих клеток, включая макрофаги, клетки.

Лангерганса, интердигитатные и дендритные клетки, присутствует в организме уже при рождении. По всей вероятности, основная их масса образуется из стволовых клеток костного мозга. Возможно, они происходят из одной и той же клетки-предшественника CD34+. Морфологические, цитохимические и функциональные особенности разных АПК должны тогда определяться последующим влиянием факторов микроокружения, например цитокинов. Другая возможность состоит в том, что АПК образуются из разных стволовых клеток и по разным направлениям дифференцировки. Важное исключение составляют фолликулярные дендритные клетки, локализованные в центрах размножения внутри вторичных лимфоидных фолликулов и происходящие, возможно, от мезенхимных клеток. В первичных фолликулах периферических лимфоидных тканей ФДК присутствуют уже при рождении. В отличие от других АПК они лишены подвижности. Уже на очень ранних стадиях развития организма АПК присутствуют в тимусе, причем их участие в МНС-рестрикции и селекции Т-клеток показывает, что по крайней мере некоторые из них к этому времени достигают полной зрелости. Однако активность АПК на ранних стадиях развития организма явно неоптимальна. У новорожденных крысят, например, образование антител к эритроцитам барана происходит только при одновременном введении АПК взрослых крыс.

## Система комплемента

На ранних стадиях развития организма содержание компонентов комплемента в крови низкое.

Составной частью системы врожденного иммунитета служит система комплемента, играющая большую роль в защите организма от микробов. Идентифицировано примерно 30 различных белков плазмы, входящих в систему комплемента. Они появляются на стадии внутриутробного развития и обнаруживаются в крови раньше, чем IgM. В сыворотке новорожденного их уровень составляет 50-60% уровня, характерного для взрослого организма.

Развитие функции антигенпрезентирующей клетки - процессинга и презентации антигена. В этом опыте новорожденным крысятам вводили:

1) только эритроциты барана,

2) ЭБ + клетки селезенки взрослых крыс,

3) ЭБ + клетки селезенки, лишенной АПК, или 4) ЭБ + зрелые тимоциты. Во всех случаях взрослые крысы принадлежали к той же линии, что и новорожденные. У крысят каждой группы регистрировали гуморальный иммунный ответ - появление антител. У новорожденных крысят, которым вводили только ЭБ, антитела к ЭБ-антигенам не образовывались. Однако при одновременном введении спленоцитов взрослых крыс иммунный ответ развивался. Ни зрелые спленоциты в отсутствие АПК, ни тимоциты сами по себе не вызывали продукции антител. Следовательно, АПК новорожденных особей неспособны эффективно осуществлять процессинг и презентацию ЭБ-антигенов.

В ряду с фагоцитами, выполнял у животных основную функцию иммунной защиты. Таким образом, онтогенез в определенной степени повторяет филогенез.

## Лимфоидные клетки

Недавно проведенные эксперименты на мышах показали, что общий предшественник лимфоидных клеток впервые появляется в каудальной части спланхноплевры. Клетки-предшественники, вероятно, мигрируют с кровотоком в желточный мешок, а затем в первичные лимфоидные органы - тимус и печень плода, где они развиваются соответственно в Т - и В-клетки. Зрелые лимфоциты перемещаются затем во вторичные лимфоидные ткани, где приобретают способность реагировать на антиген.

Т-клетки развиваются в тимусе.

Образование Т-клеток начинается с миграции стволовых клеток.

Тимус развивается из третьего глоточного кармана в виде эпителиального зачатка эндо - и эктодермального происхождения, который заселяется стволовыми клетками из крови. Для формирования огромного разнообразия зрелых Т-клеток с различной специфичностью антигенных рецепторов требуется, по-видимому, относительно немного стволовых клеток. В образовании закладки тимуса, по крайней мере у мыши, участвуют два слоя эмбриональной ткани: эктодерма третьей жаберной щели, из которой формируется эпителий корковой зоны тимуса, и эндодерма третьего глоточного кармана, дифференцирующаяся в эпителий мозговой зоны тимуса.

Как показывают экспериментальные исследования, миграция стволовых клеток в тимус происходит не случайно, а в ответ на хемотаксические сигналы, периодически исходящие из зачатка тимуса. Одним из хемоаттрактантов может служить Р2-микроглобулин. компонент молекул МНС класса I. У птиц колонизация тимуса стволовыми клетками происходит двумя или тремя волнами, но у млекопитающих такой волнообразный процесс не доказан. Попав в тимус, стволовые клетки под влиянием эпителиального микроокружения начинают дифференцироваться в тимические лимфоциты. Неясно, являются ли стволовые клетки "пре-Т-клетками", т.е. начинается ли их дифференцировка в Т-клетки еще до проникновения в тимус. Хотя стволовые клетки экспрессируют CD7, многие данные указывают на их полипотентность. Из гемопоэтических клеток-предшественников, выделенных из тимуса, in vitro развиваются гранулоциты, АПК, З К, В-клетки и клетки миелоидного ряда. Это означает, что проникающие в зачаток тимуса костномозговые клетки сохраняют исходную пол и потентность.

Созревание Т-клеток происходит по мере перемещения тимоцитов из корковой зоны в мозговую.

Тимус состоит из долек, в каждой из которых различают корковую и мозговую зоны. В этих зонах присутствуют эпителиальные клетки, макрофаги и имеющие костномозговое происхождение интердигитатные клетки с высоким уровнем экспрессии антигенов МНС класса II. Для дифференцировки Т-лимфоцитов необходимы клетки всех этих трех типов. Например, специализированные эпителиальные клетки из периферических областей корковой зоны тимуса содержат тимоциты в своих цитоплазматических "карманах" и могут участвовать в процессе их "обучения". Поступающие из костного мозга стволовые клетки в первую очередь колонизируют подкапсульный слой тимуса. Они развиваются в крупные, активно пролиферирующие лимфобласты, которые и лают начало популяции тимоцитов.

В корковой зоне тимуса присутствует гораздо больше развивающихся лимфоцитов, чем в мозговой зоне. Изучение функции клеток и их поверхностных маркеров показывает, что тимоциты корковой зоны являются менее зрелыми, чем тимоциты мозговой зоны. Судя по этому, тимоциты мигрируют из коркового слоя в мозговой, где происходит их созревание. Полностью созревшие Т-клетки покидают тимус через посткапиллярные венулы, расположенные в зоне соединения коркового и мозгового слоев. Однако могут существовать и другие пути выхода клеток из тимуса, в том числе через лимфатические сосуды.

В процессе созревания Т-клетки меняют свой фенотип.

Процесс превращения стволовых клеток в зрелые Т-клетки, как и созревание гранулоцитов и моноцитов, сопровождается появлением или исчезновением на их поверхности "дифференцировочных" маркеров, имеющих функциональное значение. Анализ генов, кодирующих сф - и гд-рецепторы Т-клеток, а также изучение смены поверхностных антигенов показывают, что дифференцировка Т-клеток в тимусе происходит по меньшей мере в двух направлениях. Неясно, различаются ли эти пути с самого начала; вероятнее всего, они представляют собой ответвления от одного общего исходного пути. Лишь очень небольшая доля зрелых лимфоцитов тимуса экспрессирует гд-ФкС. Большинство же тимоцитов дифференцируется в клетки с бв-ФкС; на их долю приходится более 99% Т-лимфоцитов, присутствующих во вторичных лимфоидных тканях и крови.

Фенотипический анализ обнаруживает последовательные изменения в антигенном составе клеточной мембраны при созревании Т-клеток. Изменения фенотипа упрощенно можно представить в виде трехстадийной модели.

Тимоциты I стадии Стадия I включает две фазы. В первой фазе клетки экспрессируют CD44 и CD25, но при этом они дважды отрицательные - CD4~, CD8~; гены ТкР сохраняют гаметную конфигурацию. Клетки, находящиеся в этой фазе, способны дифференцироваться и в других направлениях. Во второй фазе они теряют ЈD44, но все еще остаются отрицательными и по CD4, и по CD8; перестраивается ген в-цепи ТкР.45 этот период тимоциты экспрессируют цитоплазматическую форму молекулы CD3, образующей комплекс с ТкР, и таким образом коммитированы к дифференцировке в Т-клетки. Экспрессия CD7, наряду с CD2 и CD5, продолжается. На этой стадии экспрессируются и маркеры пролиферации, такие как рецептор трасферрина и CD38. Следует обратить внимание на то, что ни один из маркеров пролиферации не специфичен для Т-клеточного пути дифференцировки. Однако для ранних тимоцитов этот путь предопределяется перестройкой гена в-цепи ТкР и экспрессией в цитоплазме комплекса CD3.

Тимоциты II стадии На долю этих клеток всегда приходится примерно 85% всех лимфоидных клеток тимуса. Для них характерен фенотип CD1+,CD44~,CD25~, но при этом они дважды положительные - CD4+,CD8+. В промежуточных тимоцитах происходит перестройка генов, кодирующих б-цепь ТкР; на клеточной поверхности с низкой плотностью экспрессируются обе цепи бв-рецептора в ассоциации с комплексом CD3.

Тимоциты III стадии На этой стадии происходят резкие изменения фенотипа клеток, а именно потеря CD1, экспрессия на мембране с высокой плотностью комплекса бв-ФкС - CD3 и разделение клеток на два подтипа, экспрессирующих один CD4, другой CD8. Большинство тимоцитов на этой стадии лишены CD38 и рецептора трансферрина и их практически невозможно отличить от зрелых Т-клеток крови. Все эти клетки, обнаруживаемые в мозговой зоне тимуса, экспрессируют рецептор CD44, предположительно участвующий в миграции и хоминге лимфоцитов в периферических лимфоидных тканях. На этой стадии экспрессируется также L-селектин.

Разнообразие Т-клеточных рецепторов формируется в тимусе.

Т-клетки способны распознавать огромное количество разнообразных антигенов. В процессе созревания этих клеток в тимусе гены бв - и гд-ФкС претерпевают соматическую рекомбинацию, образуя функциональные гены для различных Т-клеточных рецепторов. Цепи в и д кодируются сегментами V, D и J, тогда как для синтеза а - и г-цепей служат только сегменты V и J. Первыми в процессе созревания Т-клеток перестраиваются гены ТкР, кодирующие г-цепи, а затем уже гены в - и б-цепей. В результате случайных сочетаний разных генных сегментов возникает множество продуктивных перестроек. Это обеспечивает экспрессию разнообразных пептидных последовательностей вариабельных участков обеих цепей ТкР. Тимоциты, в которых перестройка генов оказывается непродуктивной, погибают. Как и при создании разнообразия В-клеточных рецепторов, важнейшую роль в процессе перестройки, обусловливающей разнообразие Т-клеточных рецепторов для антигенов, играют два активирующих рекомбинацию гена - RAG-1 и RAG-2.

Вначале ТкР экспрессируются на клеточной поверхности с низкой плотностью. Это характерно для Т-клеток подкапсульного и наружного слоев корковой зоны тимуса, в которых клетки активно пролиферируют.

"Альтернативные" формы ТкР в процессе созревания.

Исследования на трансгенных мышах показали, что в ранней стадии онтогенеза Т-клетки могут экспрессировать альтернативные формы ТкР, которые, возможно, участвуют в передаче дифференцировочных сигналов. Это димеры в-ФкС, ассоциированные с CD3 в отсутствие а-ТкР; мембраносвязанные цепи в-ФкС, ассоциированные с фосфатидилинозитолом, а не CD3; в-цепи ТкР, ассоциированные на поверхности клетки с неполным комплексом CD3 и без б-цепи ТкР. Наконец, возможна экспрессия "суррогатной" б-цепи, роль которой, по-видимому, выполняет недавно идентифицированный гликопротеин 33 кДа. Не исключено, что такие рецепторы, как и "суррогатные" пре-В-клеточные рецепторы, принимают участие в процессах пролиферации, созревания и селекции на ранних стадиях дифференцировки лимфоцитов.

В тимусе происходит положительная и отрицательная селекция развивающихся Т-клеток. Положительная селекция Т-клетки распознают антигенные пептиды только представленными в "контексте" собственных молекул МНС на поверхности АПК. В действительности Т-клетки осуществляют двойное распознавание - и антигенных пептидов, и полиморфной части молекул МНС. Положительная селекция заключается в том, что дальнейшей дифференцировке подвергаются только те клетки, ТкР которых обладают невысокой аффинностью к собственным молекулам МНС. По имеющимся данным, положительную селекцию осуществляют эпителиальные клетки тимуса, выступающие в роли АПК. Т-клетки, рецепторы которых обладают очень высокой или очень низкой аффинностью к собственным молекулам МНС, подвергаются в корковой зоне тимуса апоптозу и погибают. Апоптоз - это запрограммированное "самоубийство" клетки, осуществляемое активированными эндогенными нуклеазами путем расщепления ДНК на фрагменты.

Т-клетки с рецепторами, обладающими невысокой аффинностью, избегают апоптоза, выживают и продолжают путь созревания.

Отрицательная селекция Некоторые Т-клетки, прошедшие положительную селекцию, могут обладать рецепторами, распознающими не молекулы МНС, а другие компоненты собственных тканей. Такие клетки выбраковываются путем "отрицательной селекции", происходящей в более глубоких слоях корковой зоны тимуса, в месте соединения корковой и мозговой зон и в мозговой зоне. Тимоциты взаимодействуют с собственными антигенами, которые презентируются интердигитатными клетками. Дальнейшее созревание "разрешается" только тем тимоцитам, которые лишены способности распознавать собственные антигены; остальные подвергаются апоптозу и разрушаются. Эти отмирающие тимоциты, как и любые другие апоптотические клетки тимуса, в глубоких слоях корковой зоны фагоцитируются макрофагами, содержащими окрашивающиеся тельца. Существование отрицательной селекции недавно было убедительно доказано в исследованиях на мышах, у которых экспрессированные в тимусе эндогенные суперантигены вызывают элиминацию Т-клеток, несущих ТкР с той или иной Хв-цепью

Т-клетки на этой стадии созревания продолжают экспрессировать ТкР с высокой плотностью, но теряют либо CD4, либо CD8, становясь моноположительными зрелыми тимоцитами. Эти разные субпопуляции CD4+ - и С08+-клеток, обладая специальными рецепторами хоминга, мигрируют в периферические лимфоидные ткани, где функционируют как зрелые хелперные и цитотоксические Т-клетки соответственно. Тимус покидает менее 5% тимоцитов; остальные погибают в процессе селекции или вследствие неспособности экспрессировать антигенные рецепторы.

## Роль молекул адгезии и цитокинов в созревании тимоцитов

Важнейший момент в дифференцировке Т-клеток - это адгезия созревающих тимоцитов к эпителиальным и вспомогательным клеткам тимуса. Она происходит за счет взаимодействия комплементарных молекул адгезии, например CD2 с LFA-3 и LFA-1 с ICAM-1.

В результате этого взаимодействия индуцируется синтез цитокинов ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-6 и ГМ-КСФ, необходимых для созревания Т-клеток. На ранних стадиях созревания тимоциты экспрессируют также рецептор для ИЛ-2. Этот цитокин вместе с другими молекулами способствует пролиферации клеток, которая происходит главным образом в подкапсульном слое и наружных слоях корковой зоны тимуса.

Некоторые Т-клетки созревают вне тимуса.

Отрицательная селекция может осуществляться в периферических лимфоидных тканях.

При созревании в тимусе элиминируются не все аутореактивные Т-клетки. Это, по-видимому, связано с тем, что не все аутоантигены способны проходить через тимус. Эпителиальный барьер тимуса может ограничивать также доступность некоторых антигенов из крови. Поскольку часть аутореактивных Т-клеток выживает, для предотвращения их реакции на собственные ткани организма необходим дополнительный механизм. Недавно проведенные эксперименты на трансгенных мышах позволяют предполагать, что для периферической инактивации аутореактивных Т-клеток может существовать два механизма:

• подавление экспрессии ТкР и CD8, вследствие которой такие клетки теряют способность взаимодействовать с аутоантигенами-мишенями, и

• анергия, развивающаяся при отсутствии необходимых вторых сигналов активации, источником которых служат клетки-мишени.

## Созревание Т-клеток вне тимуса

Хотя для дифференцировки подавляющего большинства Т-клеток необходим функционирующий тимус, небольшое количество клеток, обладающих Т-клеточными маркерами, обнаруживается и у бестимусных мышей. Не исключено присутствие у таких мышей закладки тимуса, однако все больше данных указывает на то, что костномозговые предшественники могут заселять эпителий слизистых оболочек, созревая там без участия тимуса в функциональные Т-клетки, экспрессирующие гд-ФкС и, возможно, также бв-ФкС. Значение внетимусного созревания Т-клеток у эутимических животных пока остается неясным.

Т-клетки новорожденных неполностью зрелые.

Большинство Т-клеток, присутствующих в крови новорожденных, несут маркер CD45RA; это свидетельствует, что они еще не встречались с антигеном. Кроме того, при взаимодействии с различными антигенами Т-клетки новорожденных вырабатывают меньше интерферона-у, чем зрелые Т-клетки.

В-клетки млекопитающих созревают в костном мозге и печени плода

У млекопитающих специальный орган для лимфопоэза В-клеток отсутствует. Эти клетки развиваются непосредственно из лимфоидных стволовых клеток в гемопоэтической ткани в печени плода, у человека на 8-9 неделе, у мыши примерно на 14 сутки внутриутробного развития. Позднее образование В-клеток происходит уже не в печени, а в костном мозге, где и продолжается в течение всей жизни организма.

То же относится и к другим направлениям дифференцировки гемопоэтических клеток - эритроцитарному, гранулоцитарному, моноцитарному и тромбоцитарному. Недавно показано, что у мыши и человека во время внутриутробного развития предшественники В-клеток присутствуют также в ткани сальника. Появляются ли они здесь раньше, чем в закладке печеночной ткани плода, неизвестно.

Образование В-клеток в костном мозге происходит не в отдельных участках.

В-клетки-предшественники в костном мозге примыкают к эндосту костной пластинки. Каждая В-клетка-предшественник на стадии перестройки генов иммуноглобулинов может давать до 64 клеток-потомков, и эти клетки мигрируют к центру каждой полости губчатой кости, достигая просвета венозного синусоида. Созревание В-клеток в костном мозге происходит при их тесном контакте с клетками стромы, расположенными как вблизи эндоста, так и в окружении центрального синуса, где они называются адвентициальными клетками. Ретикулярные клетки имеют смешанные фенотипические признаки, будучи сходны по некоторым из них с фибробластами, эндотелиальными клетками и миофибробластами. Они продуцируют коллаген IV типа, ламинин и гладкомышечную форму актина. Эксперименты in vitro показывают, что стромальные клетки поддерживают дифференцировку В-клеток, возможно за счет продукции ИЛ-7. Адвентициальные клетки могут играть важную роль в процессе высвобождения зрелых В-клеток в центральный синус.

В-клетки подвергаются процессам селекции.

Большинство созревающих в костном мозге В-клеток не попадает в кровоток, а подобно тимоцитам погибает в результате апоптоза и поглощения костномозговыми макрофагами. Предполагается, что при взаимодействии В-клеток с клетками стромы происходит своего рода положительная селекция, которая "спасает" от запрограммированной гибели небольшую часть В-клеток с продуктивной перестройкой генов иммуноглобулинов. Отрицательная селекция аутореактивных В-клеток может происходить в костном мозге или селезенке - органе, в который мигрирует большинство новообразованных В-клеток в период внутриутробного развития.

Кинетические исследования позволяют рассчитать, что у мыши ежесуточно образуется примерно 5· 107 В-клеток. Поскольку селезенка мыши содержит приблизительно 7,5· 107 В-клеток, огромная часть их должна погибать, что происходит, вероятно, на стадии пре-В-клеток из-за непродуктивной перестройки рецепторных генов или из-за экспрессии этими клетками аутореактивных иммуноглобулиновых рецепторов.

Маркерами зрелых В-клеток служат иммуноглобулины.

Лимфоидные стволовые клетки, экспрессирующие терминальную дезоксинуклеотидилтрансферазу, пролиферируют, дифференцируются и претерпевают перестройку генов иммуноглобулинов, что приводит к образованию пре-В-клеток, в цитоплазме которых появляются тяжелые м-цепи. Некоторые из этих пре-В-клеток и на своей поверхности несут небольшое количество м-цепей, ассоциированных с "суррогатными" легкими цепями, Vnpe\_B и л5. К этому времени уже происходит аллельное исключение либо материнских, либо отцовских генов иммуноглобулинов. Из пролиферирующих крупных пре-В-клеток образуются пре-В-клетки меньших размеров. Как только В-клетка начинает синтезировать легкие цепи, которые могут быть к - или л-типа, ее антигенный рецептор slgM приобретает антигенсвязываюшую специфичность. Таким образом, одна В-клетка способна производить антитела лишь одной специфичности - основное положение теории клональной селекции относительно продукции антител. В стадии про-В-клеток на клеточной поверхности появляются ассоциированные с иммуноглобулинами молекулы Igoc и IgP.

На развивающихся В-клетках появляются характерные молекулы поверхности.

В процессе развития В-клеток происходят перестройка генов иммуноглобулинов и фенотипические изменения, сходные с описанными выше для Т-клеток. Самым ранним указанием на начало В-клеточной линии дифференцировки служит перестройка генов тяжелых цепей lg в В-клетках-предшественниках. На последующих стадиях развития пре-В-клеток перестраиваются гены легких цепей. Раньше начала синтеза иммуноглобулинов экспрессируются некоторые поверхностные маркеры В-клеток, а именно молекулы МНС класса II, CD 19, CD20, CD21, CD40 и антиген CD 10. Последний из этих маркеров представляет собой высококонсервативную нейтральную эндопептидазу, временно экспрессируемую на ранних предшественниках В-клеток еще до появления в цитоплазме тяжелых м-цепей. Позднее, уже после активации антигеном, В-клетки вновь начинают экспрессировать антиген CALLA. Другие маркеры, например CD23 и CD25, обнаруживаются главным образом на активированных В-клетках.

Ранние этапы развития В-клеток зависят от ряда факторов роста и дифференцировки. На разных стадиях дифференцировки В-клетки экспрессируют рецепторы для этих факторов. Процесс дифференцировки инициируют ИЛ-7, ИЛ-3 и низкомолекулярный фактор роста В-клеток, тогда как на последующих стадиях действуют иные факторы.

В-клетки мигрируют во вторичные лимфоидные ткани, где осуществляют свои функции.

Ранние В-клетки-"иммигранты" в селезенке и лимфоузлах плода являются slgM+-KneTKaMH, на поверхности которых присутствует CD5. В-клеткипредшественники CD5+ обнаруживаются также в сальнике плода и в зоне мантии вокруг вторичных фолликулов зрелых лимфоузлов.

После антигенной стимуляции зрелые В-клетки могут превращаться в клетки иммунологической памяти или в антителообразуюшие клетки. Плазматические клетки обычно теряют поверхностные иммуноглобулины, поскольку функция этих lg в качестве рецепторов им больше не нужна. Подобно всем другим окончательно дифференцированным гемопоэтическим клеткам плазматическая клетка имеет ограниченную продолжительность жизни и в конце концов подвергается апоптозу.

Незрелые и зрелые В-клетки отвечают на антиген по-разному. При обработке антителами ан-ти-IgM или антигеном и те и другие теряют slgM, молекулы которого удаляются путем кэппинга и эндоцитоза. Однако ресинтез slgM наблюдается в культуре только у зрелых В-клеток. Такая индуцированная потеря антигенного рецептора может служить одним из механизмов приобретения аутореактивными В-клетками толерантности в процессе их созревания.

У птиц В-клетки созревают в фабрициевой сумке.

Лимфопоэз В-клеток у птиц начинается в специальном лимфоэпителиальном органе – фабриции.

## Разнообразие специфичностей антител

Разнообразие антител создается путем перестройки генов.

В любой соматической клетке вариабельные участки генов, включающие сегменты V, D и J, находятся в гаметной конфигурации. На ранних стадиях развития В-клеток происходит делеция промежуточных последовательностей между сегментами D и J и эти сегменты сближаются. На стадии В-клеток-предшественников происходит дальнейшая перестройка V-, D - и J-сегментов вариабельного участка генов тяжелых цепей. Рекомбинированный ген крупной пре-В-клетки экспрессируется с образованием м-цепи, локализованной в цитоплазме. Эти активно пролиферирующие В-клетки-предшественники затем перестраивают свои Ук-гены, а если такая перестройка оказывается непродуктивной, то и нл-гены. При продуктивной перестройке генов легких цепей незрелая В-клетка экспрессирует на своей поверхности м-цепи в сочетании с имеющейся легкой цепью. Клетки, в которых происходит непродуктивная перестройка генов, погибают в результате апоптоза. Этим объясняется гибель столь значительного количества пре-В-клеток в ходе их созревания. В случае появления в незрелых В-клетках после перестройки генов таких легких цепей рецепторов, которые специфичны по отношению к собственным антигенам, легкие цепи могут подвергаться дальнейшей перестройке. Экспрессия м-цепей с суррогатными легкими цепями до появления к - и л-цепей, возможно, важна для селекции В-клеток на ранних стадиях развития.

Закладка ее развивается из выпячивания эндодермы задней кишки и заселяется стволовыми клетками из крови. Исследования на химерах курица/куропатка показывают, что стволовые клетки проникают в сумку только в период между 10 и 14 сутками эмбрионального развития. Пиронинофильные клетки находятся в тесном контакте с эпителиальными клетками. Пролиферирующие клетки сумки образуют корковый и мозговой слои каждого фолликула, который может заселяться одной или несколькими стволовыми клетками.

Разнообразие антител формируется не совсем случайным образом.

Как только начинают продуцироваться к - или л-цепи, поверхностный IgM на незрелых В-клетках приобретает свойства функционального антигенного рецептора. Считается, что V-, D - и J-ceгменты для тяжелых цепей, как и V - и J-сегменты для легких цепей в В-клетках перестраиваются случайным образом. Однако данные, полученные на мышах, крысах и цыплятах, указывают на то, что формирование специфичностей антител происходит в запрограммированной последовательности. Продукция антител в отличие от распознавания антигенов В-клетками зависит как от Ф-клеток, так и от АПК. Механизм запрограммированного формирования специфичностей в В-клетках на молекулярном уровне остается неясным; возможно, он состоит либо в избирательном использовании сегментов V-гена, ближайших к D - и J-сегментам, с перемещением соответствующих рекомбиназ в направлении 3'-конца, либо в отрицательной селекции отдельных клонов, либо включает оба эти пути.

В-лимфоциты CD5+ - отдельная субпопуляция.

Многие В-клетки, появляющиеся на ранних стадиях онтогенеза, экспрессируют CD5. Иммуноглобулины таких клеток кодируются немутировавшими или лишь минимально мутировавшими гаметными генами. Хотя В-клетки CD5+ продуцируют главным образом IgM, в них синтезируется и некоторое количество IgG и IgA. Эти так называемые естественные антитела обладают низкой авидностью, но иногда бывают полиреактивными и в сыворотке зрелых особей присутствуют в высокой концентрации. Клетки CD5+ активно реагируют на Т-независимые антигены, возможно принимают участие в процессинге и презентации антигенов В-клетками, а также, вероятно, играют определенную роль в толерантности и в развитии гуморального иммунного ответа. Предполагается, что естественные антитела формируют первую линию зашиты от микробов, очищают организм от поврежденных собственных компонентов и участвуют в формировании идиотипических сетей иммунной системы.

## Разнообразие классов антител

В-клетки вырабатывают антитела пяти основных классов: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Существуют также четыре подкласса IgG и два подкласса IgA. Каждая окончательно дифференцированная плазматическая клетка происходит из специфической В-клетки и продуцирует антитела лишь одного класса или подкласса.

В-клетки переключаются на синтез иммуноглобулинов другого класса за счет рекомбинации генов тяжелых цепей.

Первые появляющиеся в процессе развития В-клетки несут в качестве антигенного рецептора IgM. Затем начинается экспрессия и других классов иммуноглобулинов. То, что клетки, несущие на поверхности не IgM, а иммуноглобулины других классов, являются потомками lgM-несущих клеток, доказано в опытах на цыплятах и мышах: после введения антител анти-м животные теряли способность вырабатывать антитела, принадлежащие к любому классу иммуноглобулинов. За образование классов и подклассов антител ответственны гены константной области, кодирующие различные тяжелые цепи. Эти гены группируются на З'-конце локуса тяжелых цепей иммуноглобулинов и у человека расположены в определенной последовательности в 14 хромосоме. Переключение В-клеток с продукции IgM на синтез иммуноглобулинов других классов или подклассов происходит в результате рекомбинации повторяющихся З'-участков переключения и делеции промежуточных Сн-генов. Некоторые В-клетки экспрессируют на поверхности изотипы IgM и IgD; это обеспечивается дифференциальным сплайсингом длинных ядерных РНК-транскриптов Сн-генов.

Переключение изотипа происходит в процессе созревания и пролиферации В-клеток.

Переключение изотипа происходит главным образом в процессе пролиферации В-клеток. однако может иметь место и во время ранней клональной экспансии и созревания В-клеток, еще до их встречи с экзогенным антигеном. Об этом свидетельствует тот факт, что некоторые потомки незрелых В-клеток синтезируют антитела, принадлежащие к другим классам иммуноглобулинов, в том числе IgG и IgA. Дальнейшая дифференцировка В-клеток приводит к синтезу поверхностных IgD - класса антител, присутствующего почти исключительно на мембране В-клеток. Разные классы slg на одной и той же В-клетке обладают одинаковой антигенной специфичностью, т.е. представляют одну и ту же V-область генов хотя позднее, уже после переключения, в результате соматических мутаций может формироваться и дополнительное разнообразие slg в пределах одного и того же клона. Данные о том, что переключение класса иммуноглобулинов возможно и без воздействия антигена, были получены в опытах на позвоночных, развивающихся в гнотоб и отеческой среде, т.е. в условиях, резко ограничивающих возможность попадания в организм экзогенных антигенов.

На экспрессию изотипов может влиять тип антигена.

Некоторые антигены индуцируют выработку антител преимущественно определенного изотипа. Например, углеводы бактериальной клеточной стенки вызывают у мыши независимый от Т-клеток иммунный ответ - продукцию антител главным образом lgG3-n30Tnna, тогда как в ответ на вирусную инфекцию чаще образуются антитела lgG2a-H30Tnna. У человека среди антиполисахаридных антител преобладают антитела IgG2-H30-типа. В основе такой избирательности образования изотипов могут лежать два механизма:

• спонтанное переключение класса иммуноглобулинов до селекции клонов В-клеток и

• переключение, индуцированное de novo в результате взаимодействия с цитокинами - продуктами вспомогательныых клеток - и с Т-клетками.

В настоящее время участие Т-клеток и их цитокинов в переключении изотипа de novo не вызывает сомнений. У мыши Т-клетки стимулируют продукцию IgA в слизистых оболочках. Цитокин ИЛ-4 переключает поликлонально активированные В-клетки на преимущественный синтез изотипа IgGl, одновременно подавляя экспрессию других изотипов. В аналогичной системе ИЛ-5 индуцирует 5-10-кратное возрастание продукции IgA, не влияя на выработку других изотипов, а ИФу усиливает выработку IgG2a, но подавляет продукцию всех других изотипов Ig. Примечательно, что цитокины ИЛ-4 и ИФу, реципрокно регулирующие экспрессию изотипов антител, продуцируются разными субпопуляциями Т-хел-перов. У мыши Txl-клетки выделяют ИФу, аТх2-клетки - ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-10. Недавно аналогичные субпопуляции были обнаружены и у человека, причем, как установлено, у лиц, страдающих атопией, продуцируемый Т-клетка-ми ИЛ-4 стимулирует гиперпродукцию IgE.

Последовательность появления иммуноглобулинов разных классов в ходе созревания В-клеток у человека можно проследить по характеру антител в сыворотке плода и новорожденного. До рождения синтезируется IgM, а в перинатальный период появляются IgG и IgA. Концентрация IgG в сыворотке достигает "взрослого" уровня лишь к 1-2-летнему возрасту, а концентрация IgA еще позднее.

## Образование в-клеток иммунологической памяти

При активации антигеном В-клетки либо созревают в АОК, а затем, достигая окончательной стадии дифференцировки, в плазматические клетки, либо превращаются в клетки памяти. Получены убедительные доказательства того, что важную роль в качестве места формирования В-клеток памяти играют центры размножения в различных периферических лимфоидных тканях. Здесь в В-клетках происходит активное гипермутирование генов вариабельной области антител, в результате которого одни клетки погибают, а другие выживают. Презентация антигена фолликулярными дендритными клетками внутри центров размножения обеспечивает выживание клеток, обладающих высокоаффинными рецепторами к чужеродному антигену.

Этот процесс заслуживает более подробного описания. Антигенспецифические В-клетки, колонизирующие первичные лимфоидные фолликулы, примируются антигеном и превращаются в бласты. Одна или очень немногие В-клетки-бласты проникают в первичные лимфоидные фолликулы и образуют центр размножения. Бласты пролиферируют с высокой скоростью и в течение 3-4 суток их количество достигает примерно 104. На 4 сутки они трансформируются в центробласты, лишенные поверхностных иммуноглобулинов, и мигрируют во внутреннюю область вторичного фолликула, где формируют темную зону центра размножения. Из центробластов образуются центроциты, которые вновь начинают экспрессировать на своей поверхности иммуноглобулины и занимают базальную светлую зону центра размножения. В это время происходит переключение класса иммуноглобулинов. Считается, что гипермутирование генов вариабельной области антител происходит после стимуляции антигеном, презентированным фолликулярными дендритными клетками. Центроциты находятся в тесном контакте с ФДК; взаимодействие между ними происходит при участии молекул лимфоцитарной поверхности LFA-1 и VLA-4 и экспрессируемых на поверхности ФДК молекул ICAM-1 и VCAM-1. Эффективное взаимодействие центроцитов, несущих высокоаффинные рецепторы для антигена, презентируемого ФДК, приводит к образованию активированных клеток, которые покидают вторичные фолликулы либо в виде клеток иммунологической памяти, либо в виде предшественников плазматических клеток. Без взаимодействия с ФДК центроциты погибают в результате апоптоза.