

Лекция 3

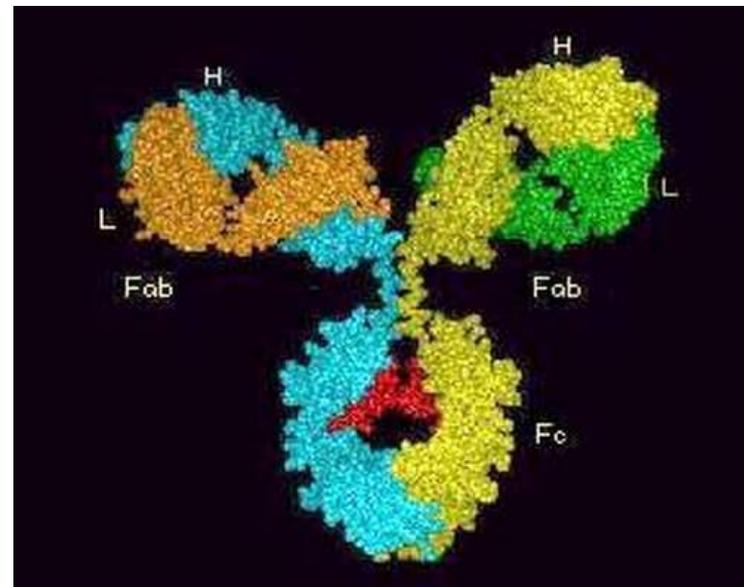
Антитела.

Определение, структура, функции, характеристика основных классов антител.

Минорные иммуноглобулины и их функции.

Динамика антителогенеза.

Возрастные физиологические особенности антителогенеза.



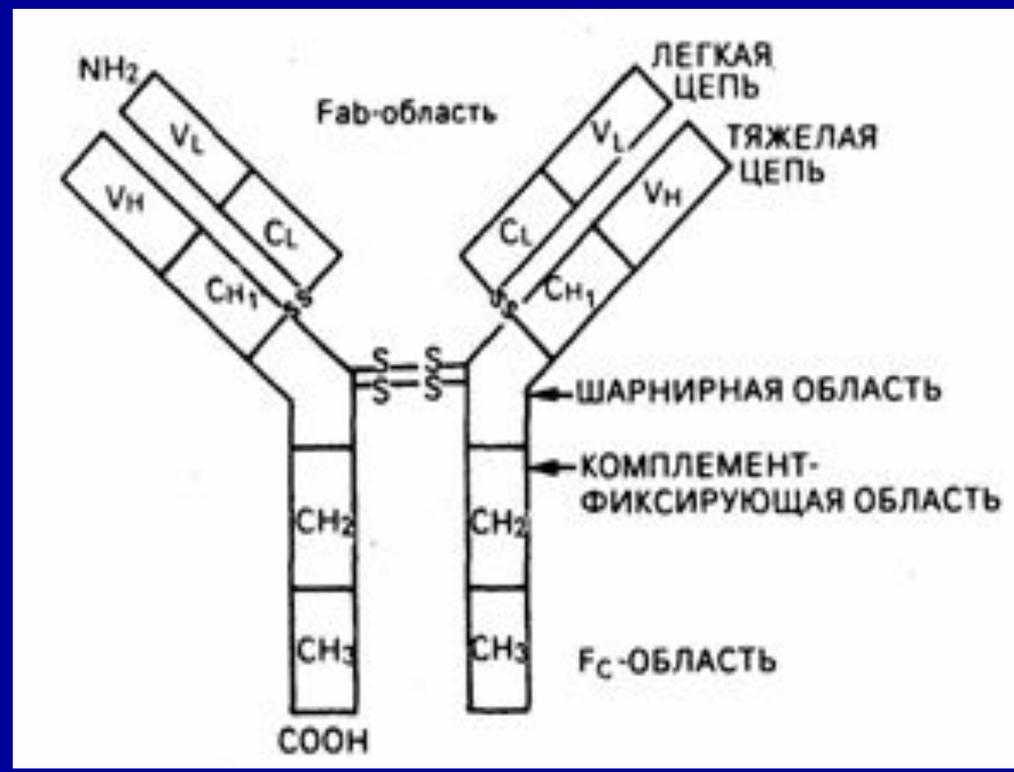
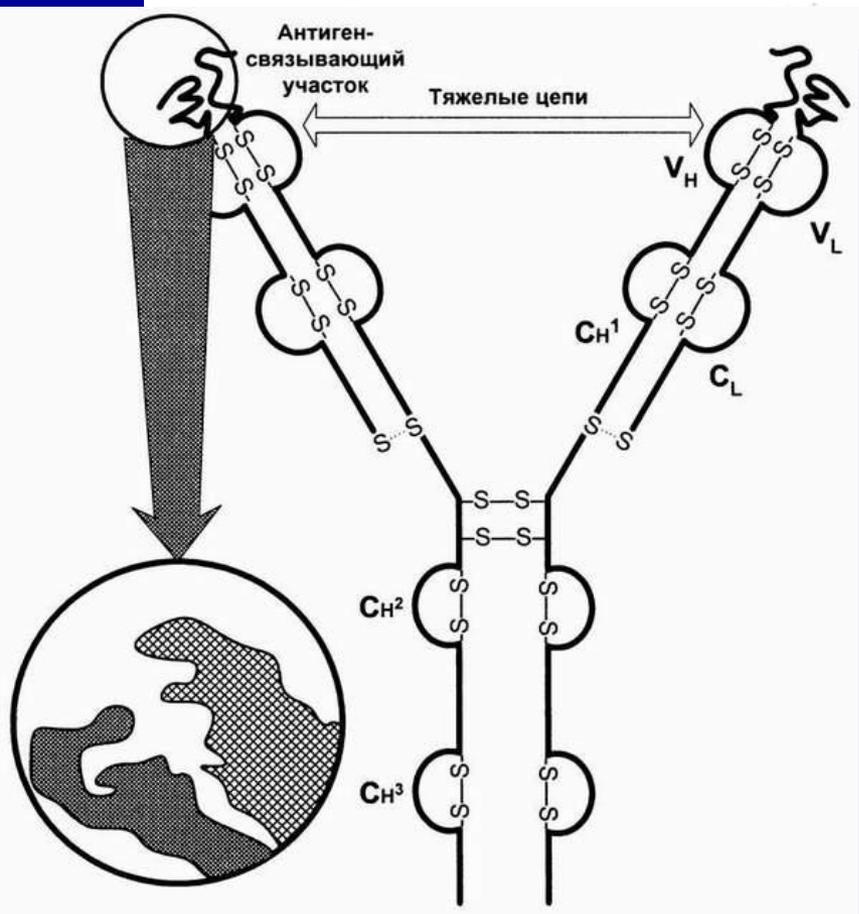
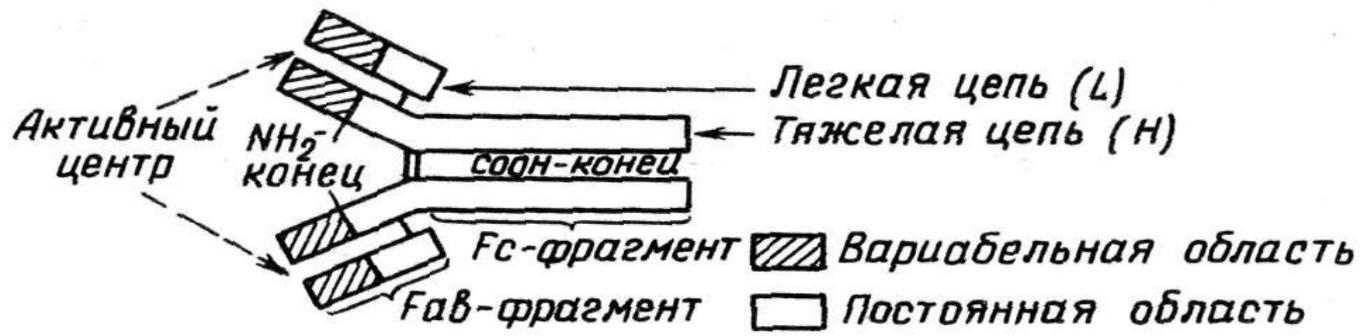
Антитела: общие понятия

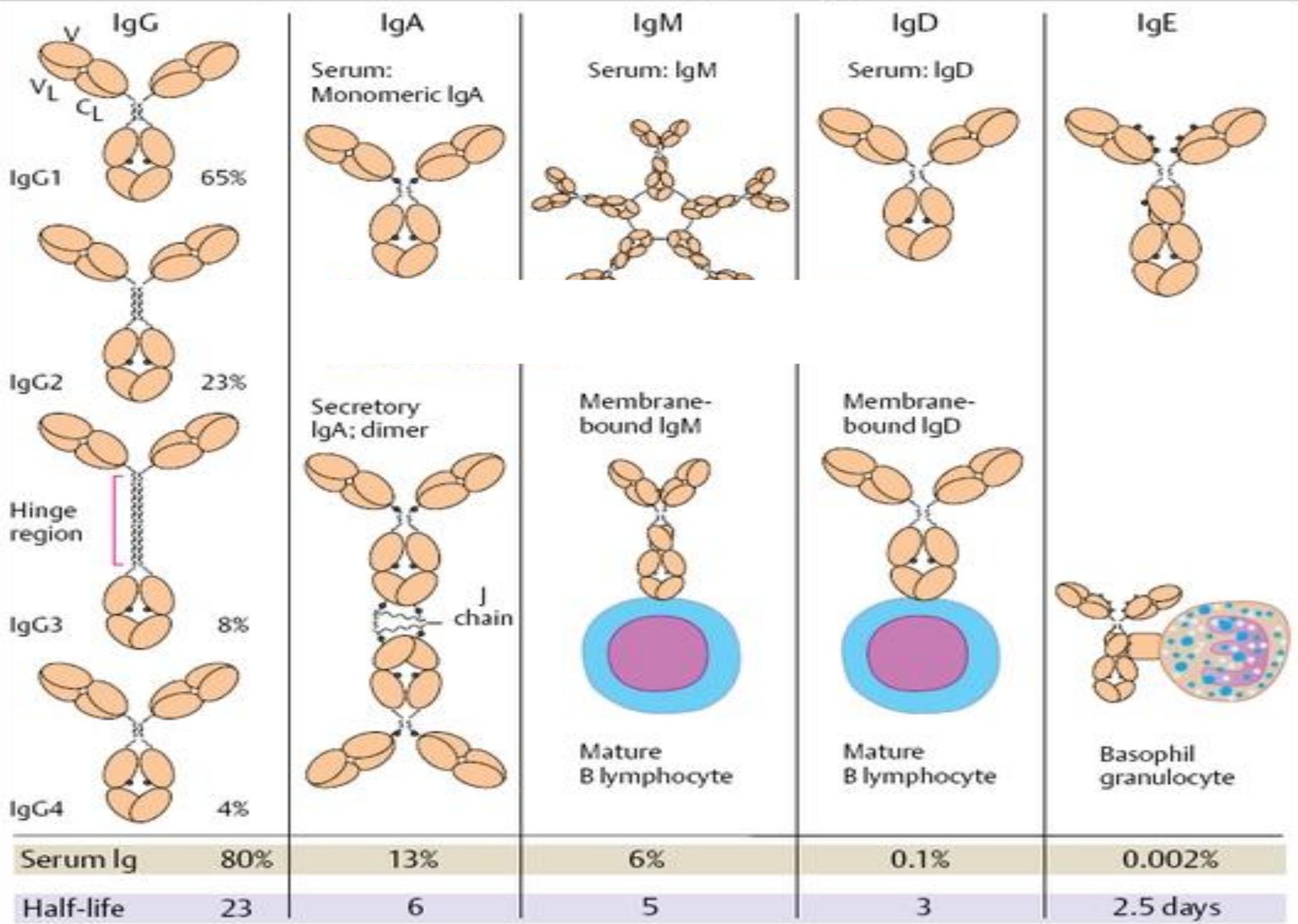
- Антитела (АТ) - важнейший гуморальный продукт системы адаптивного иммунитета
- Синтезируются плазматическими клетками
- Являются крупными белковыми структурами (от 150 кДа)
- Постоянно присутствуют в крови
- На электрофореграмме обнаруживаются преимущественно в гамма-области

- Функцию антител в организме выполняют иммуноглобулины, синтезируемые плазматическими лимфоидными клетками. У человека иммуноглобулины представлены 5 классами (G, M, A, D и E).
- Основная функция антител — инактивация и удаление из организма инфекционных агентов, опухолевых клеток и их продуктов, в том числе токсинов, а также других чужеродных антигенов

Название классов ИГ определено названием тяжелой цепи молекулы -
α, γ, δ, ε, μ







Полимерность и функции иммуноглобулинов

Аффинность и авидность антител

- Сила связывания одного эпитопа с одним активным центром иммуноглобулина - **аффинность**
- Суммарная сила взаимодействия цельной молекулы антитела со всеми антигенными эпитопами - **авидность**

Аффинность
АТ



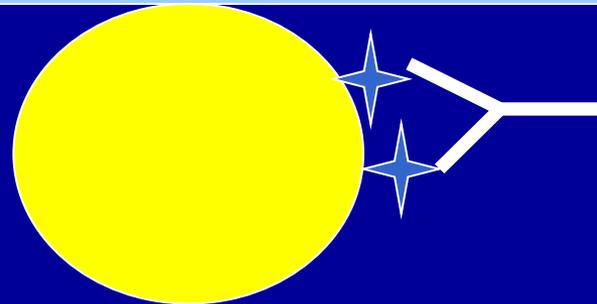
Степень специфического сродства
активного центра АТ и АГ-
детерминанты

Авидность
АТ



«Функциональная аффинность» -
прочность связи между АГ и АТ

Величина авидности
зависит от аффинности



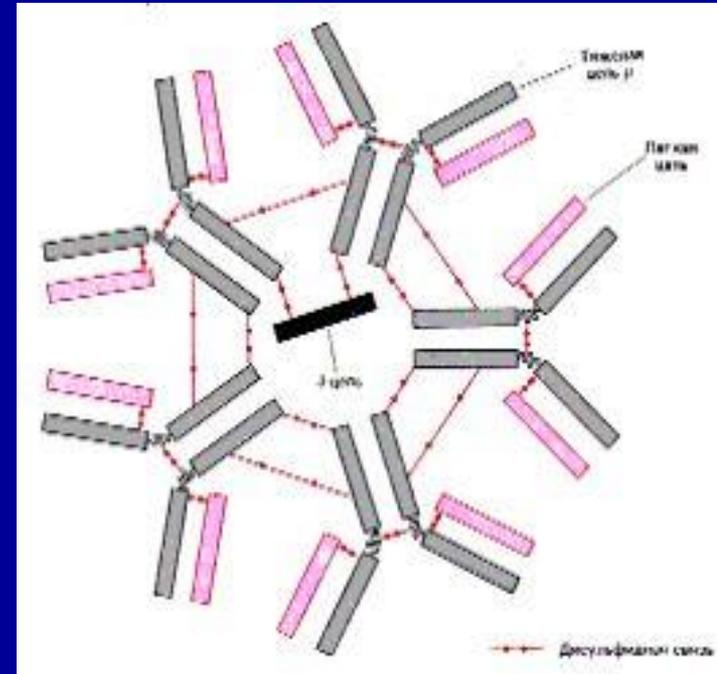
Циркулирующие иммуноглобулины могут обеспечивать следующие формы

антибактериальной защиты:

- нейтрализацию бактериальных токсинов (столбнячного)
- инактивацию факторов вирулентности и распространения бактерий (гиалуронидазы)
- блокаду бактериальных рецепторов ростовых факторов (железосвязывающих белков).
- опсонизирующий эффект для фагоцитоза бактерий
- литический эффект через комплемент
- блокаду подвижности бактериальных органоидов движения
- предотвращение прикрепления бактерий к клеткам организма путём занятия соответствующих адгезивных молекул

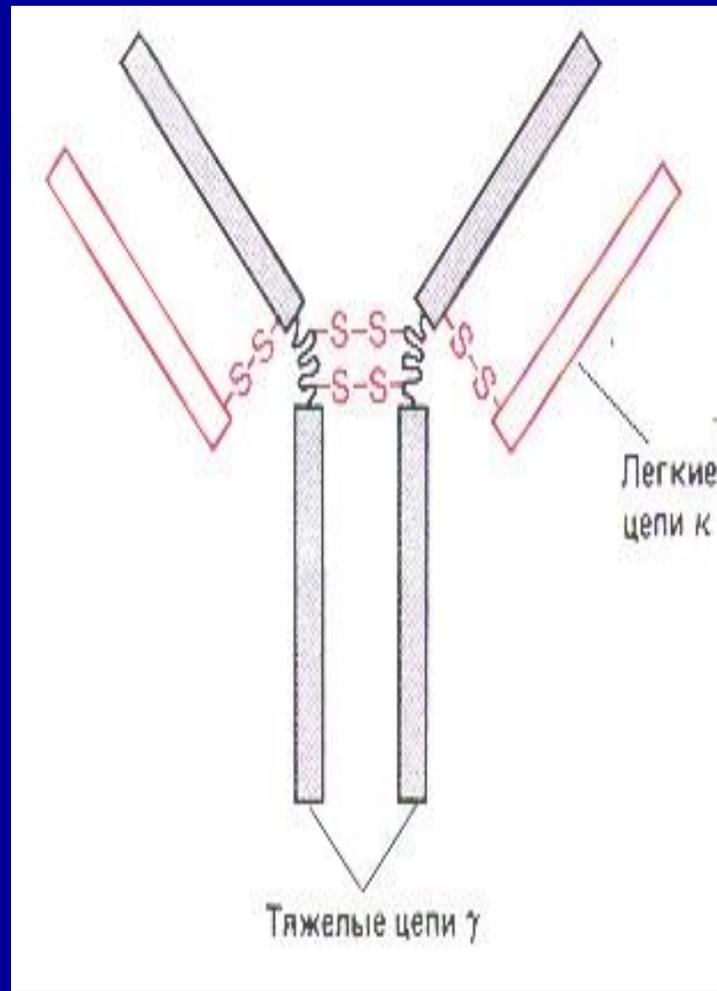
Иммуноглобулин М (IgM)

- В процессе иммунного ответа первыми вырабатываются в организме
- Большая М.М. (970 кДа) и плохое проникновение в ткани
- Состоит из пяти мономеров (пентамер), соединенных дополнительной J-цепью
- Основная физиологическая функция – нейтрализация патогенов (преимущественно – вирусов) в кровяном русле
- активатор классического пути комплемента, эффективный опсонин и агглютинин
- мигрирует при электрофорезе, в основном, в β -глобулиновой и даже, частично, α_2 -глобулиновой фракциях



Иммуноглобулин G (IgG)

- Иммуноглобулины этого ИГ – большинство антител вторичного иммунного ответа
- Мономер, свободно проникает в ткани (равномерное распределение в системе «кровь-ткань»)
- Важный противовирусный и противобактериальный фактор
- Единственный класс антител-нейтрализатор токсинов.
- Активирует комплемент по классическому пути



Подклассы IgG

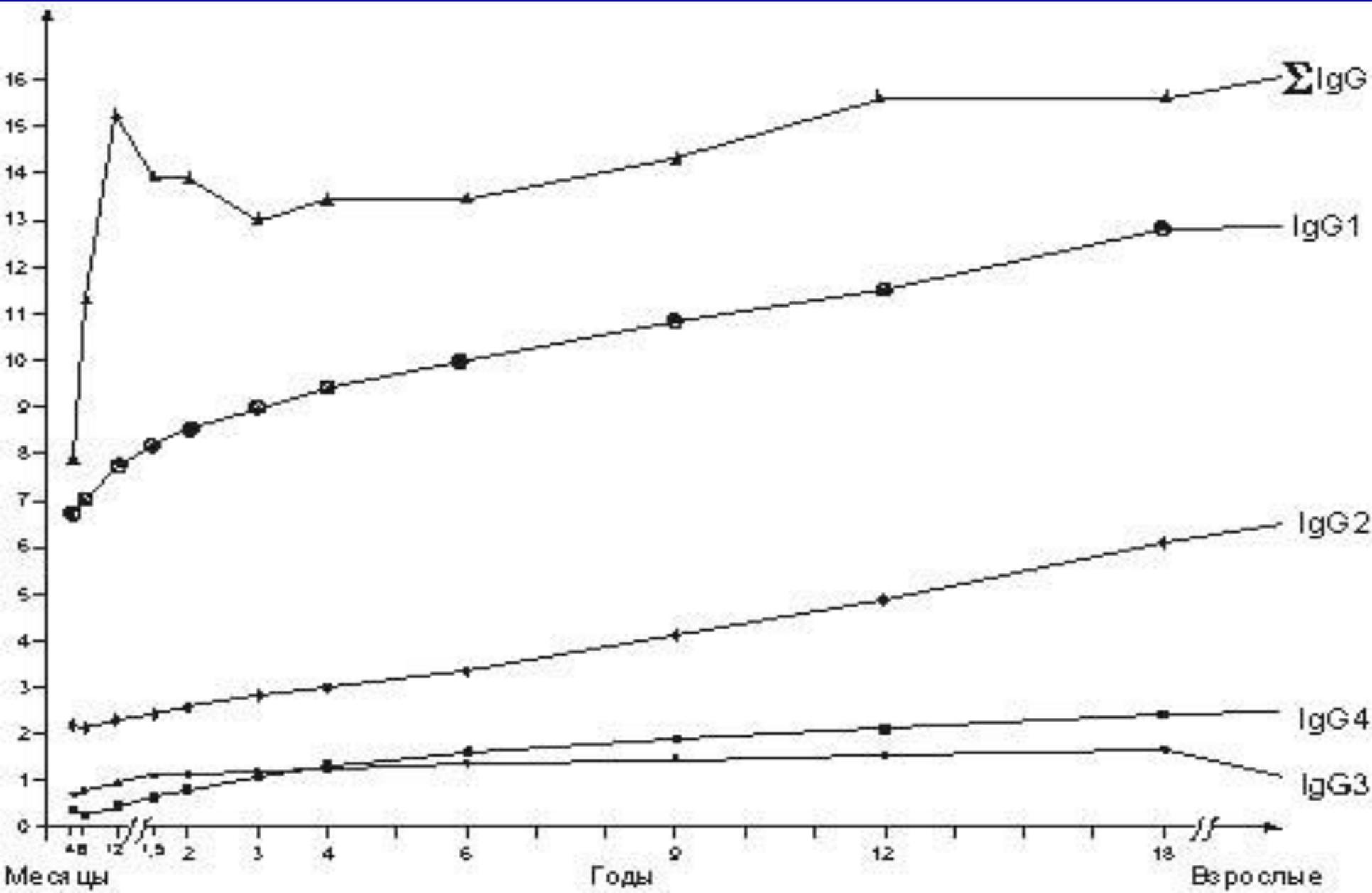
- В зависимости от типа тяжёлой цепи, иммуноглобулины класса G подразделяются на 4 подкласса: **IgG1-IgG4**
- **IgG1 (70%) > IgG2 (20%) > IgG3 (6%) > IgG4 (4%)**
- Структура шарнирного участка заметно отличается у представителей различных подклассов иммуноглобулина G (наиболее длинный - у **IgG3**, самый короткий - у **IgG2**).
- **IgG2 и IgG4** участвуют в прямой нейтрализации патогенов
- В целом, гибкость и подвижность частей молекулы относительно друг друга у подклассов иммуноглобулина G снижается в ряду:

IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2

Трансплацентарный перенос различных подклассов IgG

- Единственный иммуноглобулин, пассивно проникающий через плаценту с помощью плацентарного FcRe для IgG (защищает от катаболизма IgG) в III триместре беременности
- Обеспечивает ребенка противoinфекционной защитой в течение нескольких месяцев после рождения (до наступления момента достаточного синтеза собственных IgG)
- Недоношенные дети имеют высокий риск развития инфекций в постнатальном периоде
- За исключением IgG-2 все подклассы IgG эффективно транспортируются к плоду.
- IgG2 - осуществляет инактивацию инкапсулированных бактерий.
- Материнский IgG-2 содержит преимущественно антитела к бактериальным полисахаридам, поэтому ребенок недополучает антиполисахаридные антитела во время беременности и не синтезирует их на протяжении 2-х лет

Динамика возрастных изменений концентрации IgG и его подклассов



Функции подклассов IgG

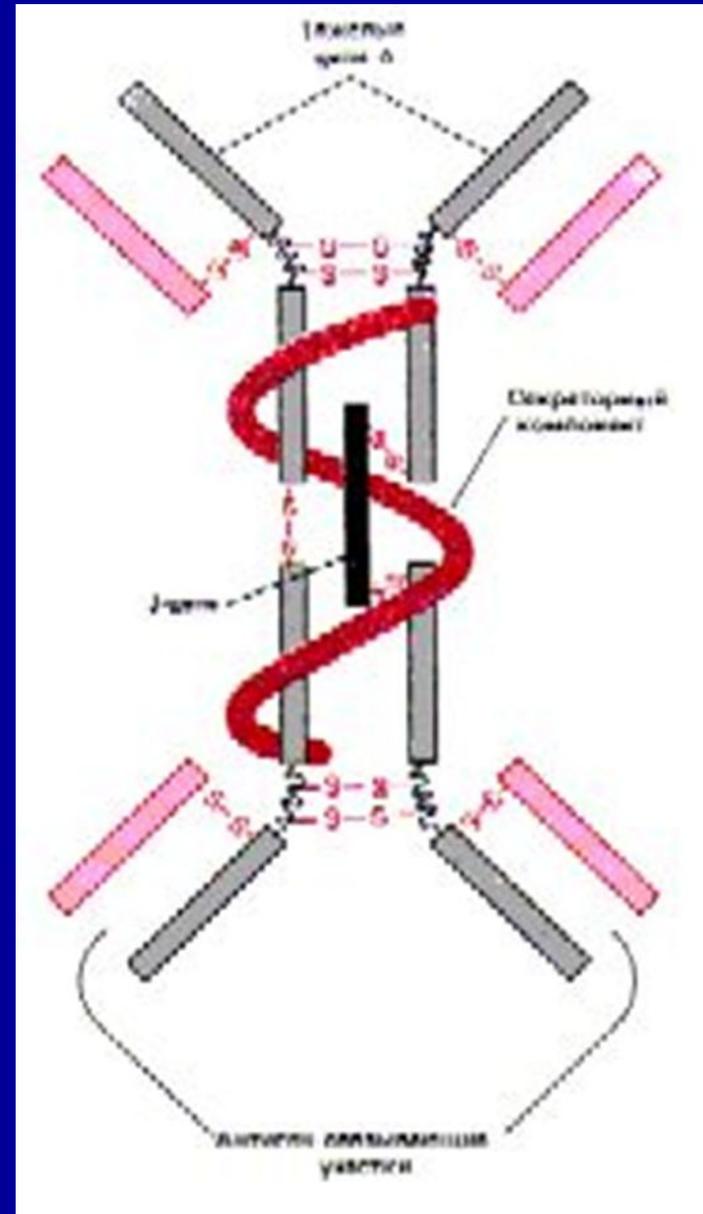
- наиболее активен подкласс **IgG3**, шарнирная область которого обеспечивает молекуле антител максимальное число степеней свободы
- По способности взаимодействовать с **C1q** на первом месте стоит подкласс **IgG3**
- **IgG2** человека играет ключевую роль в инактивации инкапсулированных бактерий

Концентрация
подклассов IgG
у взрослых
(г/л)

- IgG1 - 4,9-11,4;
- IgG2 - 1,5-6,4;
- IgG3 - 0,2-1,1;
- IgG4 - 0,08-1,4

Иммуноглобулин А (IgA)

- Наиболее активно синтезируемый и потребляемый в организме иммуноглобулин
- Хотя его концентрация в сыворотке невелика (2-4 г\л) тотальная продукция составляет 60% от всего объема иммуноглобулинов - Это связано с его постоянной экскрецией через слизистые барьеры
- Он покрывает наружные оболочки кишечника, бронхов, влагалища, ротовой и носовой полости, глаза.
- За сутки во взрослом организме производится до 15 г IgA (у кормящих матерей - еще выше, концентрация IgA в молозиве -до 18 г\л)

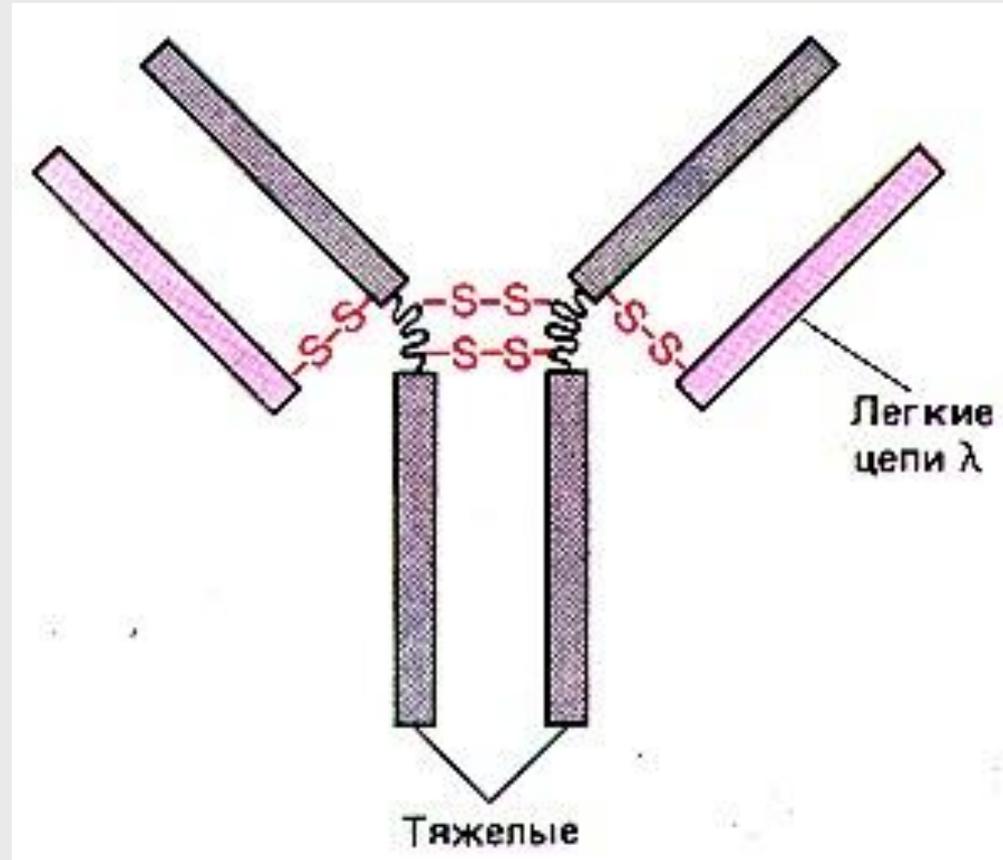


- IgA не проходит через плацентарный барьер, уровень его у новорожденных около 1% от концентрации у взрослых (а к 1 году - всего 20 % от уровня взрослых).
- Новорожденным в первые дни жизни секреторные IgA поступают с молозивом матери, защищая их дыхательный пути и желудочно-кишечный тракт до тех пор, пока не сформируются механизмы его синтеза в собственном организме.
- Возраст 3 мес. - у новорожденных определяется как критический период; этот период особенно важен для диагностики врожденной или транзиторной недостаточности местного иммунитета. Уровня, характерного для взрослого человека, достигает примерно к 5-летнему возрасту
- В отличие от IgG, IgA - неэффективный опсонин и слабый активатор комплемента, но активный нейтрализатор бактериальных токсинов
- Фагоциты несут на своей поверхности рецепторы к IgA (FcαRI, CD89). Взаимодействие IgA с этими рецепторами на эозинофилах ведет к их дегрануляции - важный элемент противогельминтной защиты!

Возраст	Уровень IgA, г/л
4,3 - 8,6 нед	0,02-0,5
8.6 нед - 5 мес	0,04-0,8
5 - 9 мес	0,08-0,8
9-12 мес	0,15-0,9
12-24 мес	0,15-1,1
24 мес - 3 года	0,18-1,5
3-5 лет	0,25-1,6
5-8 лет	0,35-2,0
8-12 лет	0,45-2,5
дети старше 12 лет и взрослые	0,4-3,5

Иммуноглобулин D

- IgD - мономер, трансмембранный рецептор В-лимфоцитов (маркер зрелых В-лф)
- Он обнаруживается в низких концентрациях в сыворотке.
- Истинное биологическое значение IgD в настоящее время изучено недостаточно.
- Полагают, что он участвует в антигензависимой дифференцировке В-лимфоцитов (его экспрессируют зрелые В-лимфоциты).



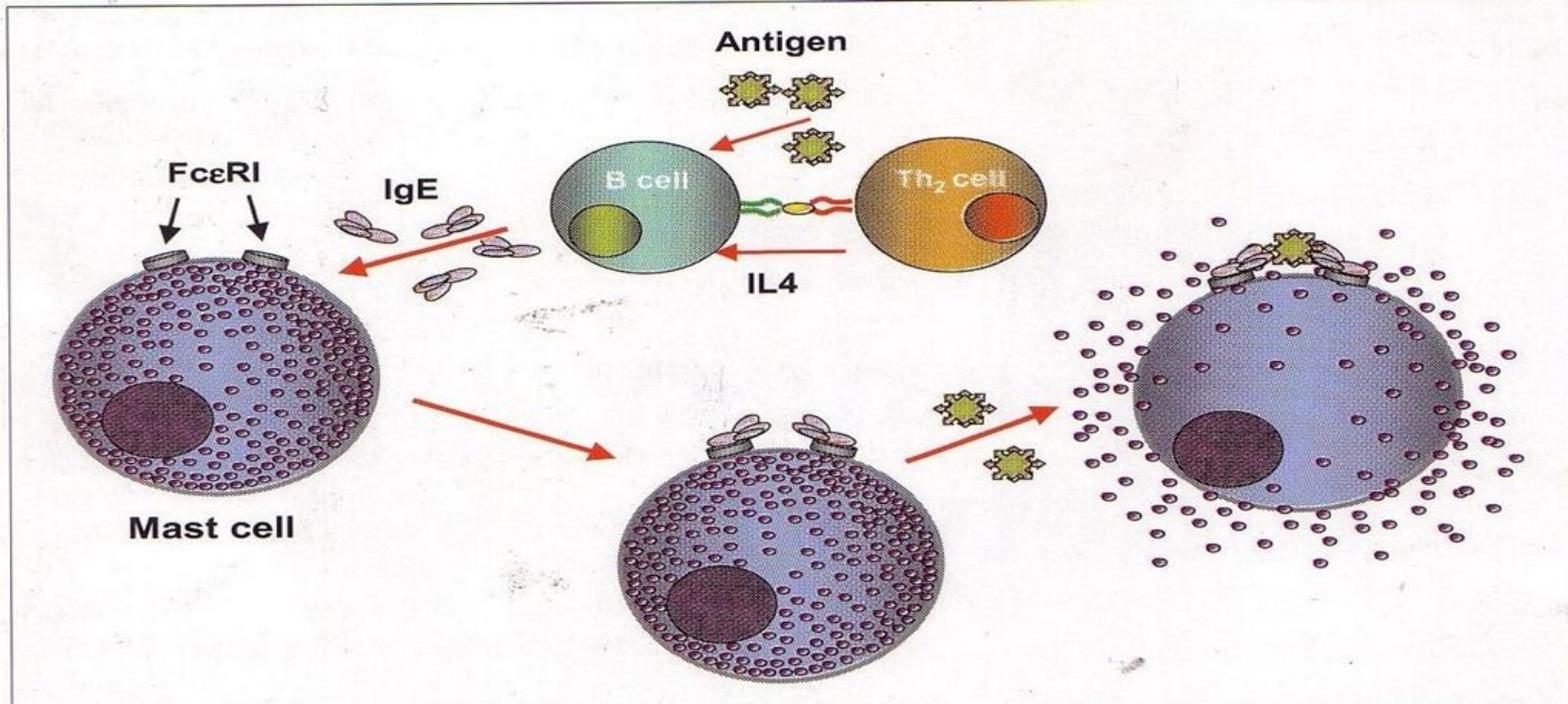
IgD - важная иммуномодуляторная молекула, способствующая иммунной защите, развитию воспаления, активации клеток врожденной иммунной системы и продукции ими факторов, активирующих иммунные реакции адаптивного иммунитета.

Функции IgD:

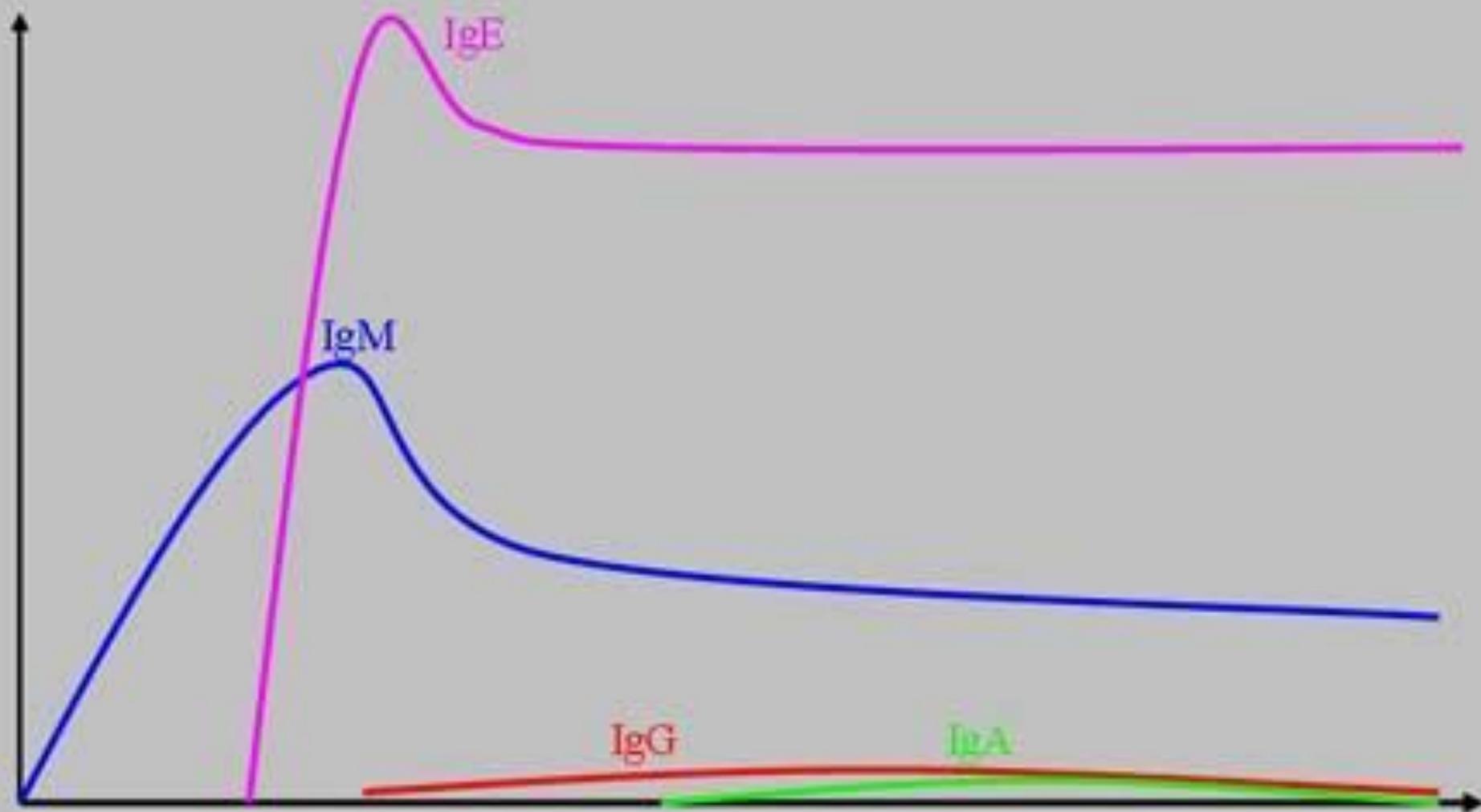
- усиление иммунной защиты, при инфекции (*Neisseria catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, стрептококки групп А, С, и G)
- стимуляция продукции базофилами и тучными клетками IL-1, IL-4
- стимуляция синтеза TNF α , IL-1 β , рецепторного антагониста IL-1 (IL-1RA), IL-6, IL-10 мононуклеарами
- Процесс переключения с IgM на IgD зависит от активации клетки и не зависит от T-лимфоцита;
- Переключение B-клеток с с IgM на IgD у человека происходит в слизистой оболочке ВДП и пищеварительного тракта (защита от патогенных микроорганизмов);

Иммуноглобулин E

- IgE – реагены, в небольших количествах присутствует в плазме крови и тканях.
- классические кожно-тропные антитела, играющие важную роль в реакциях анафилактической гиперчувствительности I типа
- Fc-фрагмент цепи этой молекулы очень прочно связывается с Fcε-I рецепторами тучных клеток (мастоцитов) и базофилов.
- Когда Fab-фрагмент этих, связанных с клеткой IgE специфически связывается с соответствующим антигеном (аллергеном), происходит дегрануляция тучных клеток и высвобождение медиаторов анафилаксии.



Синтез антител при аллергии



Изотоп	Молекулярная масса	Тяжелая цепь	Активация комплемента		Присоединение к клеткам через Fc-фрагмент	Другие биологические свойства
			классический путь	альтернативный путь		
IgG	150000	g_1, g_2, g_3, g_4	IgG1, IgG2, IgG3 — да; IgG4 — нет	IgG1, IgG2, IgG3 — да; IgG4 — нет	Макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, NK	Переход через плаценту
IgM	190000 (950000)	m	Да	Нет	Лимфоциты	Первичный иммунный ответ, ревматоидный фактор
IgA	160000 (385 000) ²	a_1, a_2	Нет	Да	Лимфоциты	Антитела в секретах слизистых оболочек
IgD	175000	d	Нет	Да	Не имеется	Первичная поверхностная молекула В-лимфоцитов
IgE	190000	e	Нет	Да	Тучные клетки, базофилы	Опосредует анафилаксию, аллергию

Концентрация иммуноглобулинов в сыворотке крови (г\л)

<i>Возраст</i>	<i>IgA</i>	<i>IgM</i>	<i>IgG</i>
<i>7-12 месяцев</i>	0,19-0,55	0,31-0,77	4,42-8,80
<i>1-2 года</i>	0,26-0,74	0,35-0,81	4,42-8,80
<i>2-3 года</i>	0,34-1,08	0,42-0,80	7,09-11,60
<i>3-5 лет</i>	0,66-1,20	0,38-0,74	7,00-11,60
<i>6-8 лет</i>	0,79-1,69	0,40-0,90	6,67-11,80
<i>Взрослые</i>	1,39-2,61	0,72-1,26	8,53-14,60

100%-ная концентрация

**(по отношению к концентрации иммуноглобулинов взрослых)
отмечается: IgM к 1 году; IgA – к 6-7 годам; IgG – к 9-10 годам.**

Антигенспецифическая функция антител

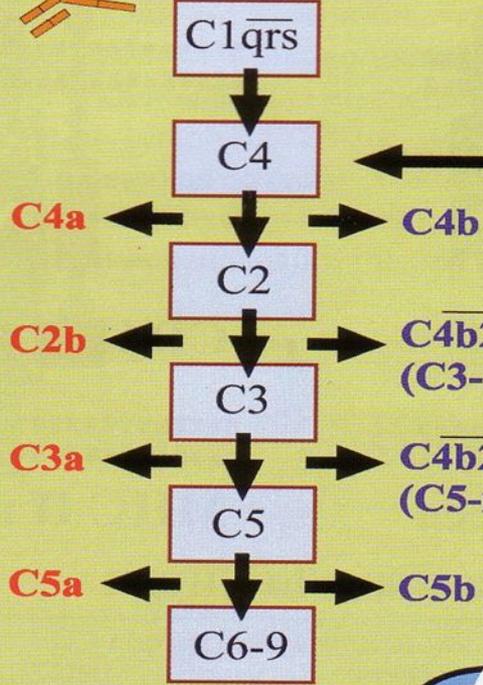
- Нейтрализация патогенов при связывании с их АГ-дереминантами
- Опсонизация бактерий и клеток-мишеней для облегчения фагоцитоза и цитотоксических реакций

Опосредуются Fc-фрагментами АТ, взаимодействующими с Fc-рецепторами клеток врожденного иммунитета или с системой комплемента

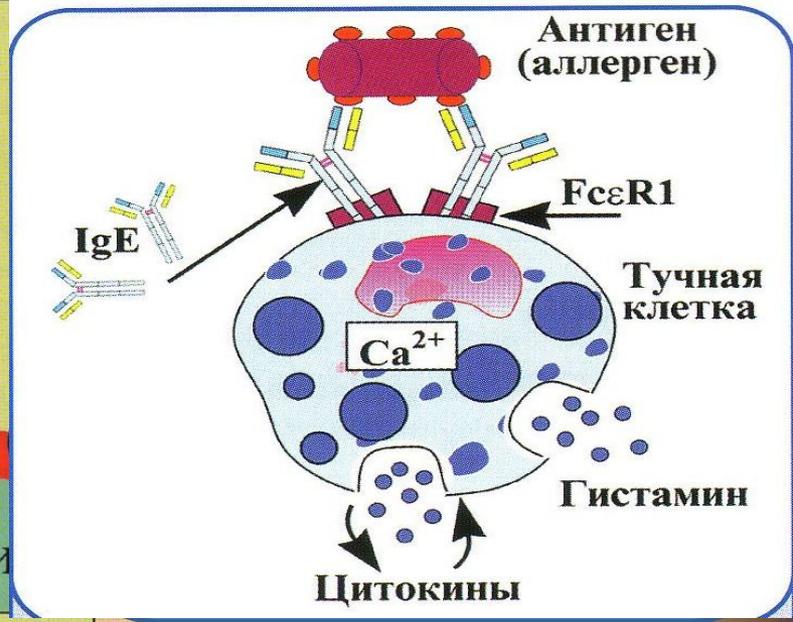
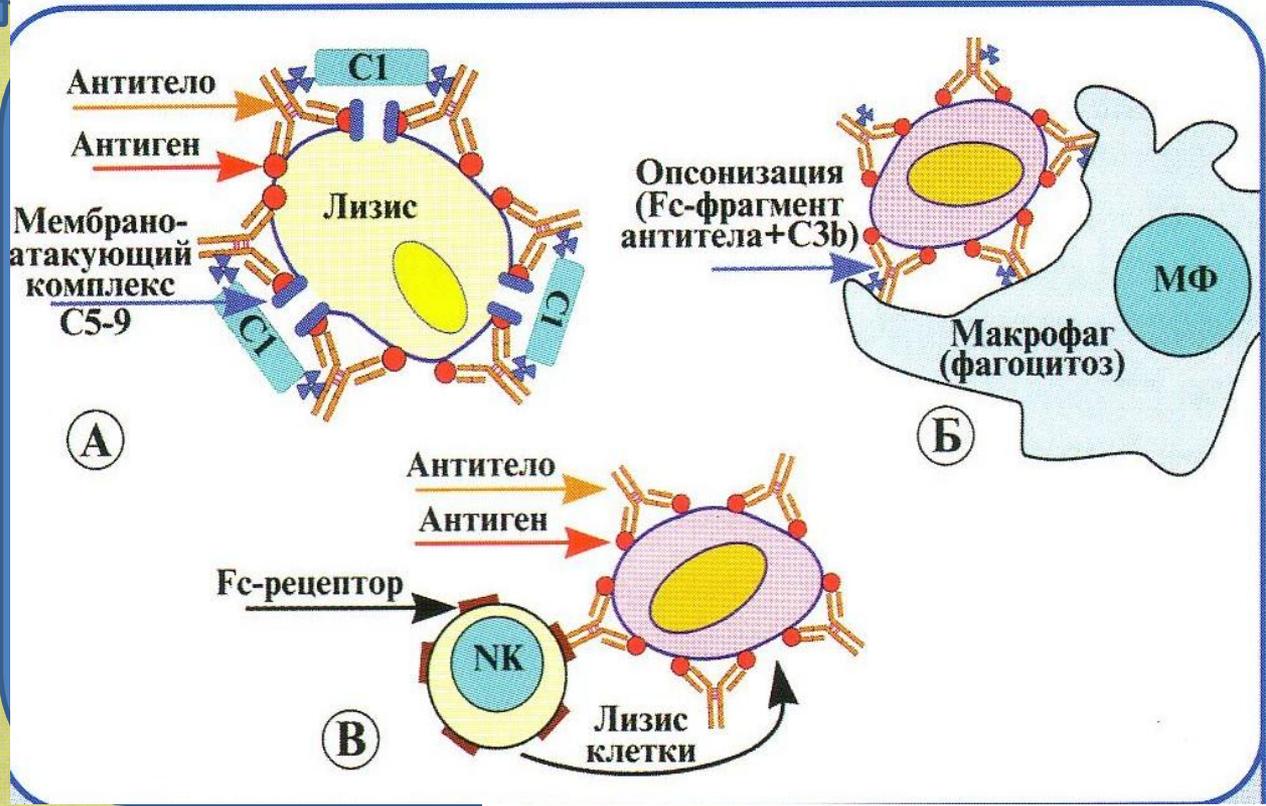
Эффекторные функции антител:

- **Активация комплемента по классическому пути и комплемент-зависимый лизис клеток-мишеней:**
- IgM, IgG3, IgG1 – с C3b, C4b на эритроцитах, доставка иммунных комплексов в печень и селезенку, их фагоцитоз и разрушение;
- Связывание комплекса «АГ-АТ» фагоцитами через Fc-рецепторы с последующей активацией фагоцитоза и разрушением комплекса
- **Антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ)**
- НК, эоз, НГ и др. через Fcγ-рецепторы III типа (CD16) запускают перфорин-гранзимовый механизм апоптоза и лизиса клеток-мишеней
- **Активация клеток через Fc-рецепторы** (активация и дегрануляция тучных клеток, базофилов, эозинофилов с помощью IgE,)
- **Расщепление АГ** (ферментативная активность пептидаз и ДНК-аз, редко)

Классический путь



Мембрано-атакующий комплекс



Моноклональные антитела и их использование в медицине



В 1975 году Георгом Кёлером и Цезарем Мильштейном разработана методика получения клеточных гибридов - гибридом. Гибридомы (гибридные опухолевые клетки) образуются в результате слияния лимфоцитов, взятых от иммунизированных животных, с клетками миеломы костного мозга, культивируемыми *in vitro*.

В системе *in vitro* слияние соматических клеток может быть индуцировано вирусами (вирус Сендай), электрическим воздействием (электрослиянием) или химическим веществом - полиэтиленгликолем (ПЭГ).
Авторы использовали для слияния ПЭГ.

Схема получения моноклональных антител



Области применения моноклональных антител

- идентификация субпопуляций лимфоцитов человека
- выделение клеток
- установление функций молекул клеточной поверхности
- определение группы крови
- диагностика опухолей и локализация опухолей
- иммунорадиометрический анализ
- анализ сложных смесей антигенов
- анализ эмбрионального развития
- анализ иммунного ответа
- искусственные ферменты.

Идентификация субпопуляций лимфоцитов человека

Для клеток в определенной стадии развития или функционирования характерно наличие на поверхности определенных молекул. На определении этих CD антигенов основана идентификация субпопуляций лимфоцитов человека.

Диагностика опухолей и локализация опухолей

Можно обнаружить антигены, характерные для опухолей определенных тканей, получить к ним антитела и использовать их для диагностики и типирования опухолей.

С помощью моноклональных антител в опухоль и ее метастазы можно доставить радиоактивные вещества, позволяющие обнаружить небольшие узелки опухоли по локализации в них радиоактивности если их связать с изотопом.

Применение моноклональных антител в диагностике (рекции АГ-АТ)

Реакция агглютинации



- Моноклональные антитела (целиклоны анти-А и анти-В) - применяют для определения агглютиногенов эритроцитов.
- Они обладают высокой чувствительностью, характеризуются быстротой наступления и четкостью агглютинации.
- Обеспечивают достоверный результат даже при слабой экспрессии антигенов.
- Методика определения группы крови с помощью целиклонов позволяет отказаться от услуг доноров, кровь которых используют для приготовления изогемагглютинирующих сывороток.
- Циклоны применяются для типирования эритроцитов всех специфичностей, включая редкие.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

- ИФА - лабораторный иммунологический метод качественного определения и количественного измерения антигенов и антител.
- В основе ИФА лежит принцип специфического взаимодействия между антигеном и соответствующим ему мон-АТ.
- Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием конъюгата (анти-АТ + ферментная метка - пероксидаза хрена).
- Конъюгат может быть получен с использованием мон-АТ, направленных против человеческих иммуноглобулинов определённого класса (М, G, А).
- В зависимости от того, какие антитела использованы, тест-система будет выявлять в исследуемом образце или специфические АТ независимо от их класса, или антитела лишь определённого класса (например, только иммуноглобулин G или только иммуноглобулин М).

Применение моноклональных антител в диагностике (рекции АГ-АТ)

Иммунофлюоресцентный анализ (ИФЛА)

- ИФЛА - лабораторный иммунологический метод качественного определения и количественного измерения антигенов и антител.
- В основе ИФЛА лежит принцип специфического взаимодействия между антигеном и соответствующим ему мон-АТ.
- Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием конъюгата (анти-АТ + флюоресцентная метка - ФИТЦ).
- Конъюгат может быть получен с использованием мон-АТ, направленных против поверхностных маркеров лимфоцитов и других клеток крови и тканей.
- Используют непрямой метод ИФЛА (в крови) и прямой (в тканях)

Метод проточной цитометрии

- предназначен для быстрого оптического измерения параметров клетки, ее органелл и происходящих в ней процессов.
- Регистрируют свет лазерного луча при прохождении через него клетки в струе жидкости
- степень световой дисперсии позволяет получить представление о размерах и структуре
- клетки.
- Клеточную суспензию метят флюоресцирующими мон-АТ или флуоресцентными красителями и подают в поток жидкости, проходящий через проточную ячейку.
- Фиксирующие флуоресценцию детекторы позволяют определить размеры клеток, судить о соотношении ядро/цитоплазма, а так же о неоднородности и гранулярности клеток, определить субпопуляционный состав клеточной суспензии и др.
- Наиболее часто используемые флуорохромы - Флуоресцеина изотиоцианат (FITC), Фикоэритрин (PE, RD1).

Метод проточной цитометрии

- предназначен для быстрого оптического измерения параметров клетки, ее органелл и происходящих в ней процессов.
- Регистрируют свет лазерного луча при прохождении через него клетки в струе жидкости
- степень световой дисперсии позволяет получить представление о размерах и структуре
- клетки.
- Клеточную суспензию метят флюоресцирующими мон-АТ или флуоресцентными красителями и подают в поток жидкости, проходящий через проточную ячейку.
- Фиксирующие флуоресценцию детекторы позволяют определить размеры клеток, судить о соотношении ядро/цитоплазма, а так же о неоднородности и гранулярности клеток, определить субпопуляционный состав клеточной суспензии и др.
- Наиболее часто используемые флуорохромы - Флуоресцеина изотиоцианат (FITC), Фикоэритрин (PE, RD1).

Терапевтические моноклональные антитела

- Ученые сумели принудить клетки грызунов к выработке антител с человеческими Fc-фрагментами (химерные АТ)
- Константная часть мышиных антител замещена соответствующей константной областью иммуноглобулина человека и в своей структуре имеют более 65% человеческого иммуноглобулина.
- Гуманизированные моноклональные антитела - до 95% состоят из человеческого иммуноглобулина.
- Трансгенные технологии (фраговый дисплей) были использованы для создания полностью человеческих моноклональных антител

Моноклональные антитела, в отличие от традиционных препаратов, высокоспецифичны к определенным мишеням - антигенам.

Поэтому, использование моноклональных антител в качестве терапевтических агентов стало для медицины стратегическим этапом в смене концепции лечения - от неспецифической к специфической (таргетной) терапии.

МКАТ - НОВАЯ ЭРА В ТЕРАПИИ

ПОКАЗАНИЯ:

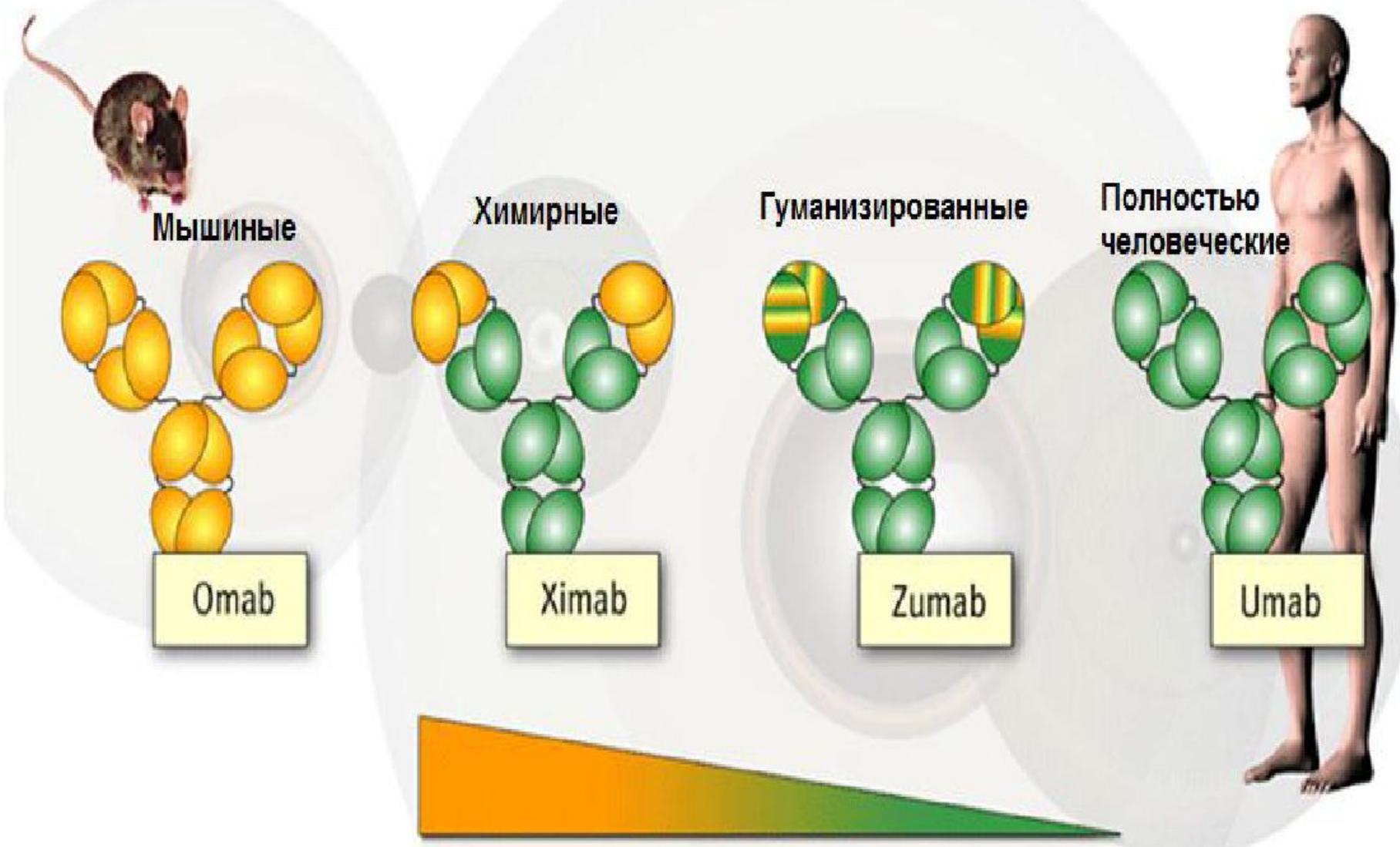
- **Онкологические заболевания**
- **Аутоиммунные заболевания и атопии**
- **Отторжение трансплантата**
- **Инфекции**
- **Воспаление различного генеза (анти-TNF α , анти-CXCL10, анти-PDGF-D, анти-C'5)**
- **Системный склероз (анти-TGF β 1), идиопатический фиброз легких (анти-TGF β), пневмосклероз (анти-CTGF)**
- **Сердечно-сосудистая патология (анти-gr IIb/IIIa)**
- **Остеопороз (анти-RANKL)**
- **Гиперпаратиреозидизм (анти-PtH)**
- **Мышечная дистрофия (анти-GDF-8)**
- **Болезнь Альцгеймера (AZD3102)**

Химерные антитела
получили
окончание
«-ximab»

Гуманизированные
антитела имеют
окончание
«-zumab»

Препараты на
основе мОН-АТ
- оканчиваются на
«-mab» (от monoclonal
antibody).

Полностью
человеческие
антитела имеют
окончание
- «-umab».



Мышинные

Химирные

Гуманизированные

Полностью человеческие

Omab

Ximab

Zumab

Umab

Уменьшение иммуногенности



Спасибо за внимание!