

# **Логика иммунной защиты**

12-14 лекций

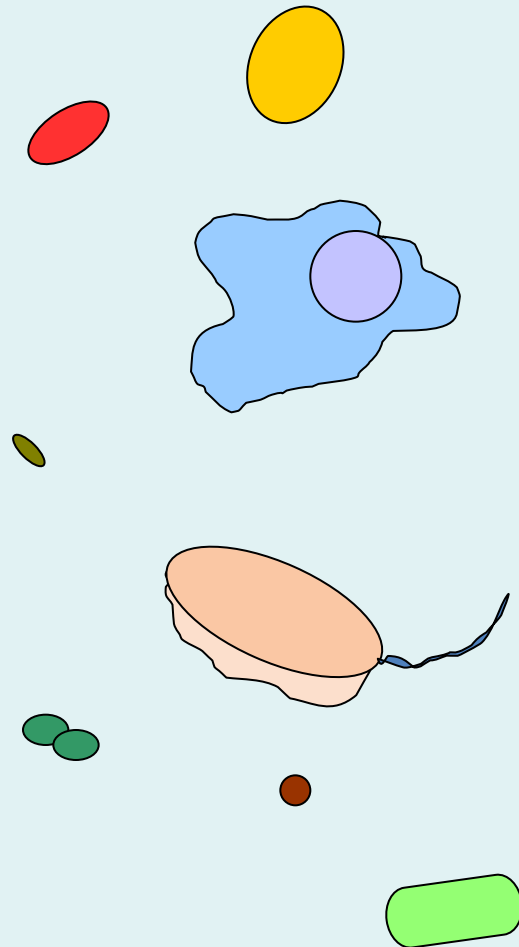
## Лекция 1 – Общие идеи защиты многоклеточного существа

Какую защиту мы собираемся изучать...

Кого будем защищать и от чего?

# **Защита многоклеточного существа в мире микробов, простейших и вирусов**

**Многоклеточное существо  
в агрессивном мире других существ**



**Иммунитет защищает наш организм от инфекций и других внешних вторжений, а также от существенных внутренних изменений:**

- Удаляет вторгшиеся чужие клетки (например, инфекции) и чужие молекулы (например, токсины)
- Выявляет и убирает измененные собственные клетки и макромолекулы.

**Уточним, какую защиту мы не будем изучать:**

- От жары и стужи
- От голода и жажды
- От острых зубов
- От обидного слова
- От сглазу
- От колдовства и нечистой силы
- От двойки на экзамене
- От несчастной любви....

## **Какие свойства нашего организма определяют нашу защищенность от инфекции?**

- Рост
- Вес
- Сила мышц
- Жесткость костей
- Толщина кожи
- Выраженность волосяного покрова
- Потливость
- Резвость ног
- Острота ума
- Память
- Цвет кожи
- Красота

Нас защищает **иммунитет** – многокомпонентная система защиты от инфекций, чужеродных веществ и собственных поврежденных (измененных) структур.

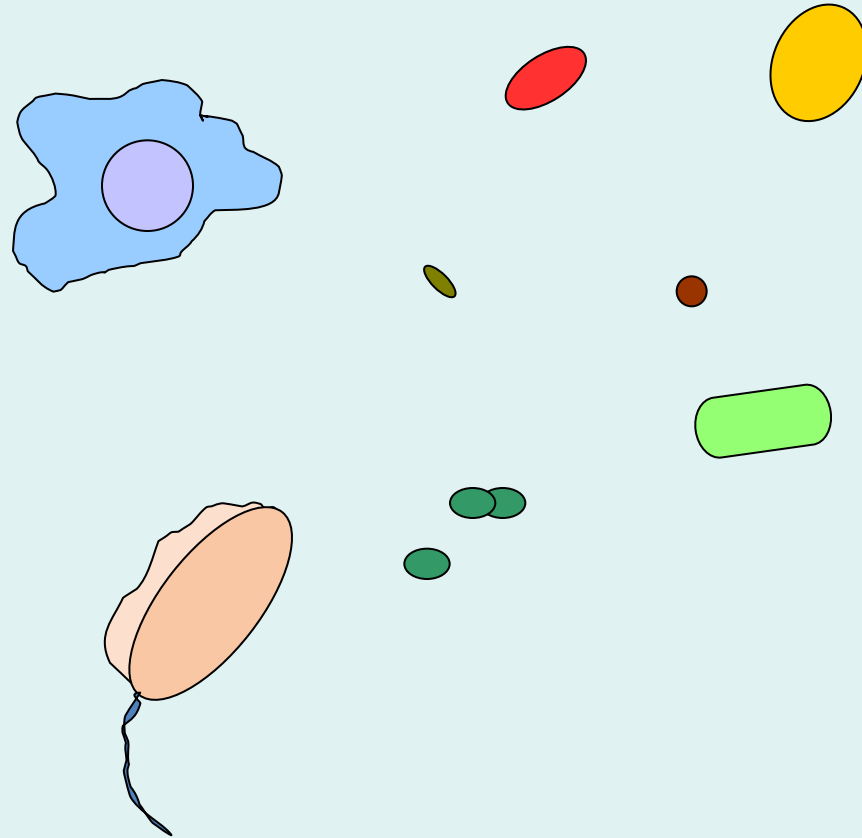
В 12-14 лекциях рассмотрим, как иммунная защита организована и функционирует. Постараемся, не утопая в деталях, обращать внимание на общие принципы и логику защитных систем.

Виртуально вторгнемся вместе с инфекцией в организм многоклеточного (в наш организм), где мы познакомимся с защитой во многих ее проявлениях.



# Конкурс на лучшие идеи

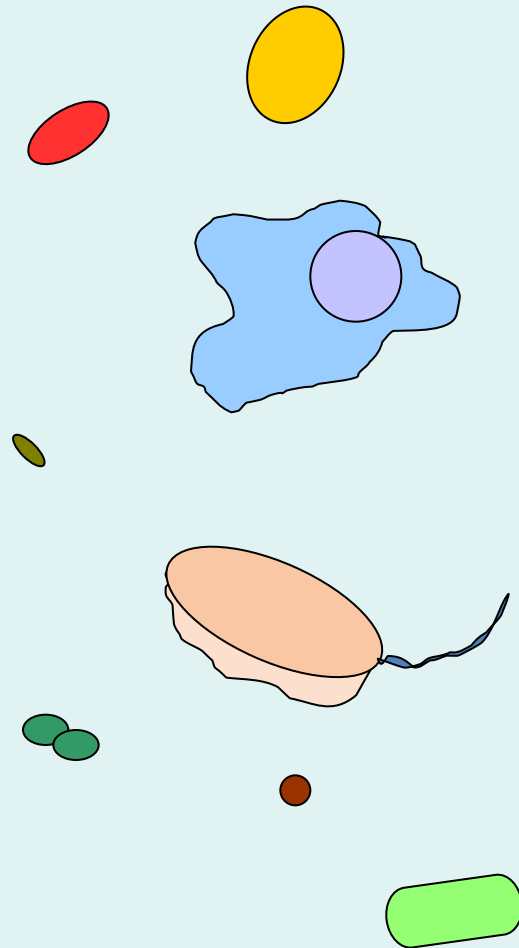
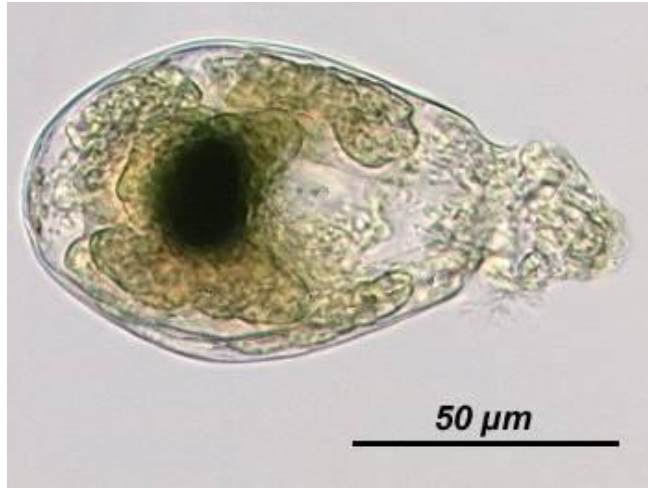
**Как защитить одноклеточное существо?**



## Как защитить многоклеточное существо?

Коловратка (Rotifera)

Самое мелкое многоклеточное -  
*Ascomorpha minima* 40 мкм



## Принципы защиты нашего организма

Не позволять другим существам вторгаться в пределы нашего организма  
**(Не впускать)**

Если вторглись, **убить**, останки **ликвидировать**, а повреждения **восстановить**

Защищаются **все клетки** организма

Защищают и **внеклеточные жидкости** организма

Кроме того, имеются **специализированные «защитники»** - **клетки и вещества**, специально предназначенные для защиты

## Способы защиты многоклеточного существа:

- Защитить границы
- Пожирать чужаков
- Убивать чужаков
- Сделать жидкую фазу (между клеток) ядовитой
- Свои клетки защитить от пожирания, убийства и ядов

- Узнавать чужаков
- Сообщать другим клеткам о вторжении (danger)
- Звать на помощь (SOS)
- Различать своих и чужих

- Помнить о вторжении, чтобы лучше защищаться
- Сделать особые средства защиты против вторгавшихся чужаков

## **Защита границ**

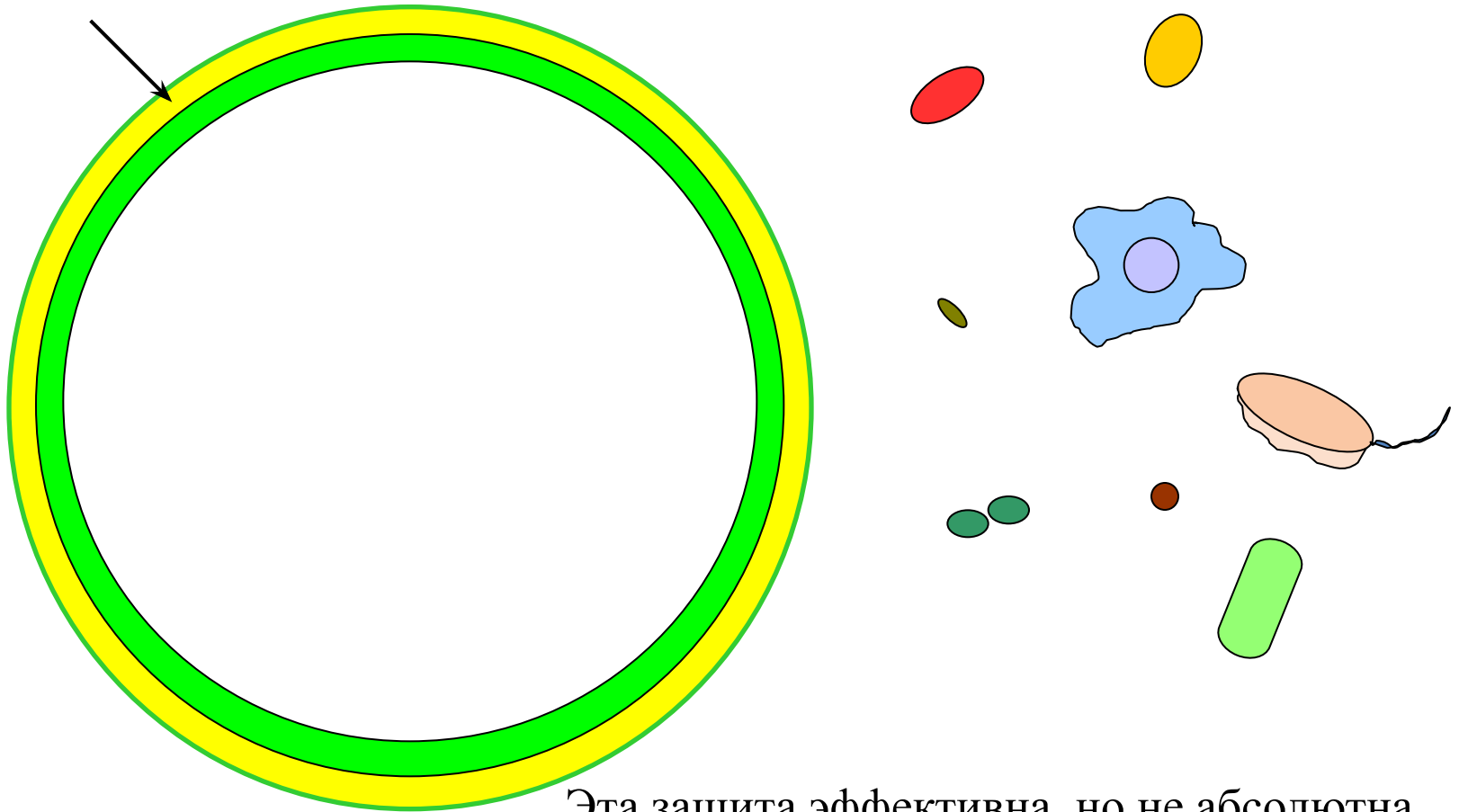
Часто иммунитет сравнивают с армией,  
а границы нашего тела – с крепостью

Какая она, наша граница с внешним миром, как устроена, как нас защищает?



# Многоклеточное защищено от вторжения других существ (вирусов, микробов, простейших, других многоклеточных)

Граница с внешним миром



Эта защита эффективна, но не абсолютна.  
Есть много случаев продолжительного  
сосуществования (паразитизм, симбиоз).

Почему нельзя полностью оградиться  
от опасностей внешнего мира

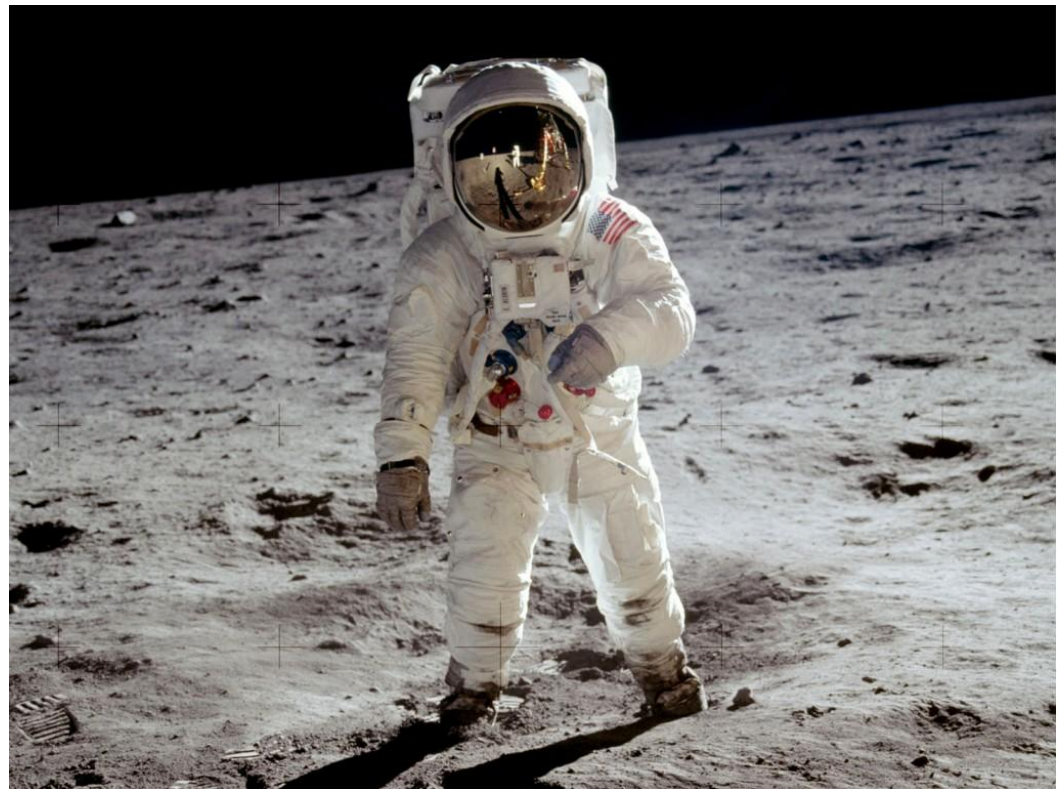




Закрытая от внешнего мира система должна быть полностью автономной. Это обеспечить трудно (или невозможно).

Находясь в непроницаемой батисфере или скафандре, очень трудно и, может быть, невозможно обеспечивать физиологические потребности в пище, воде, воздухе, необходимость роста, полового размножения и др.

Не знаю примера живого существа, отделенного от внешней среды границей, не проницаемой ни для кого и ни для чего.



Яйцо – пример, очень близкий к биологическому батискафу.

Многоклеточное существо живет, дышит и питается, растет и изменяется, и при этом надежно защищено от вирусов, микробов, простейших...

Однако, автономность яйца недостаточная – воздух, тепло и защита от не микроскопических (крупных по размеру) многоклеточных должны быть предоставлены извне. И уж совсем плохо с продолжением жизни. Производство потомства (размножение) невозможно.



Природа создала для нас гораздо более совершенную оболочку, чем батисфера, космический аппарат или скафандр. Крепость вообще не выдерживает никакого сравнения.

Какая она, эта совершенная оболочка? Каковы границы нашего тела с внешним миром?

Именно здесь, на границе, дело иммунитета начинается и заканчивается в 999999 из 1000000 случаев попыток вторжения извне.

Наша граница — это первая линия нашего иммунитета. Она имеет целый ряд уникальных свойств, что позволяет нам успешно жить в этом мире.

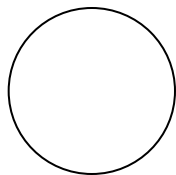
Границы нашего тела с внешним миром **очень велики.**

Они в сотни раз превышают линейные размеры тела.

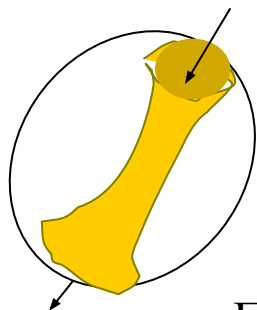
Границы **разные** в разных частях тела, их устройство зависит от задач, которые они выполняют, наряду с защитой — газообмен, питание, выделение и др.

# Внешние и внутренние границы тела

Обмен – через  
поверхностный  
слой клеток

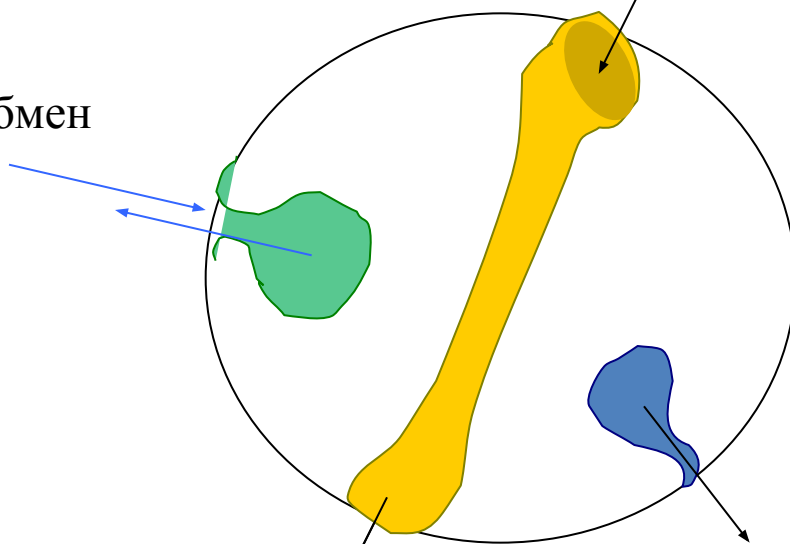


Обмен газов – через  
поверхность,  
а жидких и твердых  
веществ – через  
пищеварительный  
мешок или трубку

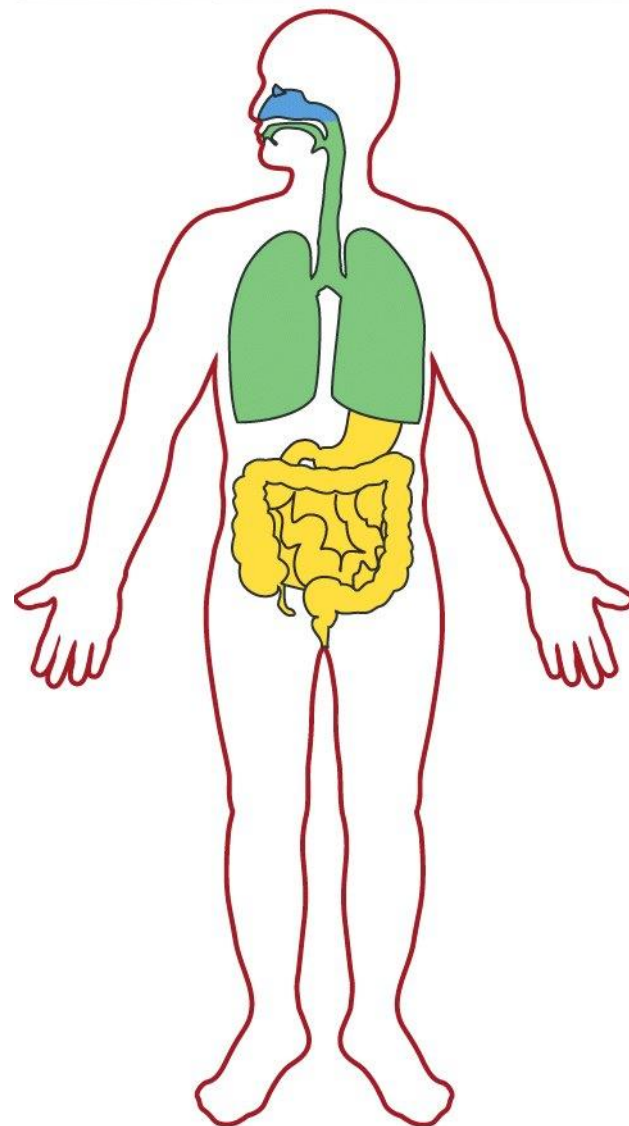


Питание

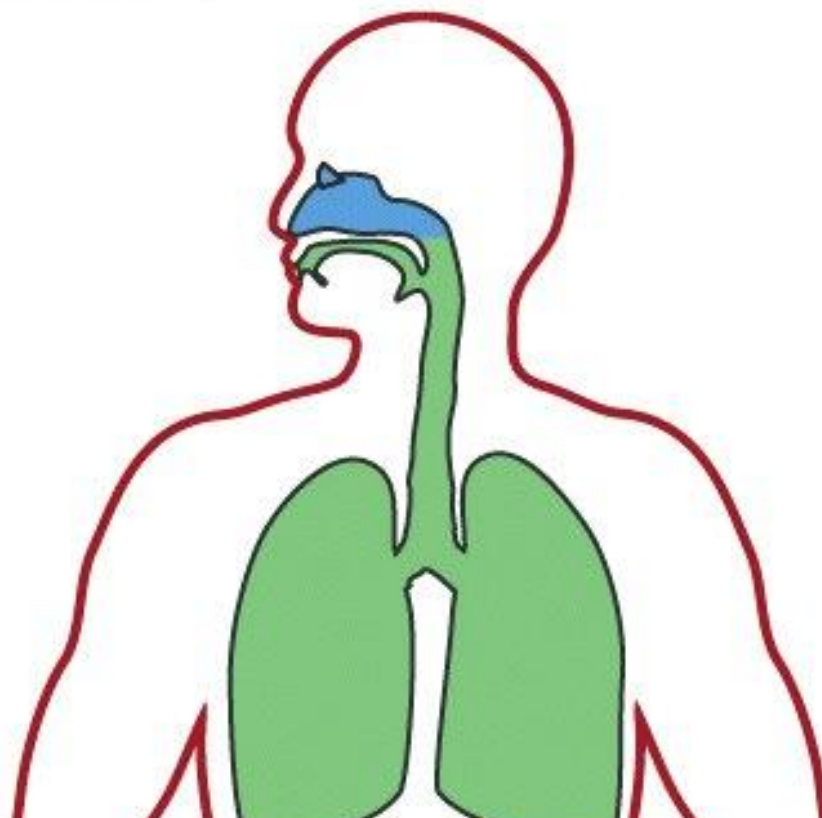
Газообмен



Выделение шлаков

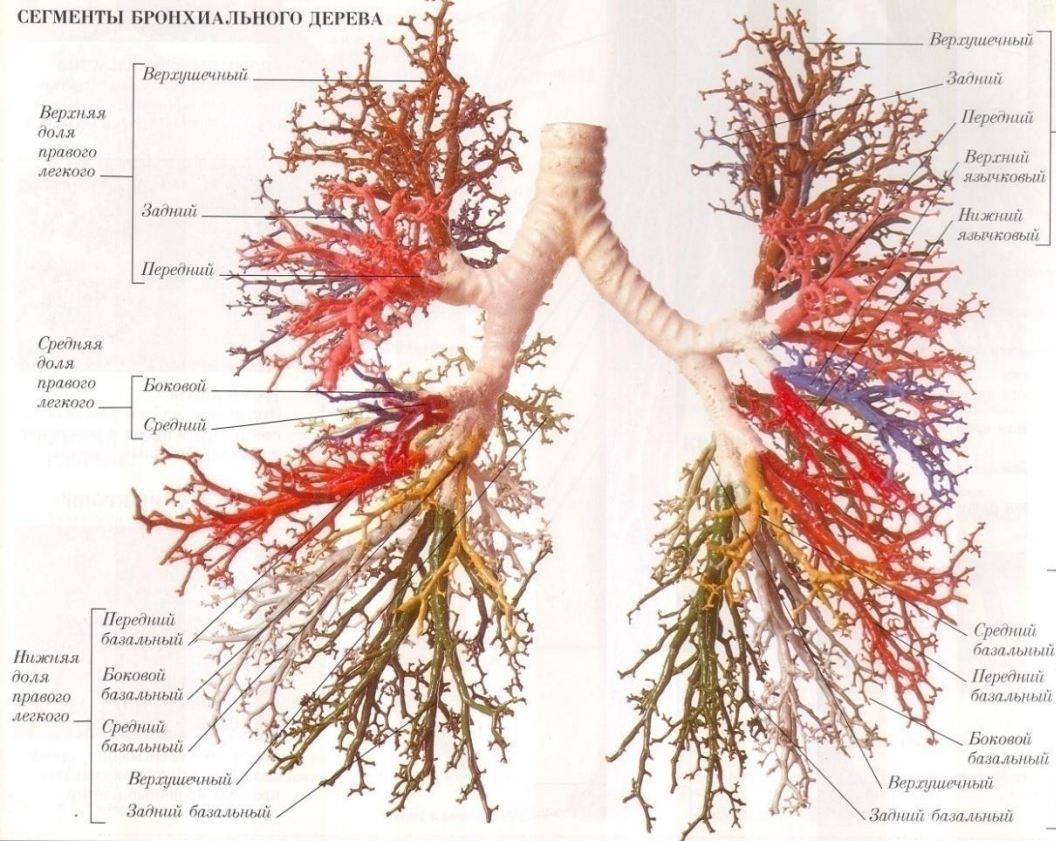


Дыхательная граница ~ 120-140 кв. м.



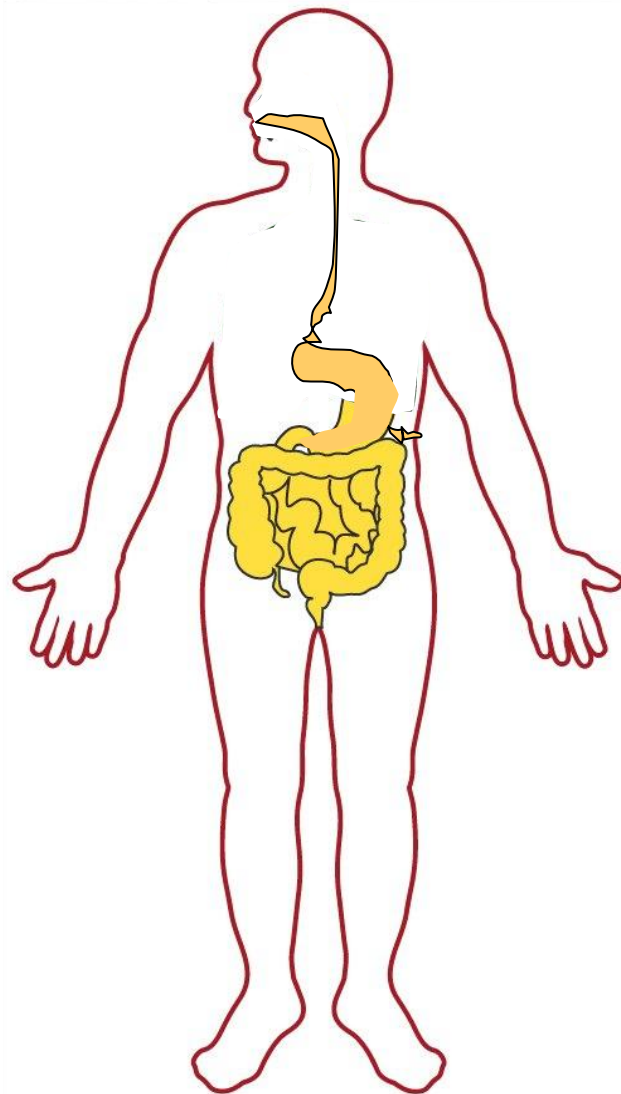
700 000 000 пузырьков (альвеол) диаметром 300 мкм

клубочным мехам.



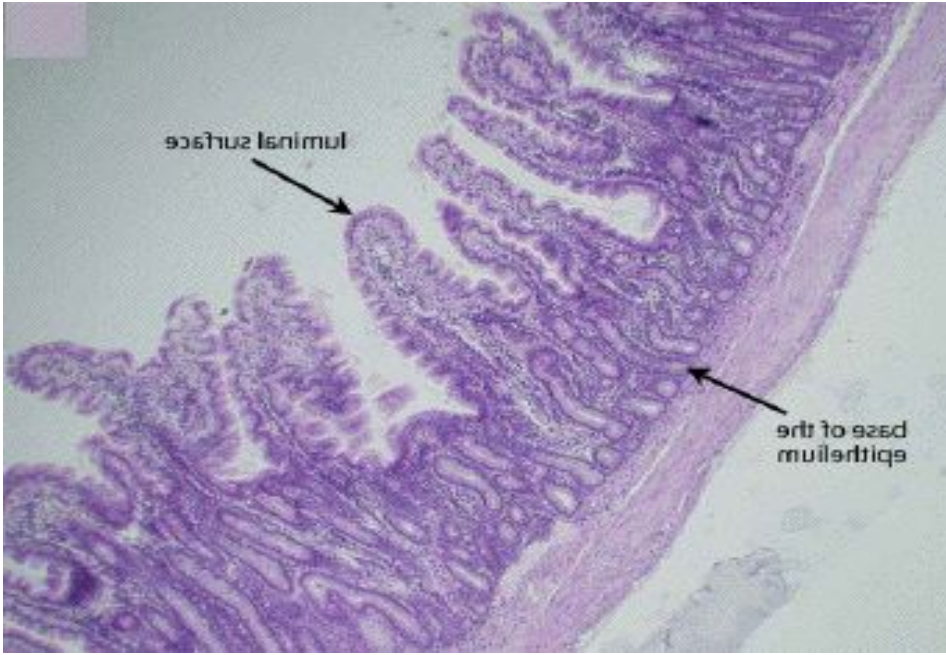
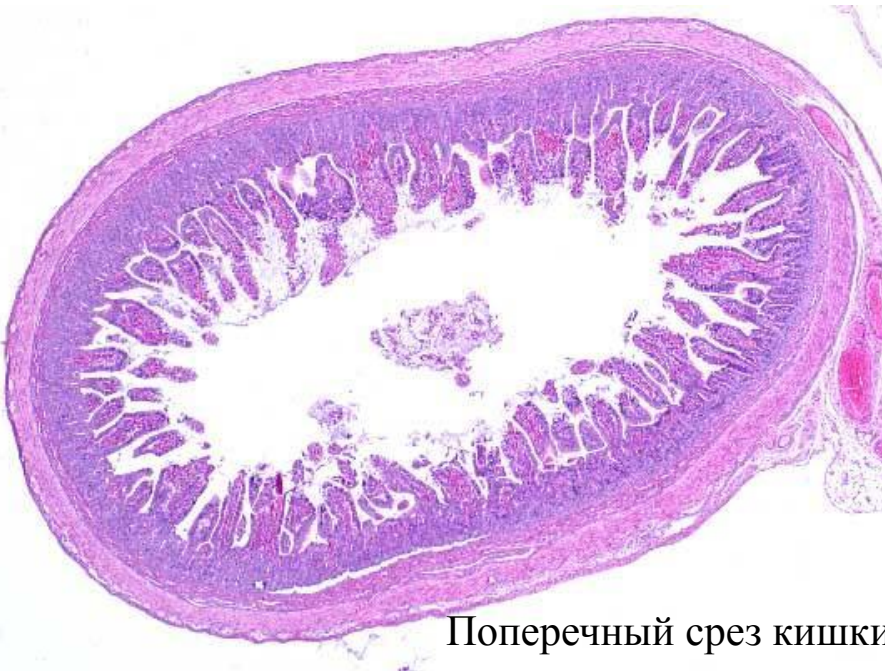
$$S_{\text{сферы}} = \pi D^2$$

Граница желудочно-кишечного тракта 250-400 кв. м.  
Это самая большая наша граница с внешним миром.  
К тому же, она густо заселена микроорганизмами.

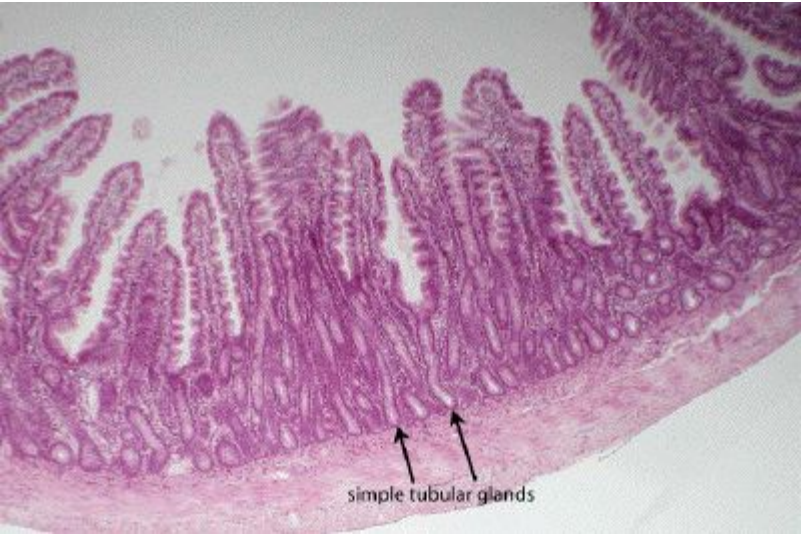




Складки и ворсинки увеличивают поверхность кишечника, на которой происходит всасывание питательных веществ



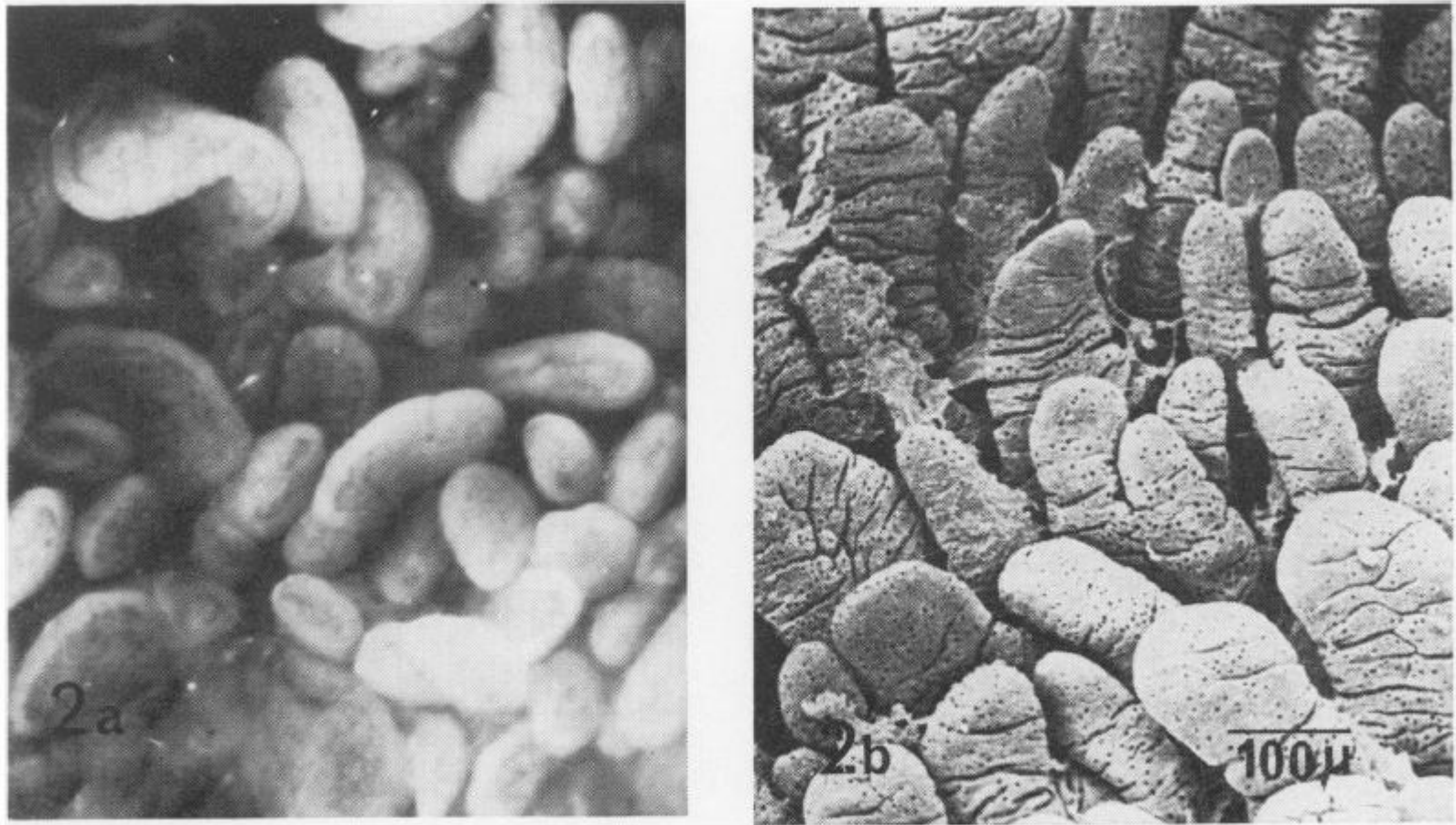
Ворсинки ~ 100 мкм диаметром



# Многочисленные ворсинки (100 мкм) видны в просвете кишки

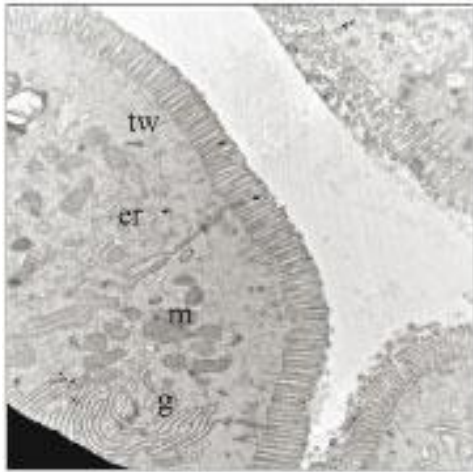
942

*M. N. Marsh and J. A. Swift*

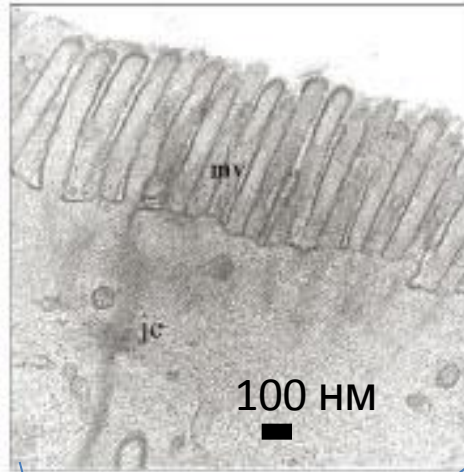


**FIGS. 2a and 2b.** Comparison between the appearance of villi seen (a) in the dissecting microscope ( $\times 50$ ) and (b) in the scanning electron microscope ( $\times 50$ ). Note contrast and clarity of detail in (b).

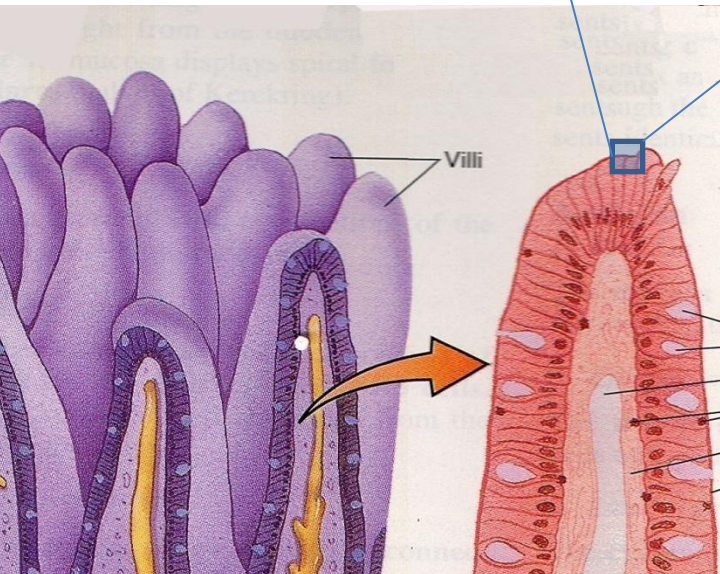
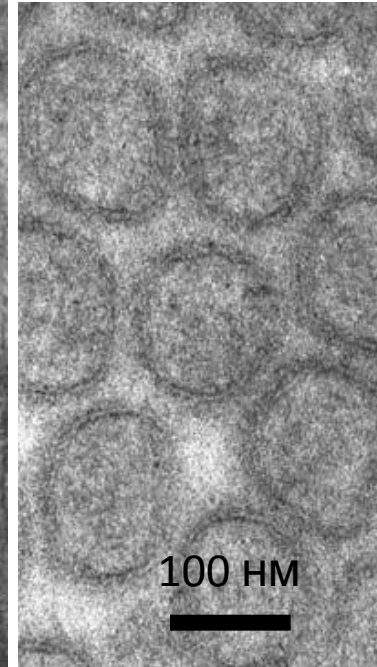
На верхушечной (апикальной) поверхности клеток эпителия кишечника имеется 2000-3000 выпячиваний – нановорсинок диаметром около 100 нанометров



A. TEM - OIVP24, X 7.000



B. TEM - OIVP24, X 30.000

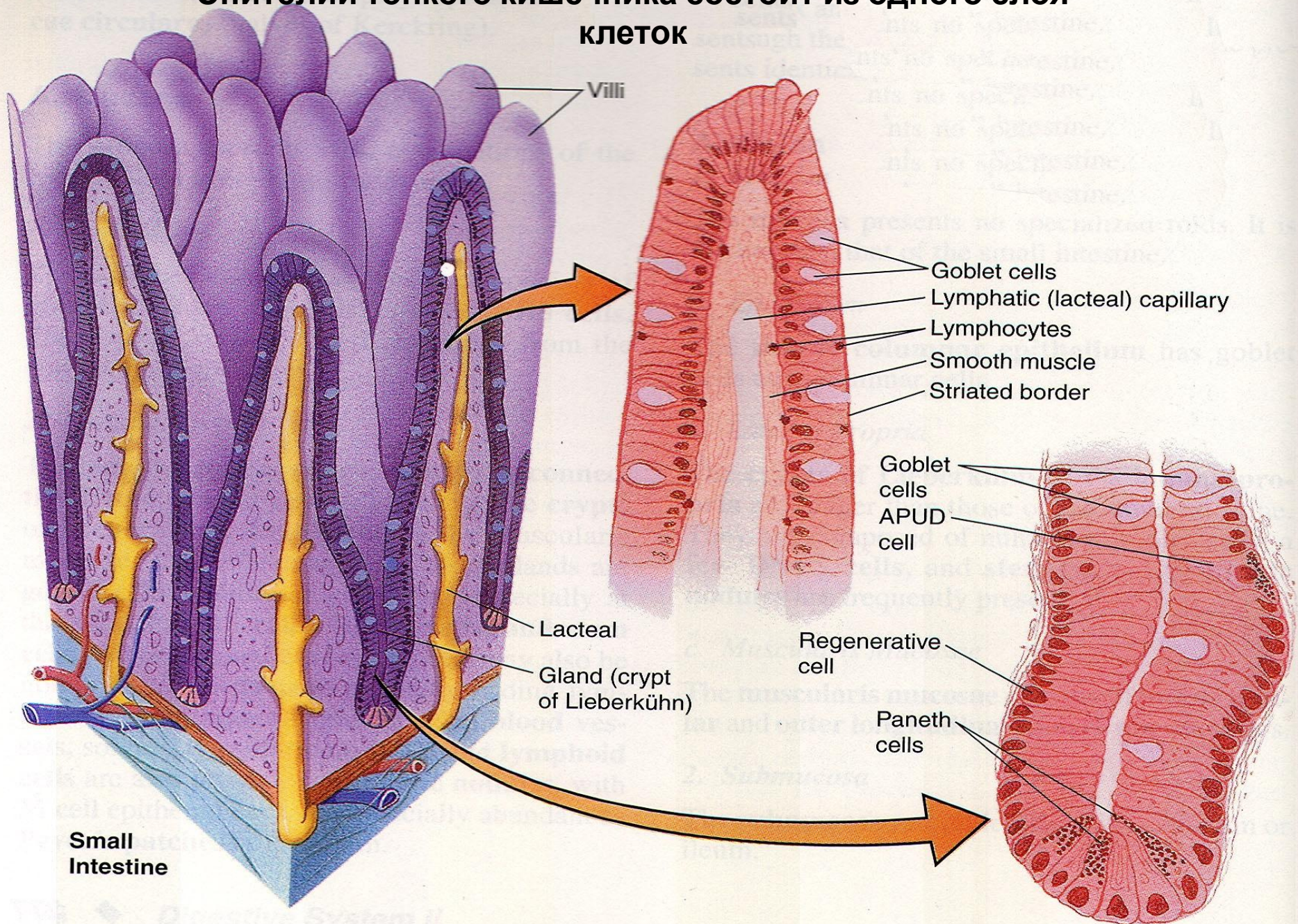


Brush border of an absorptive cell in the intestinal lining is seen in side view, left, and from above, right. The finger-like projections increase the cells absorptive area; space may facilitate food absorption.

[http://www.naturalhistorymag.com/htmlsite/master.html?http://www.naturalhistorymag.com/htmlsite/editors\\_pick/1958\\_12\\_pick.html](http://www.naturalhistorymag.com/htmlsite/master.html?http://www.naturalhistorymag.com/htmlsite/editors_pick/1958_12_pick.html)

**Границы очень тонкие (даже прозрачные для света)**

# Эпителий тонкого кишечника состоит из одного слоя клеток



**Ворсинки кишечника  
покрыты однослойным  
эпителием, который  
состоит из эпителиальных  
клеток, бокаловидных  
клеток и клеток Панета**

**ILEUM  
villus**

L - lumen

V – villus

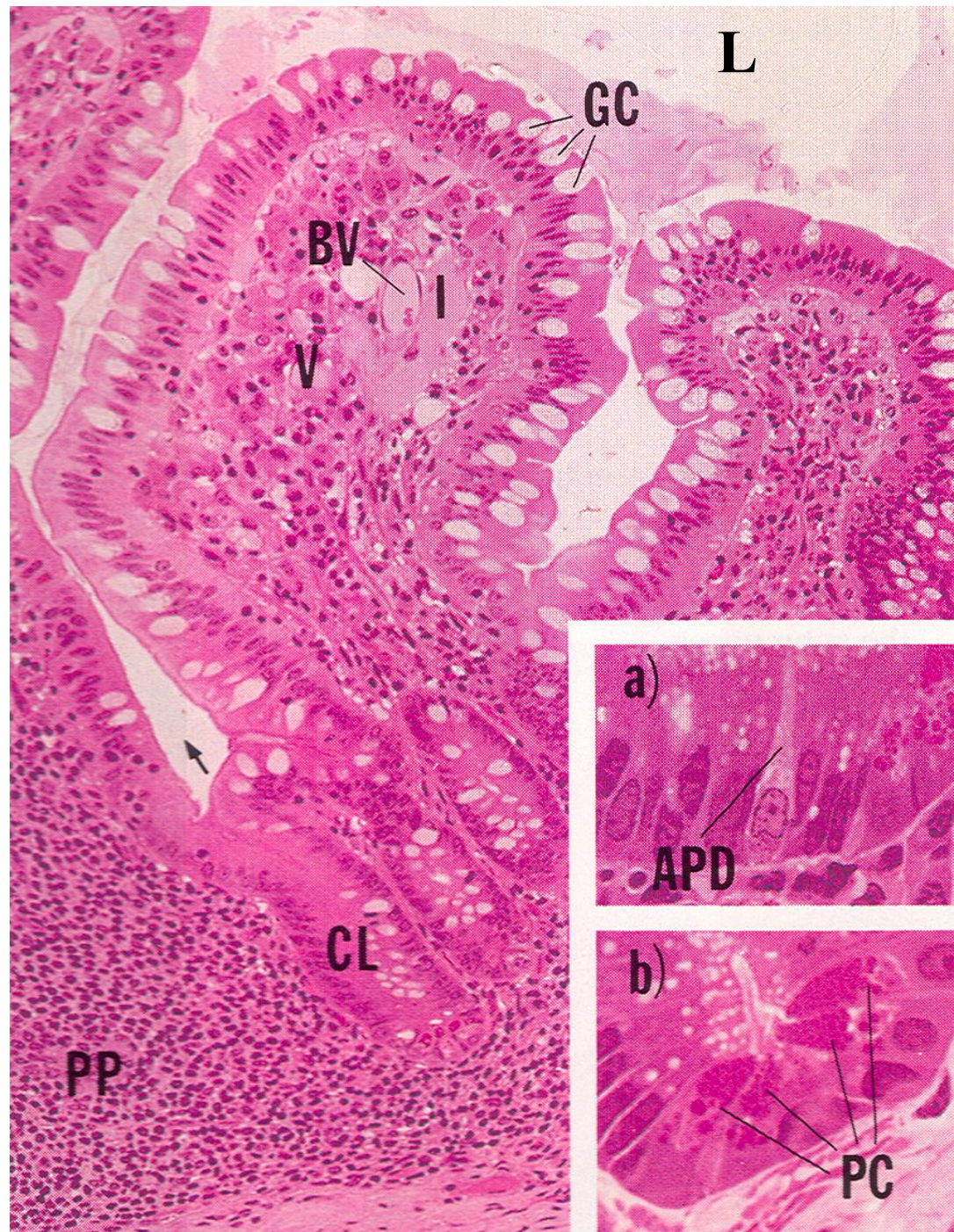
CL – crypt of Lieberkuhn

GC - goblet cell

PC – Paneth cell

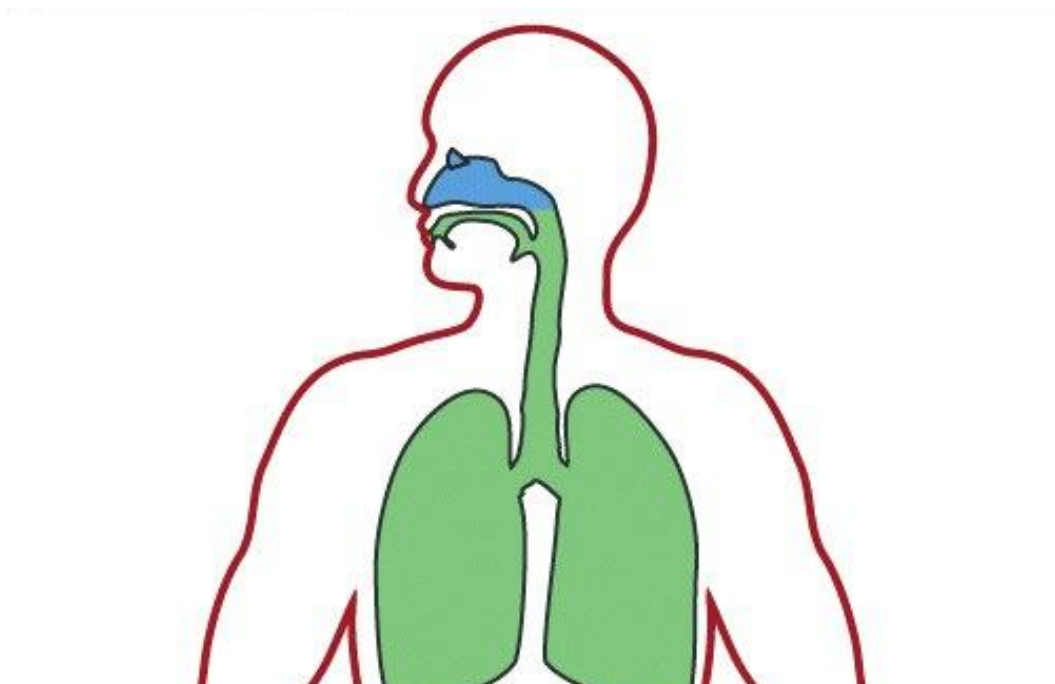
PP – Peyer’s patch

BV – blood vessel

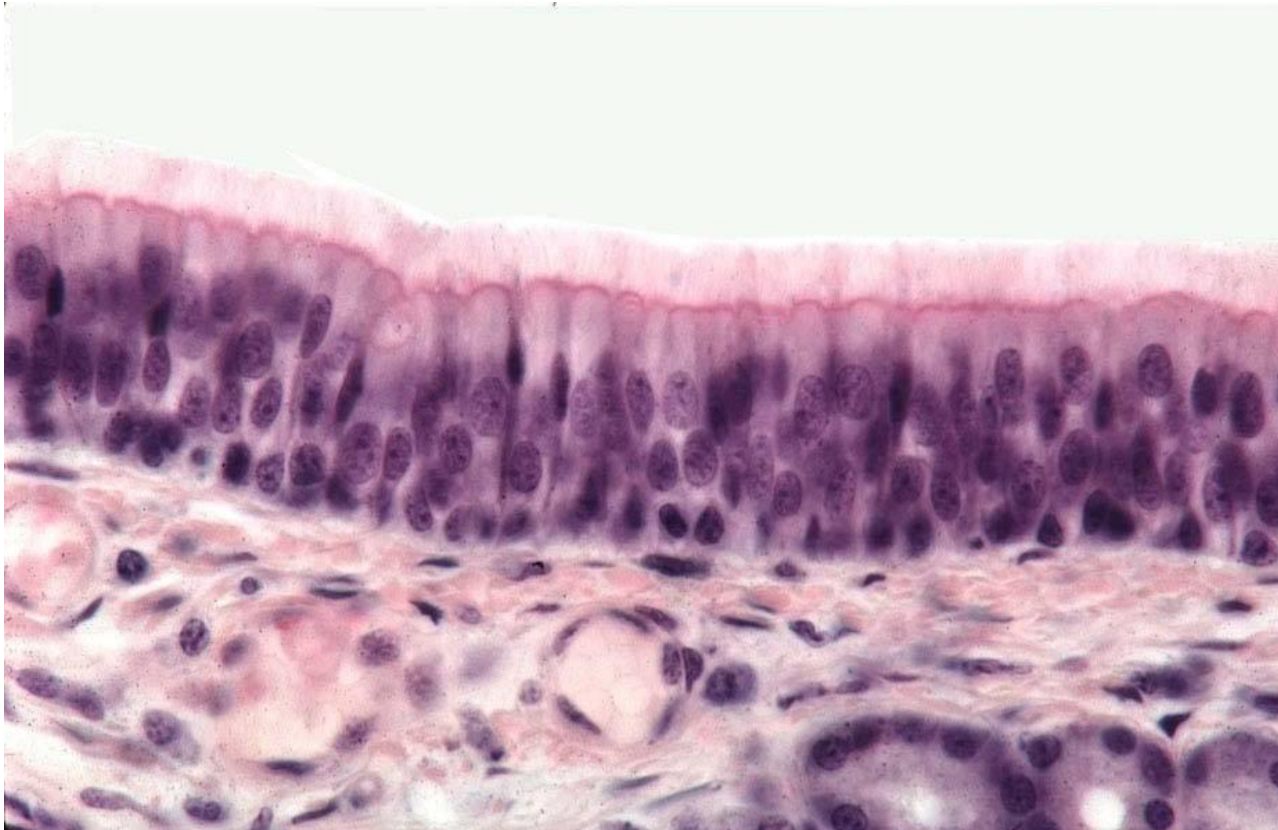


Воздушные трубки (трахея, бронхи, бронхиолы)  
покрыты многослойным эпителием.

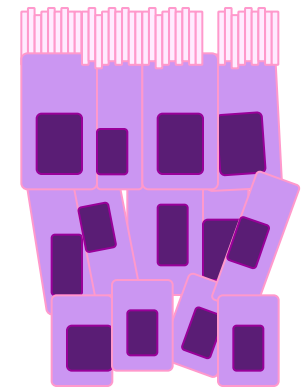
Наибольшая часть поверхности легких (альвеолы)  
покрыта **однослойным** эпителием.



# Многослойный эпителий носовых ходов



Гистологический препарат  
x270

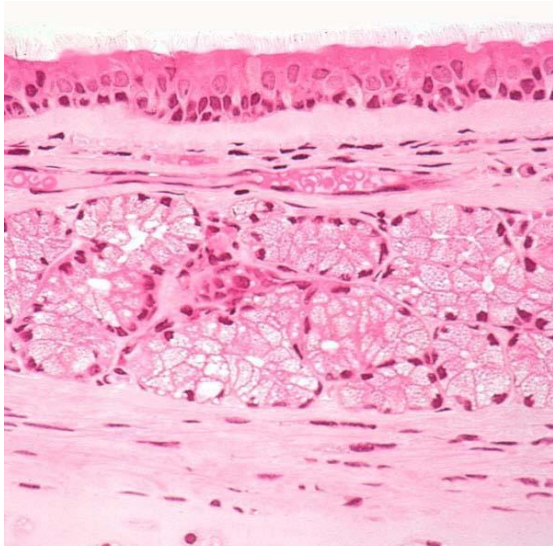


Многослойный  
реснитчатый  
эпителий

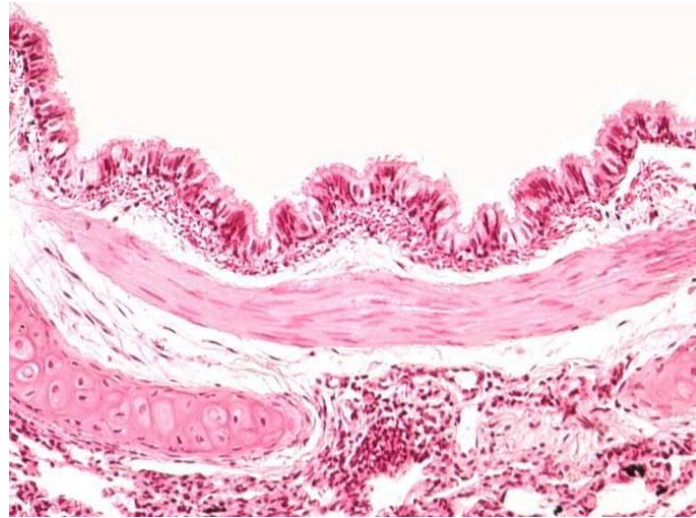
Схема



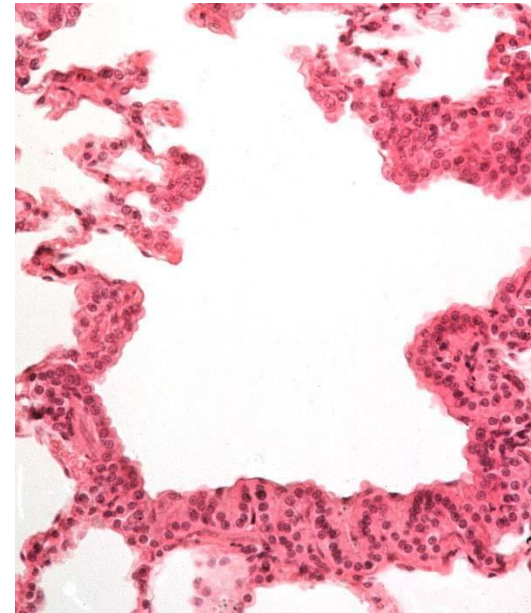
# Эпителий трахеи и бронхов



**Трахея**

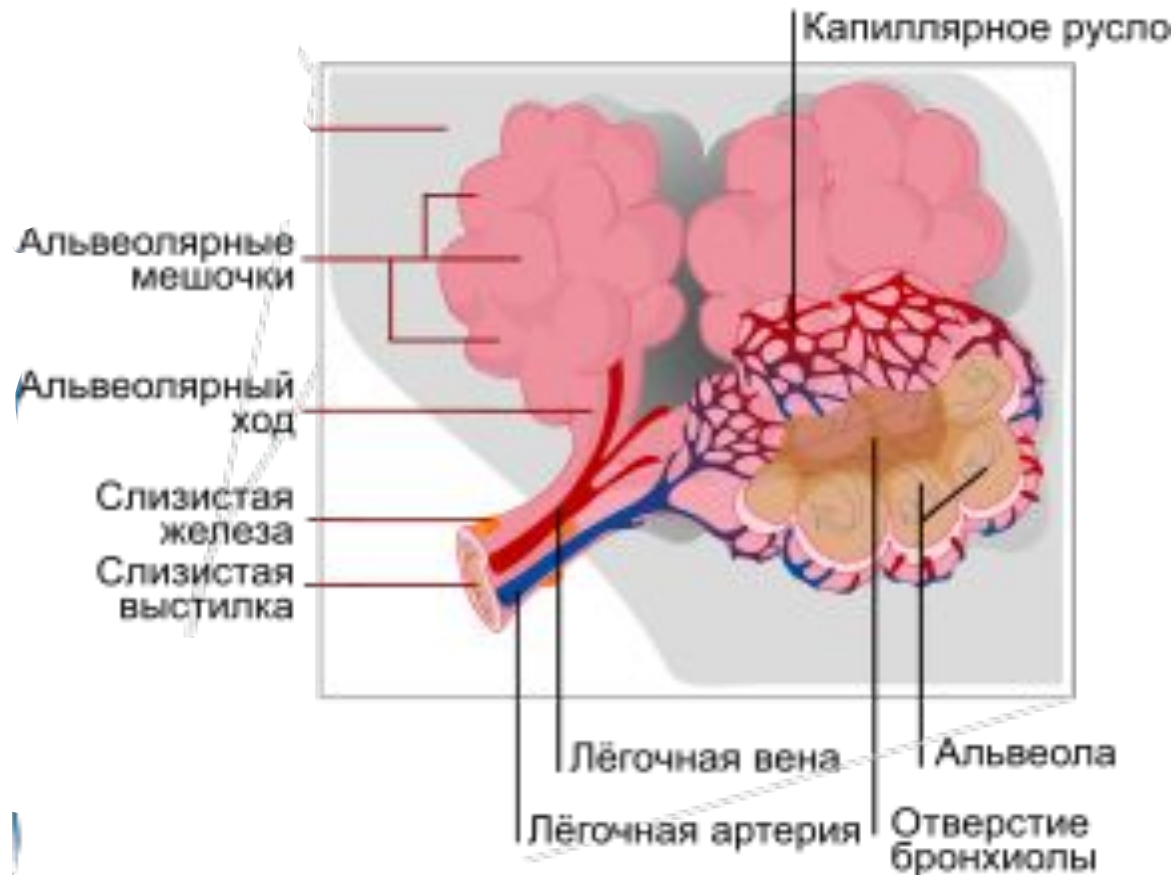


**Бронх**



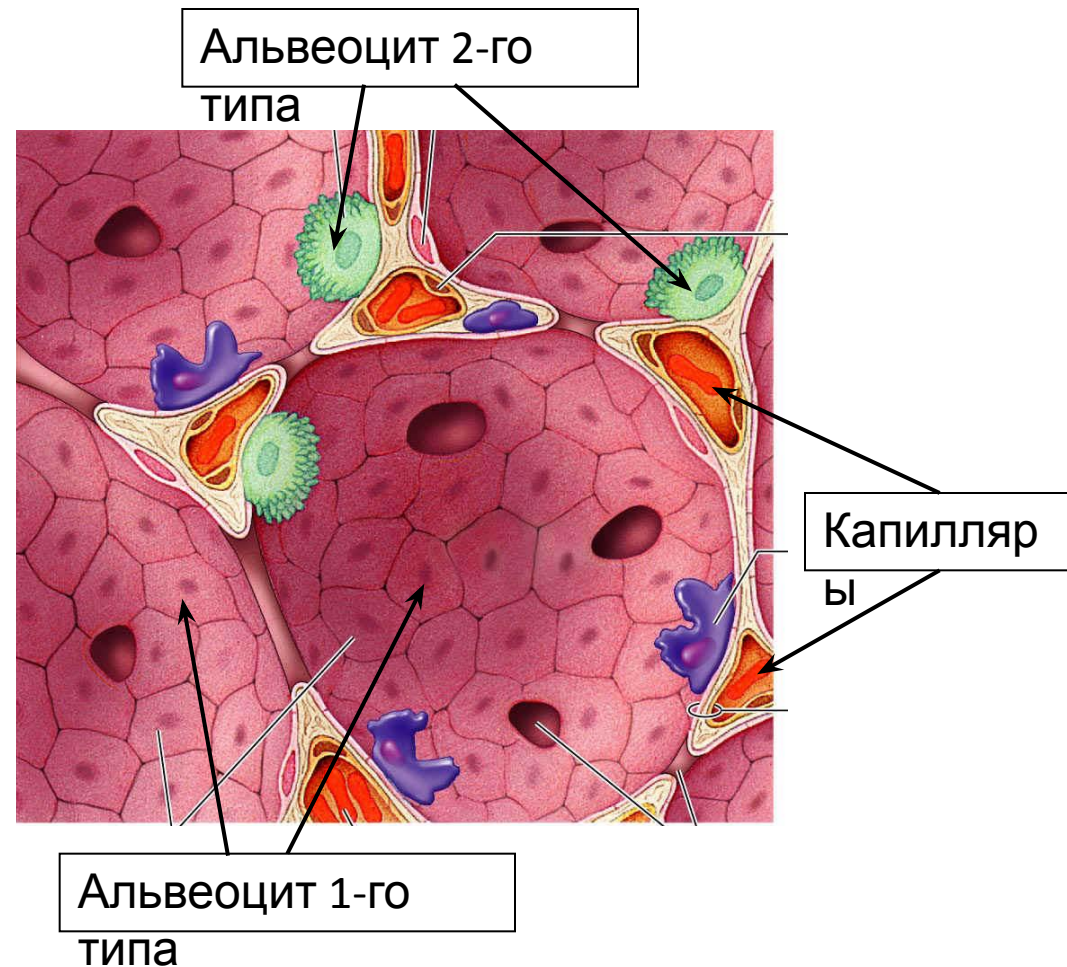
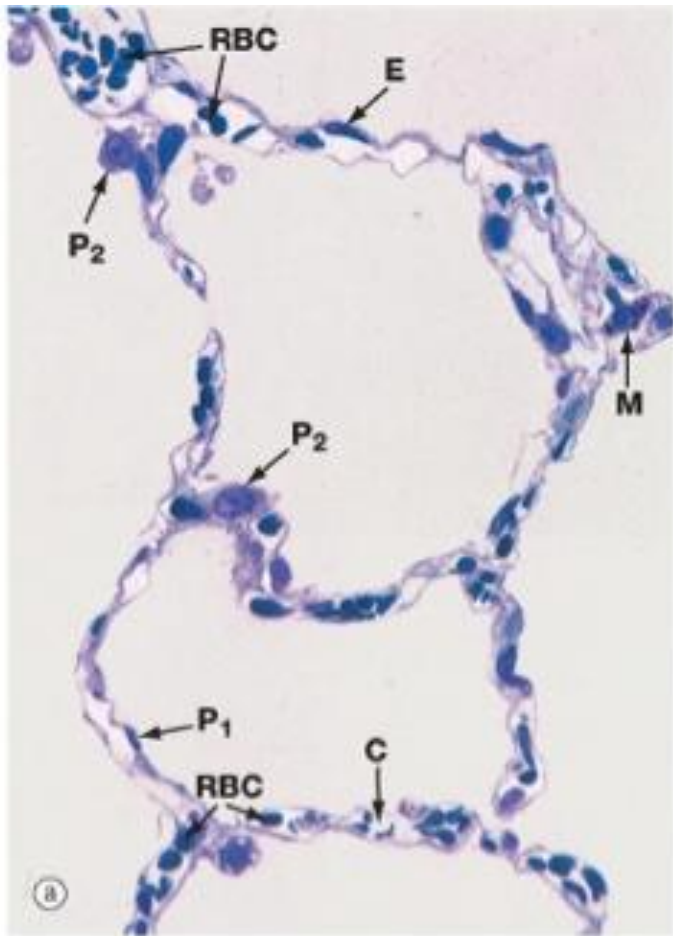
**Терминальный  
бронх**

Диффузия кислорода происходит сквозь эпителий альвеол, базальную мембрану и стенку кровеносного капилляра (суммарная толщина 0,5 мкм).  
Время диффузии – 0,3 секунды



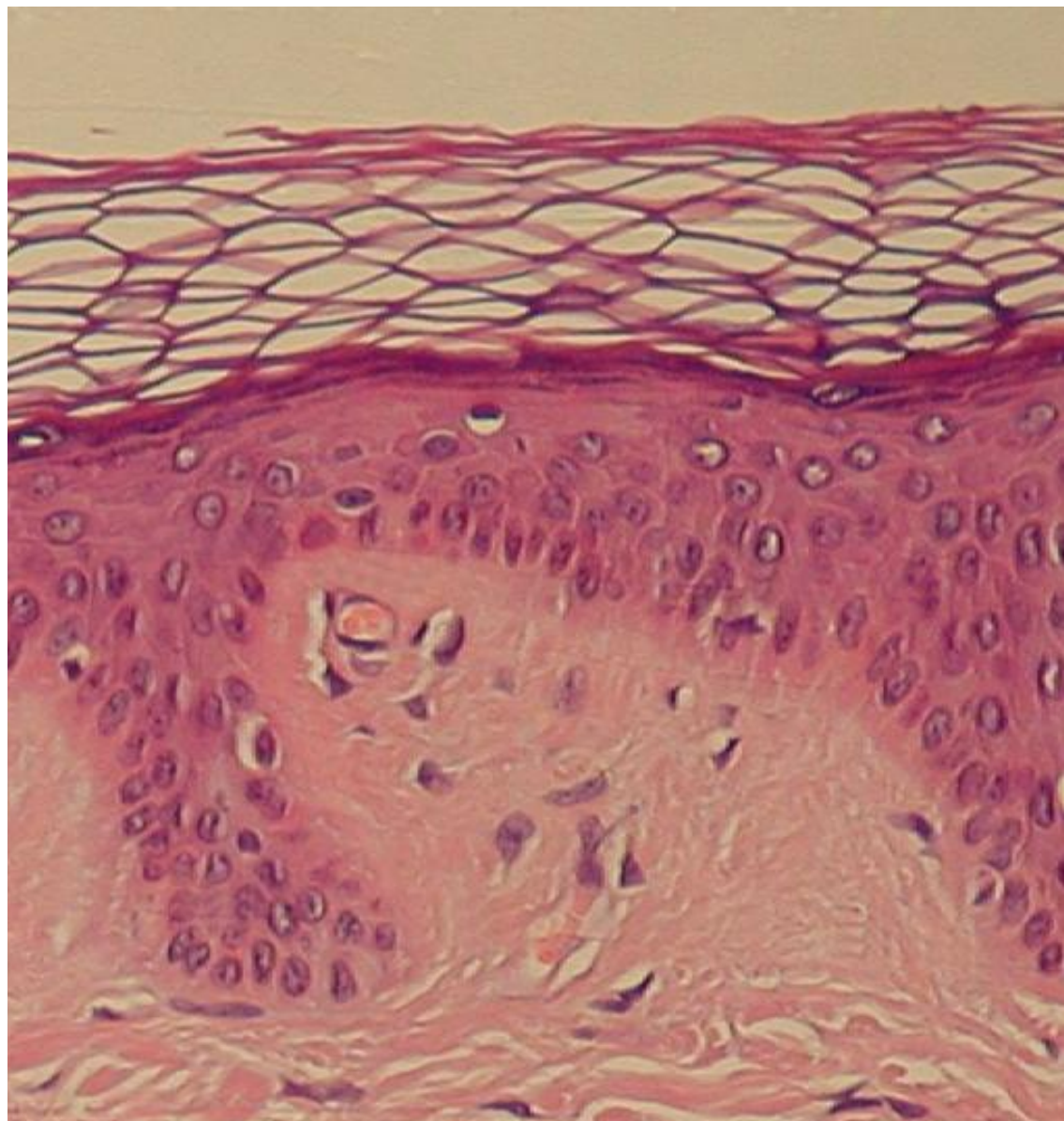
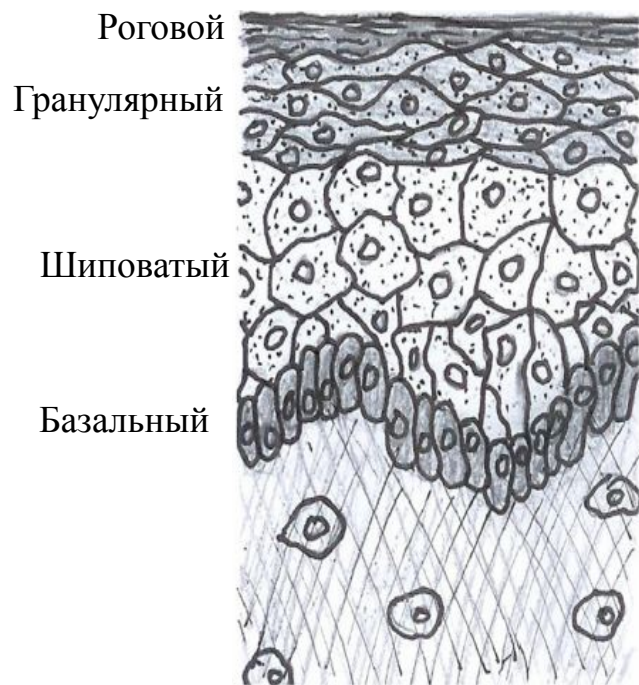
Поверхность одной альвеолы  $\pi D^2 = 3 \times 300 \times 300 \text{ мкм}^2 = 3 \times 90\,000 = 270\,000 \times 10^{-12} \text{ м}^2 = 27 \times 10^{-8} \text{ м}^2$   
Всего  $7 \times 10^8$  альвеол. Общая оценочная поверхность легких  $189 \text{ м}^2$

## Однослойный эпителий альвеол

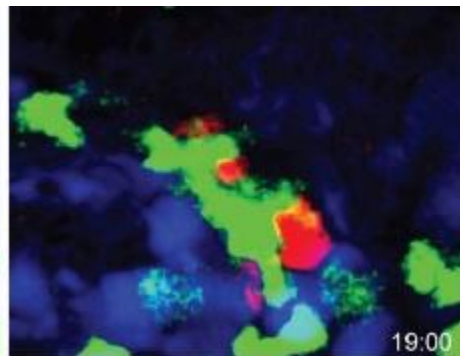
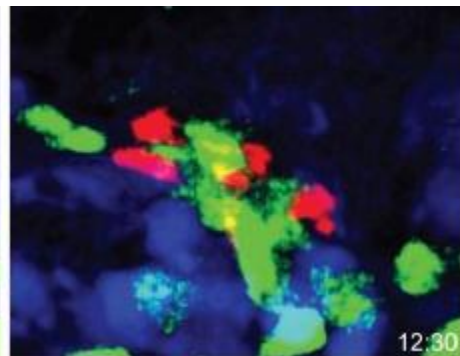
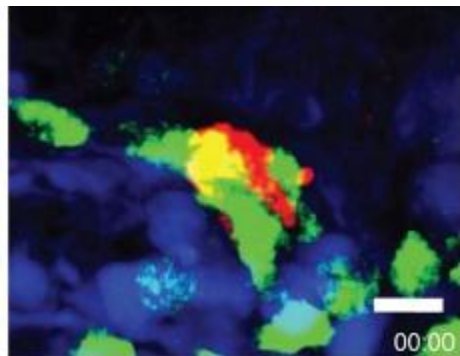
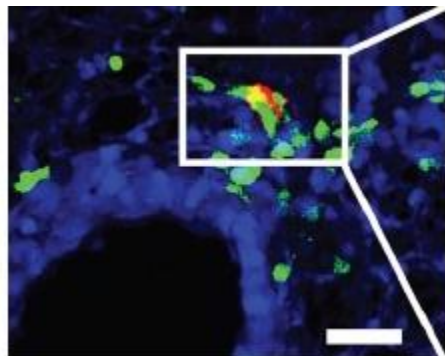
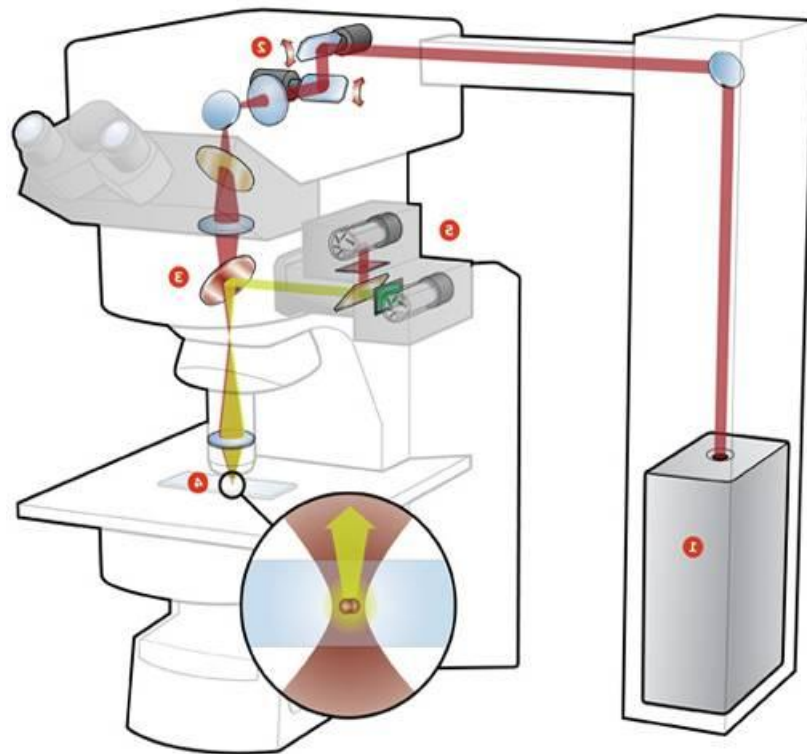
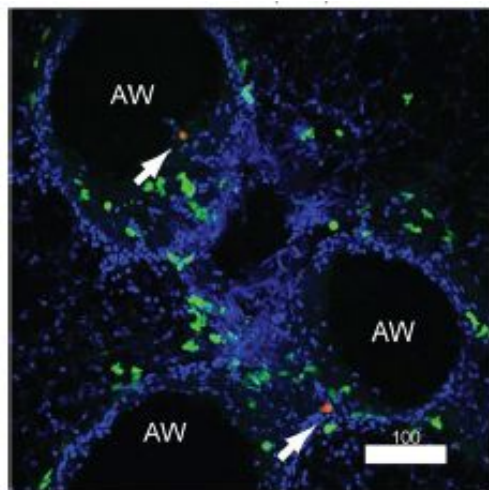


Альвеоцит 1-го типа очень плоский 0.2 мкм через него фильтруется кислород  
Альвеоцит 2-го типа большой и гранулярный, производит сурфактант, лизоцим, интерферон

**Из всех наших границ с внешним миром самая толстая – это кожа**  
**Эпидермис состоит из ~10 слоев клеток**

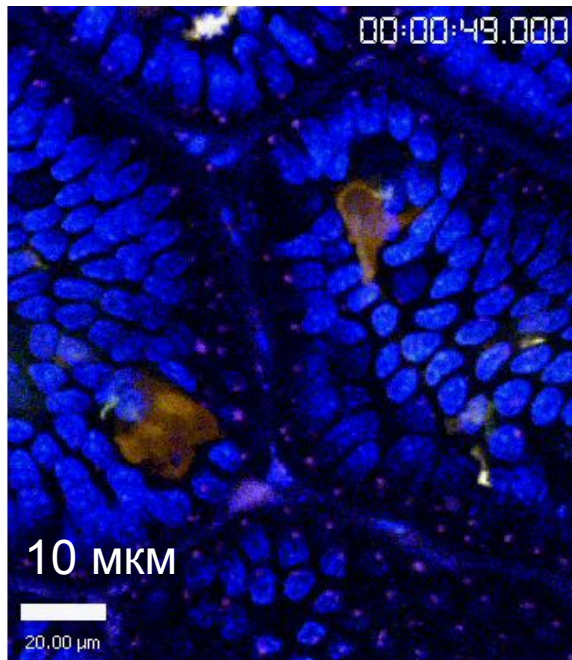


Граница прозрачна для света  
на глубину до 300 мкм



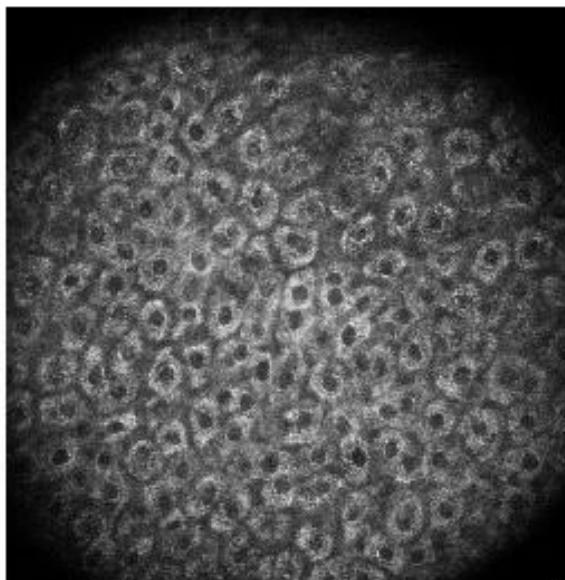
# Прижизненная световая микроскопия ворсинок кишечника

Апикальная поверхность ворсинки

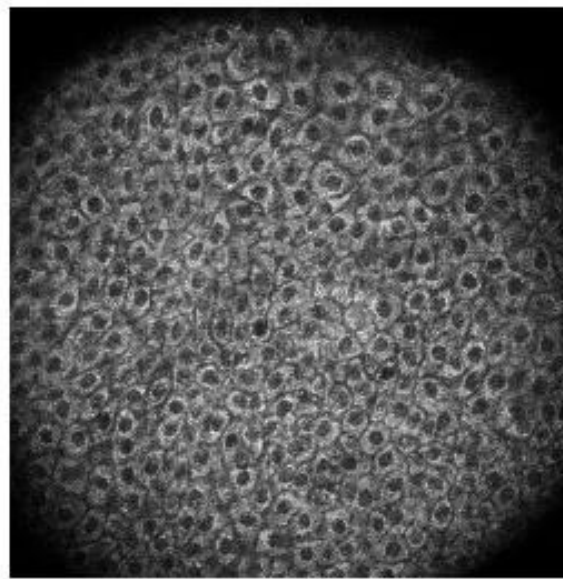


Слева и посередине : синие - ядра  
Справа : зеленые – дендритные кл

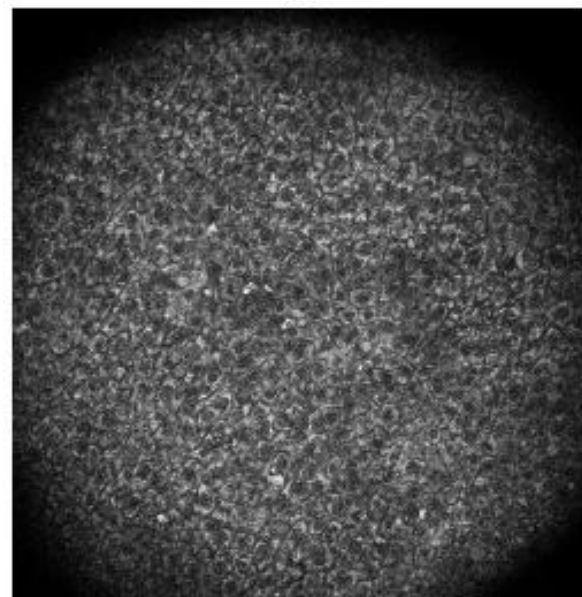
# Двухфотонная микроскопия позволяет заглянуть вглубь кожи человека



На глубине 10 мкм



На глубине 20 мкм



На глубине 30 мкм

# Прижизненная микроскопия базального слоя эпидермиса.

По времени собственной флуоресценции можно различать кератиноциты (зелено-голубые) и меланоциты (оранжевые)

*FLIM - fluorescence lifetime imaging*

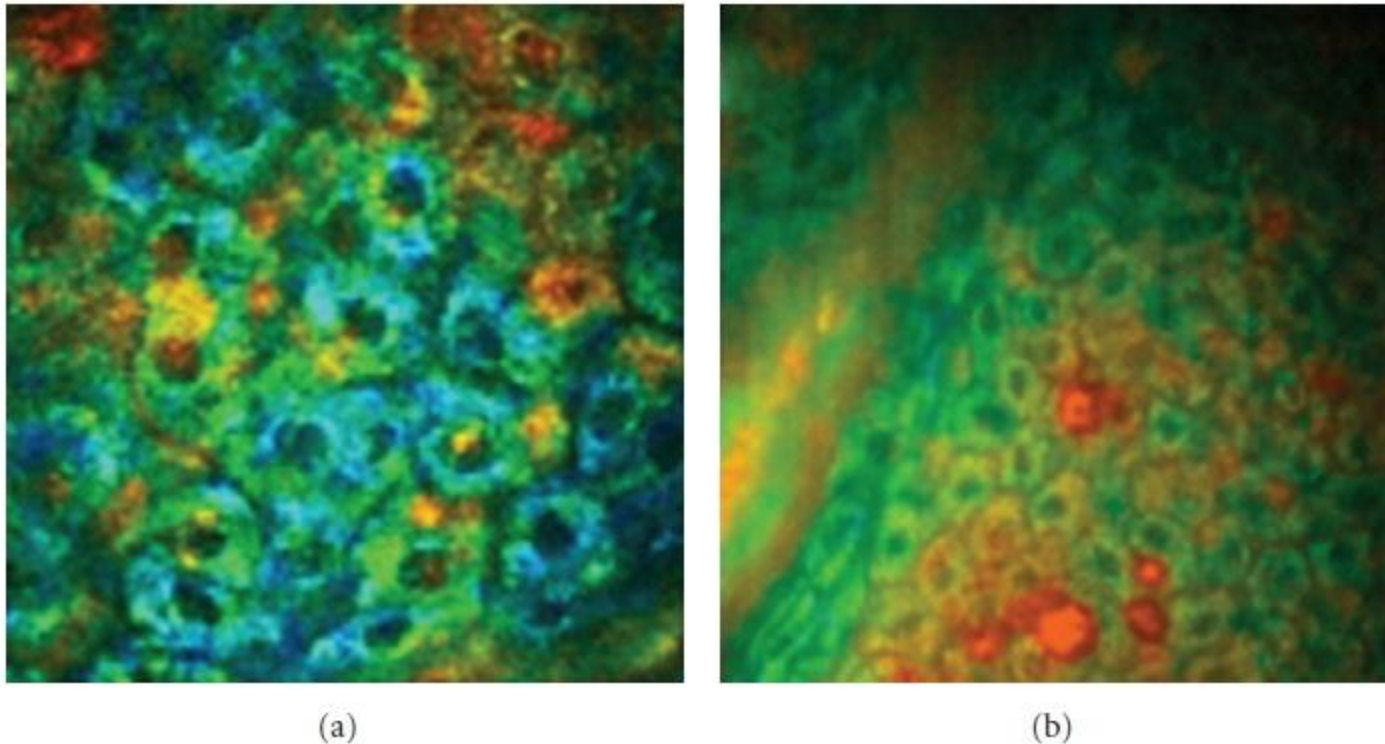


Figure 5: FLIM images of healthy skin acquired *in vivo* by the Imperial College FLIM system incorporated in the *DermalInspect*. (a) 760nm excitation wavelength. In the false-colour images, keratinocytes appear green-blue, showing a longer fluorescence lifetime with respect to melanin aggregates corresponding to yellow-red areas with a shorter lifetime value. (b) 760nm excitation wavelength. Keratinocytes of the basal layer appearing yellow-red because of the presence of pigmentation [Stefania Seidenari et al.. Multiphoton LaserMicroscopy and Fluorescence Lifetime Imaging for the Evaluation of the Skin//Dermatology Research and Practice Volume 2012, Article ID 810749, 8 pages. doi:10.1155/2012/810749](#)





Однослойный эпителий  
толщина ~ 10-20 мкм

Многослойный эпителий  
толщина < 100 мкм

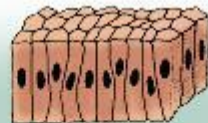
**Types of Epithelium**



Simple squamous



Simple cuboidal



Simple columnar



Stratified squamous



Stratified cuboidal



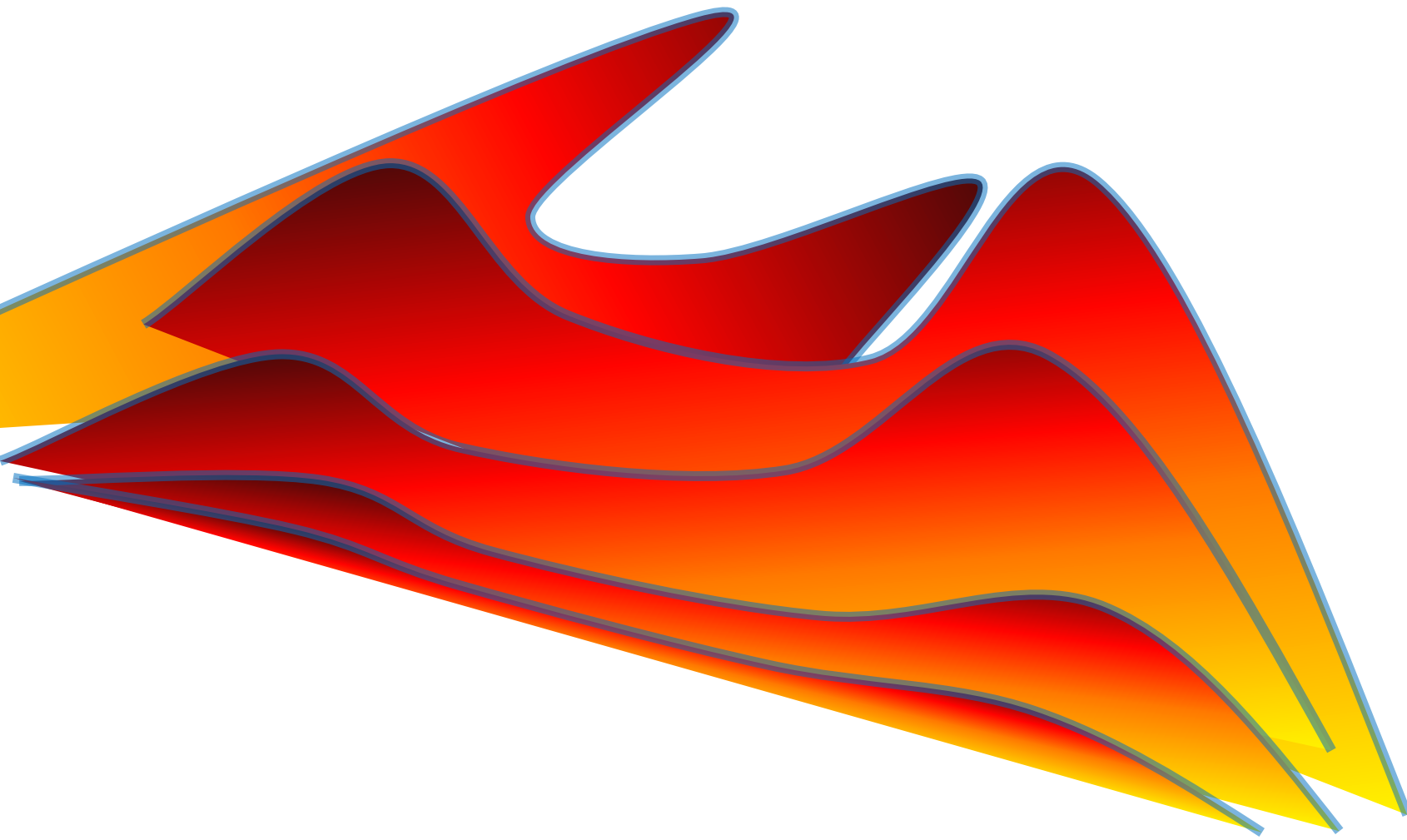
Pseudostratified columnar

Граница очень тонкая

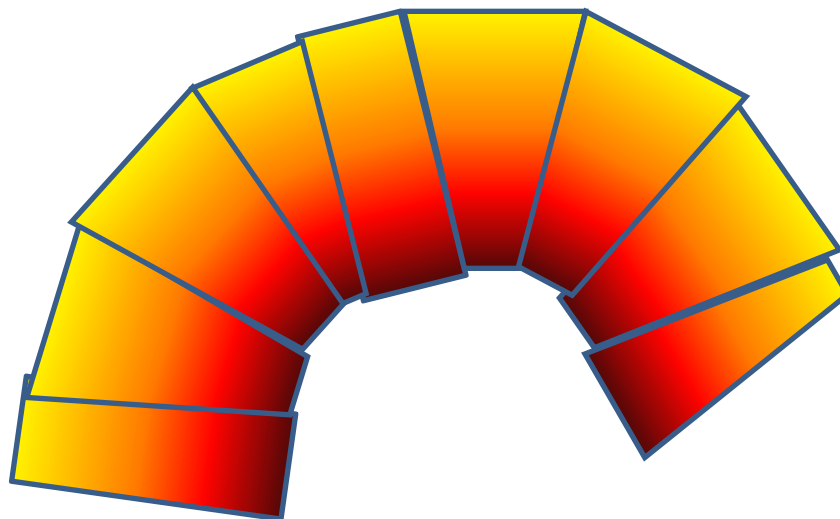
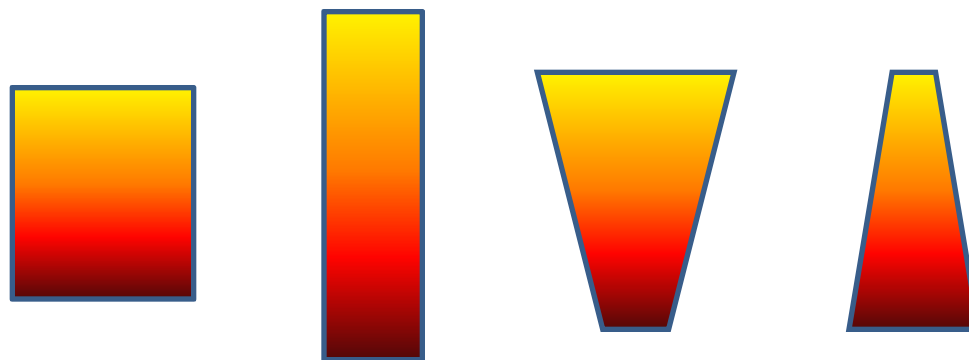
10-100 мкм соответствует 1/100 000 – 1/10 000 от линейного размера нашего тела

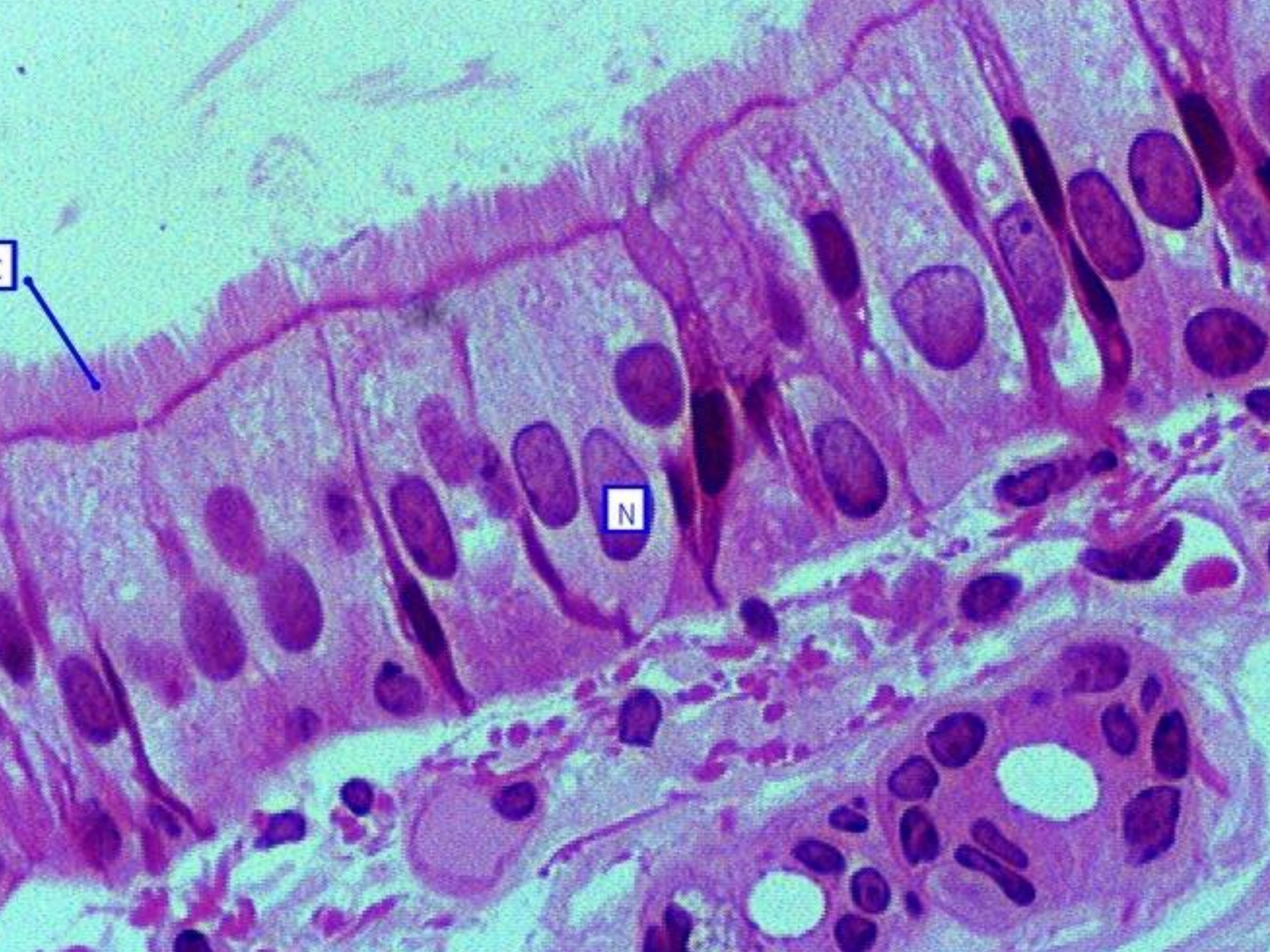
**Граница гибкая, эластичная**

# Граница гибкая и эластичная



**Клетки эпителия могут менять свою геометрию и сдвигаться относительно соседних клеток. Это позволяет легко изменять кривизну границы.**





□



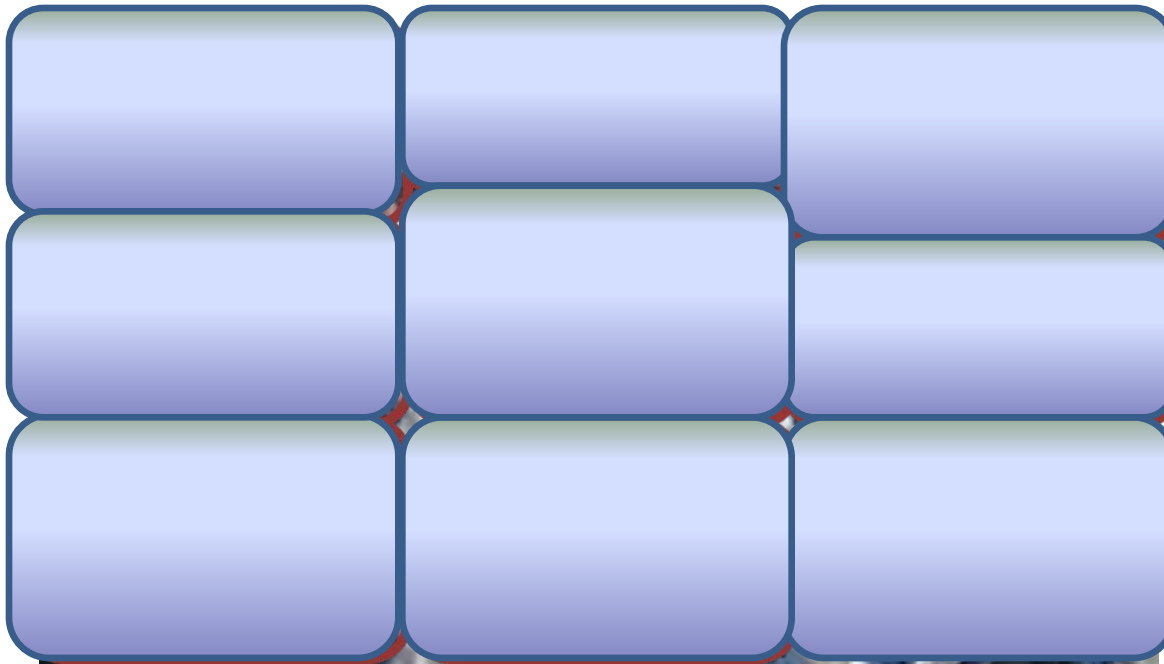
N



**Граница прочная**

## Граница прочная

Механическая прочность эпителиального слоя обеспечивается межклеточной сетью промежуточных филамент, которая охватывает весь эпителий

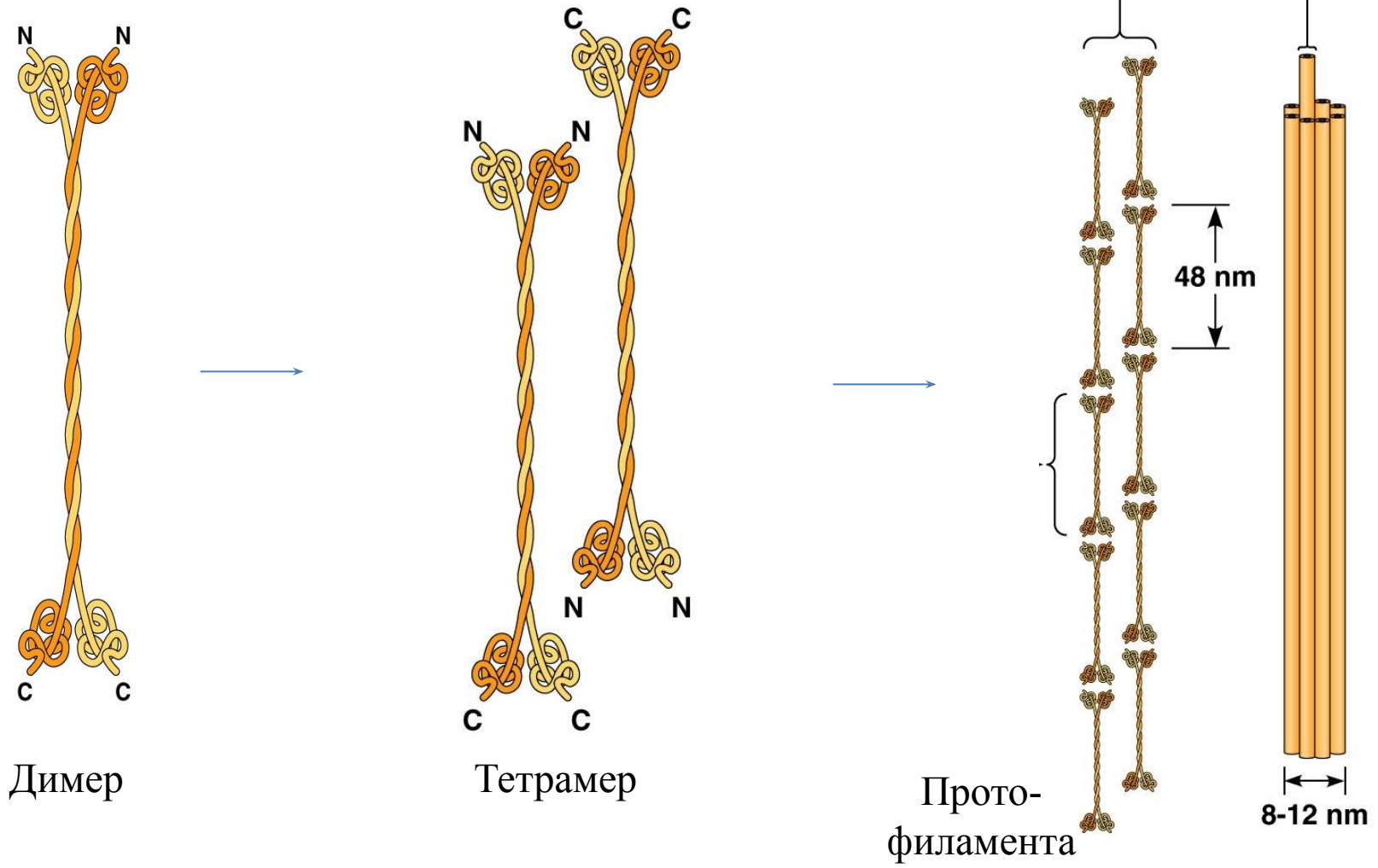




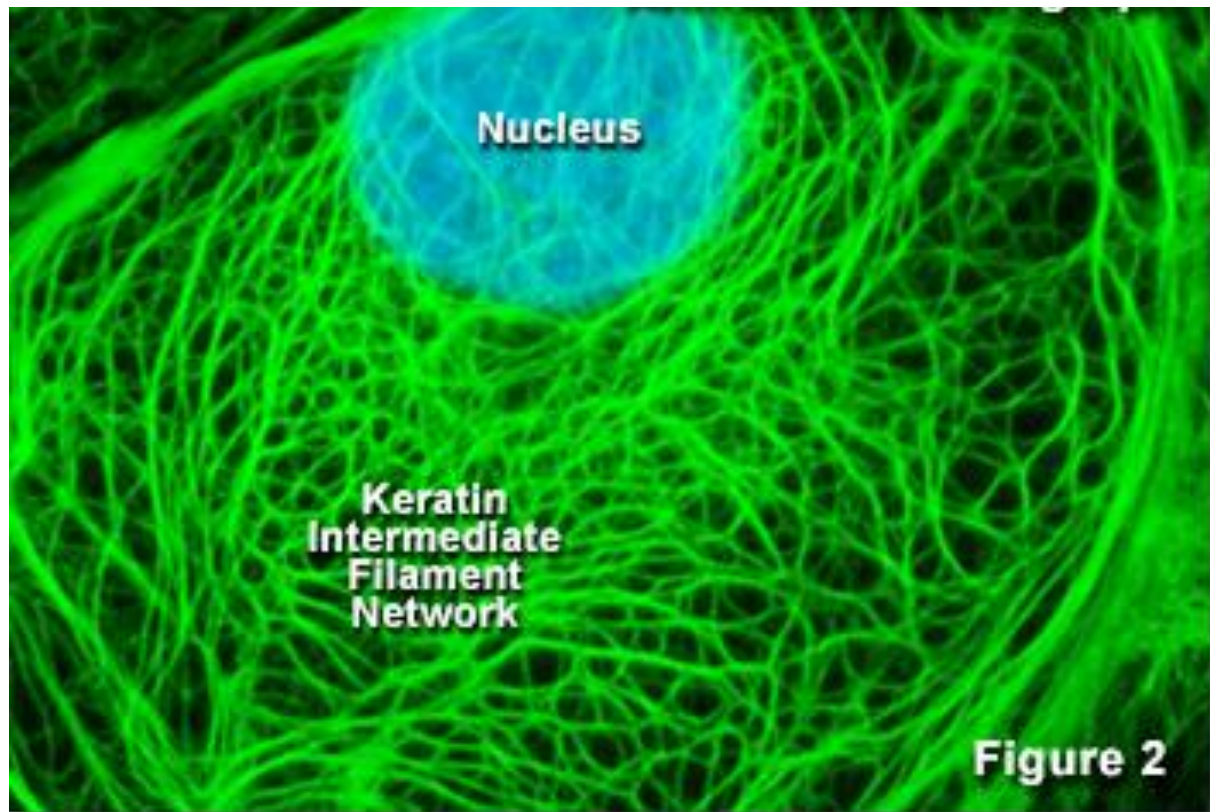
# Промежуточные филаменты (Intermediate filaments)

Кератин

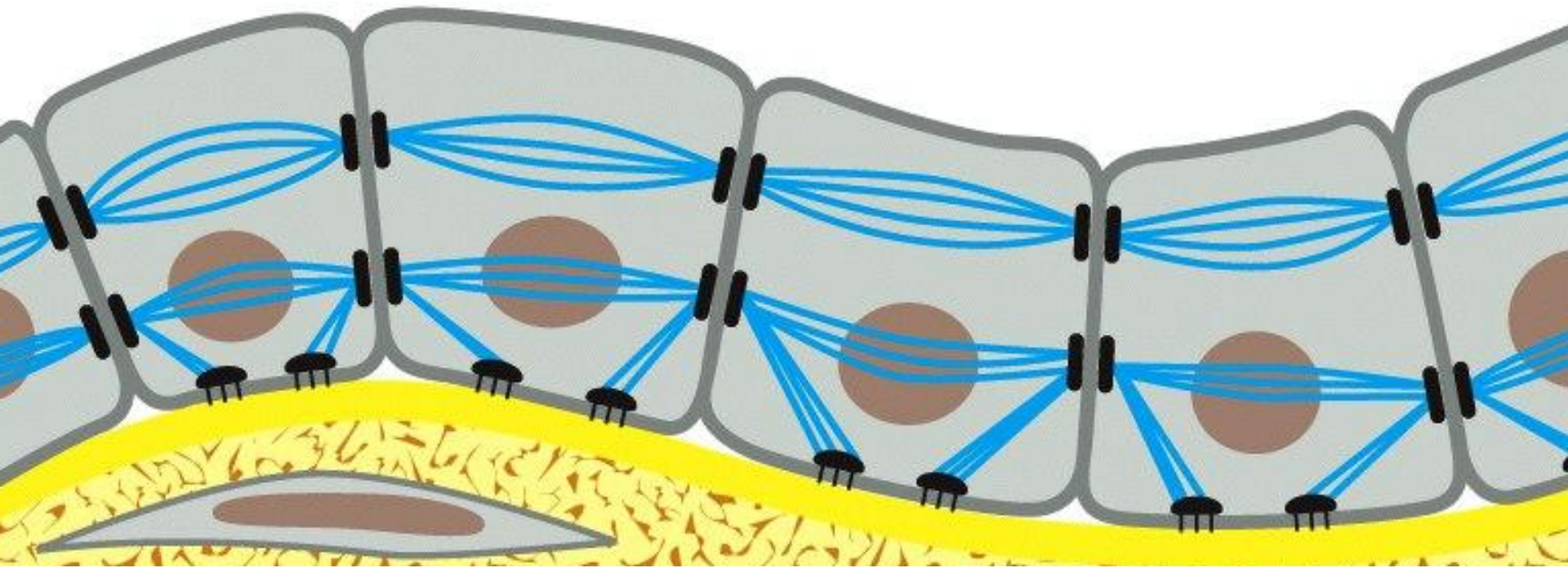
Промежуточная филамента



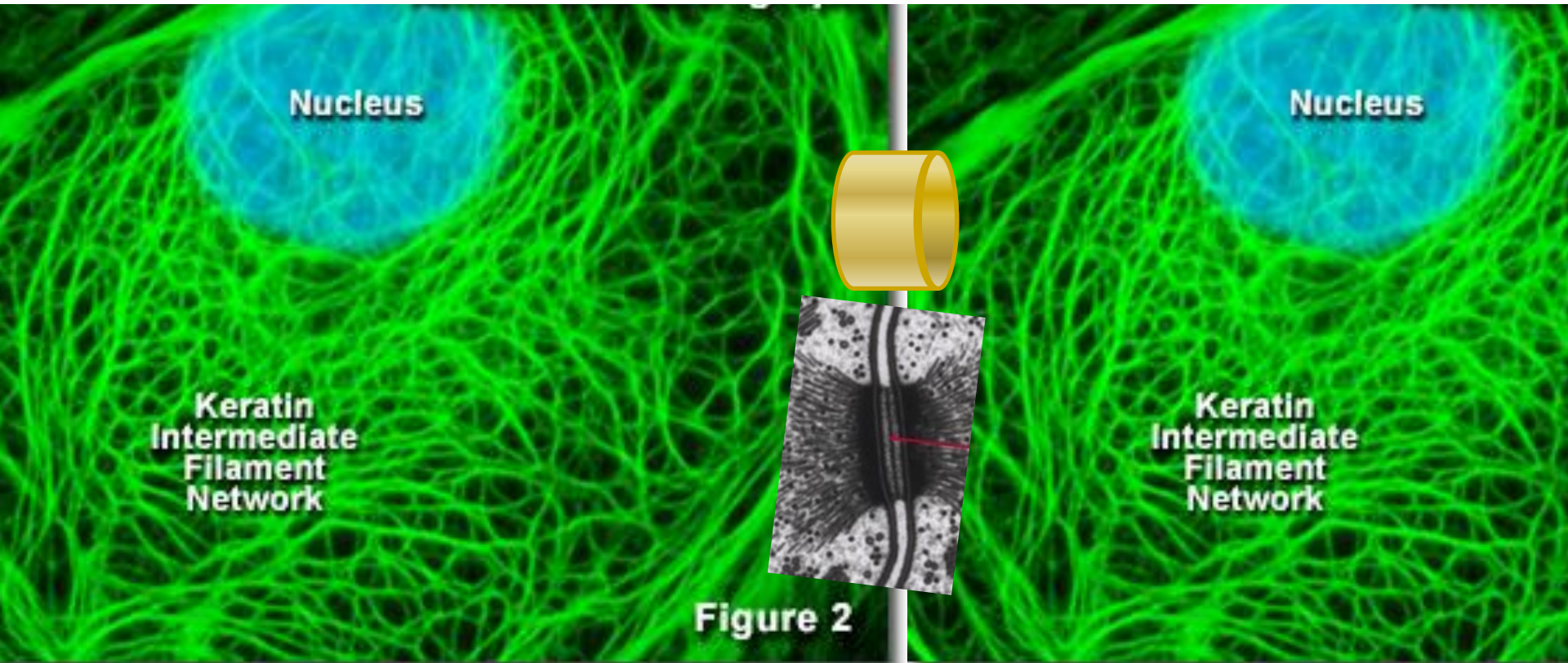
**Сеть промежуточных филамент создает каркас и определяет форму клетки.**



Промежуточные филаменты всех клеток эпителия  
объединены в общую сеть

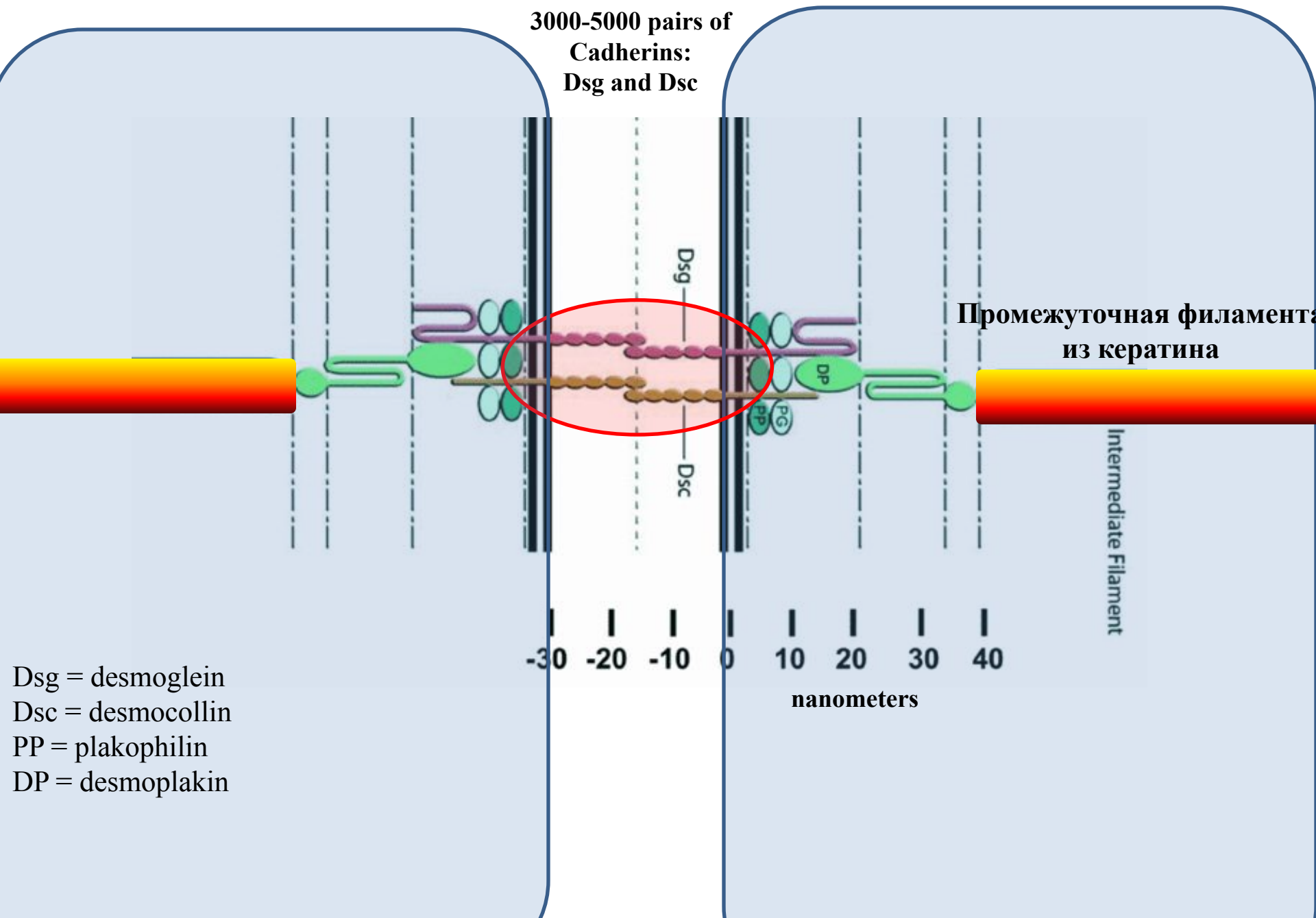


**Сети соседних клеток соединены через десмосомы - специальные контакты, в которых клетки сцеплены парами молекул кадгерина**



# Белковые молекулы, образующие десмосому

3000-5000 pairs of  
Cadherins:  
Dsg and Dsc



Промежуточная филамента  
из кератина

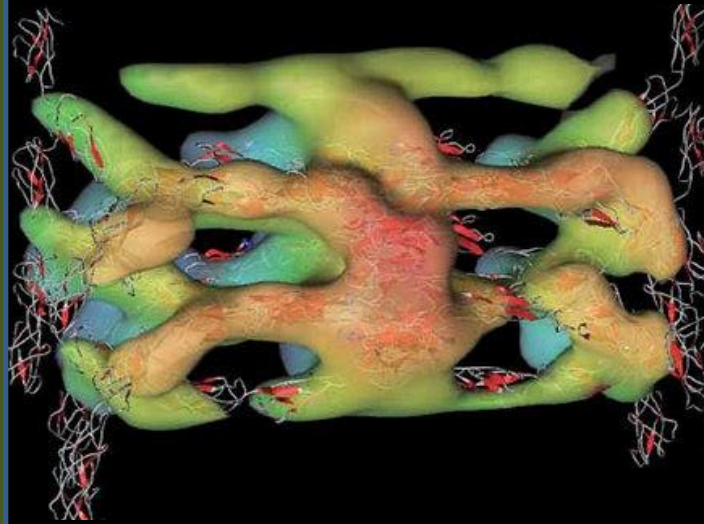
Intermediate Filament

-30 -20 -10 0 10 20 30 40  
nanometers

Dsg = desmoglein  
Dsc = desmocollin  
PP = plakophilin  
DP = desmoplakin

Cadherin –to-cadherin complex  
connecting skin cells

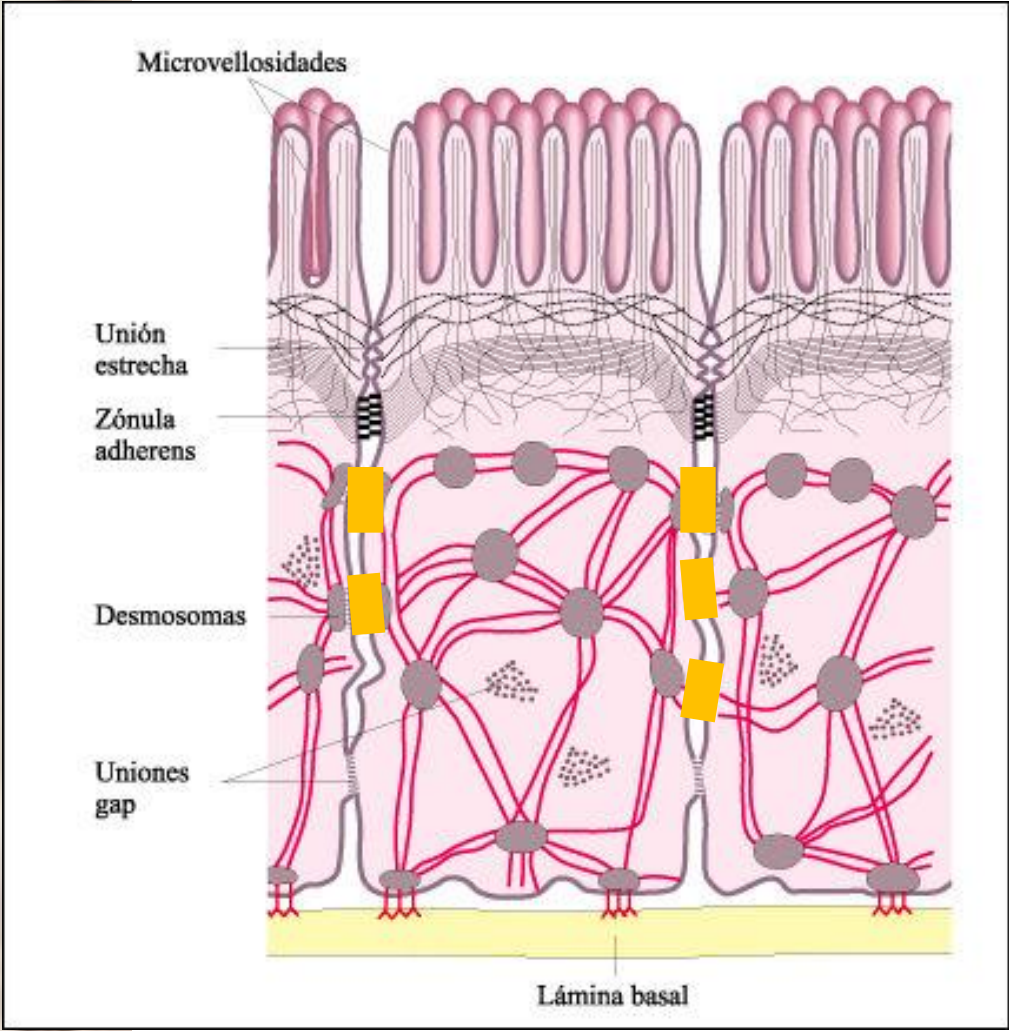
Cell 1



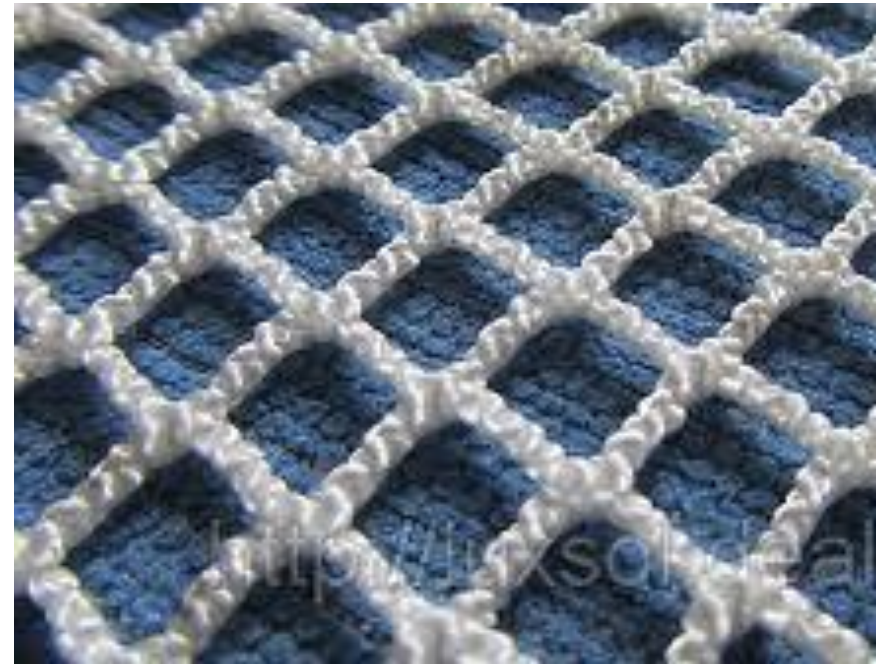
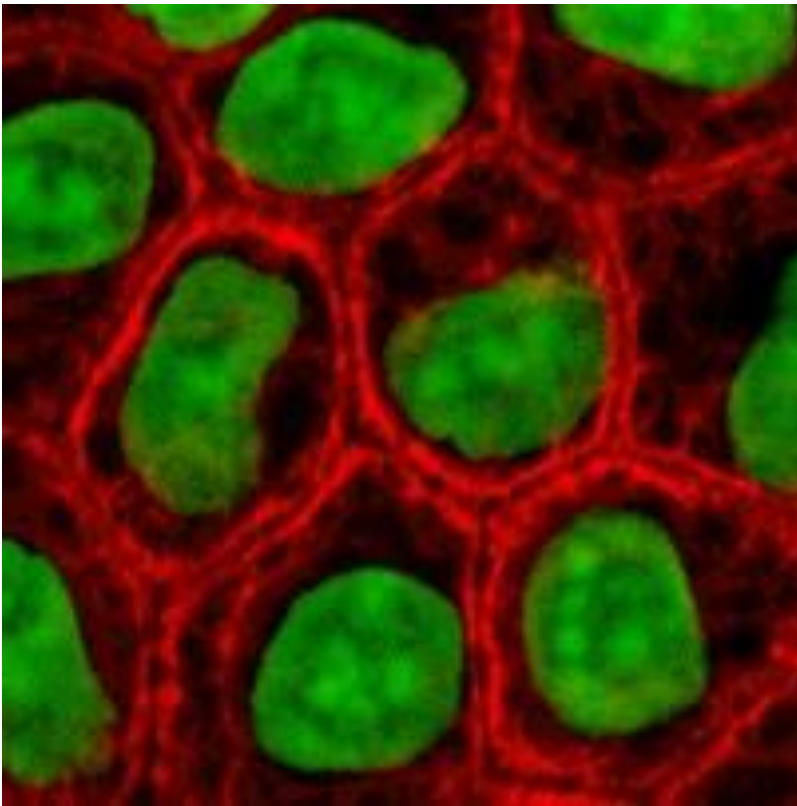
Cell 2

3-D visualization of interacting cadherin  
molecules in their native arrangement.  
Cryo-electron tomography.

<http://www.livescience.com/2072-skin-strong-cells-stick-velcro.html>



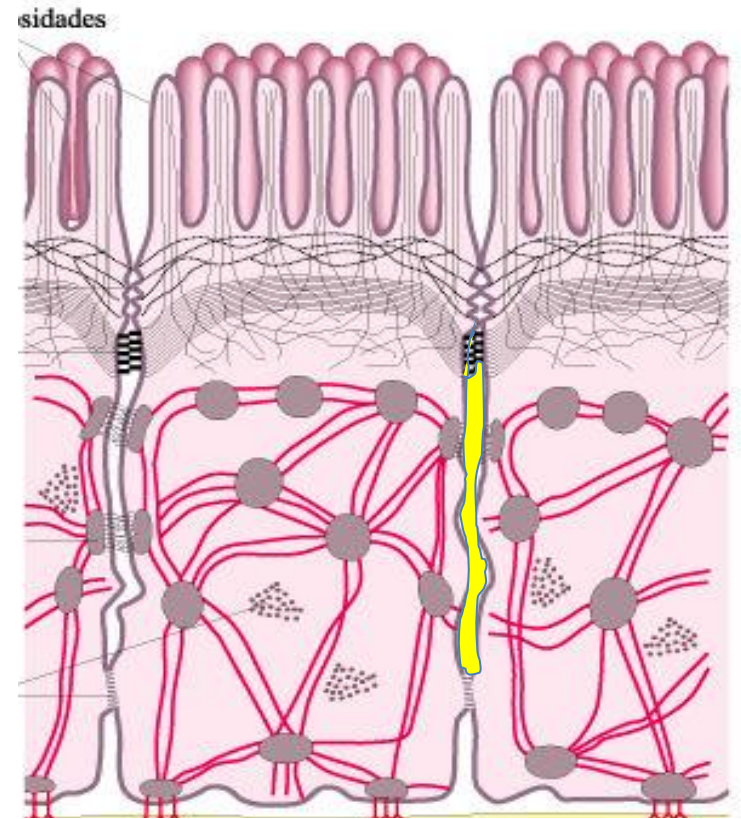
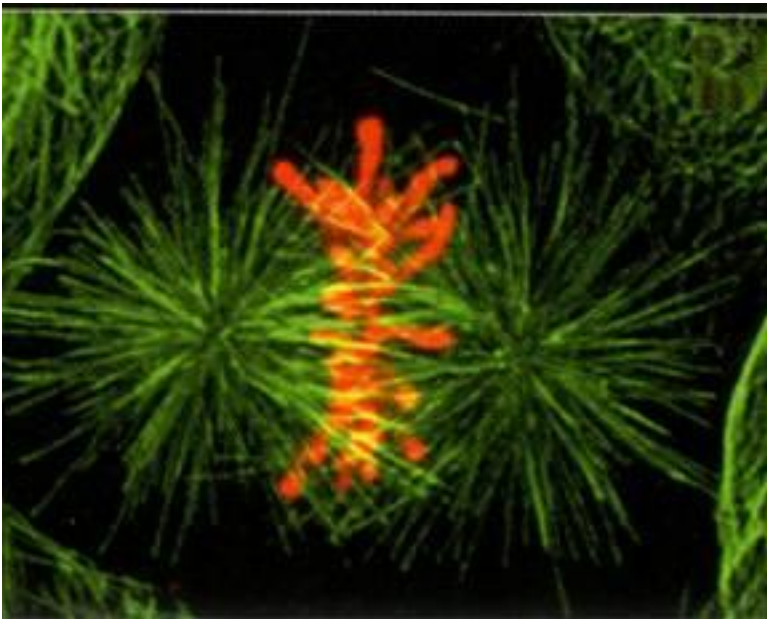
Промежуточные филаменты из белка кератина (9-11 нм) образуют сеть в каждой эпителиальной клетке. Между клетками – десмосомы, которые во многих местах прочно соединяют сети промежуточных филамент соседних клеток. Сеть промежуточных филамент эпителия – это сплошная сеть, обеспечивающая прочность эпителия и устойчивость к механическим нагрузкам.



Эпителий. Промежуточные филаменты – красные, ядра клеток - зеленые



Прочность контакта между двумя клетками эпителия измеряется силой ~ 50 наноНьютон



Для сравнения:  
Сила одной микротрубочки,  
которая двигает хромосому  
~ 50 пикоНьютон  
(то есть в 1000 раз меньше)

**Граница непроницаемая**

**Стыки между соседними клетками тщательно герметизированы по всему периметру.**

**В этой герметизации используется два типа контактов – плотные (окклюзионные) и адгезионные**

Микроворсинки

Зона окклюзии

Зона адгезии

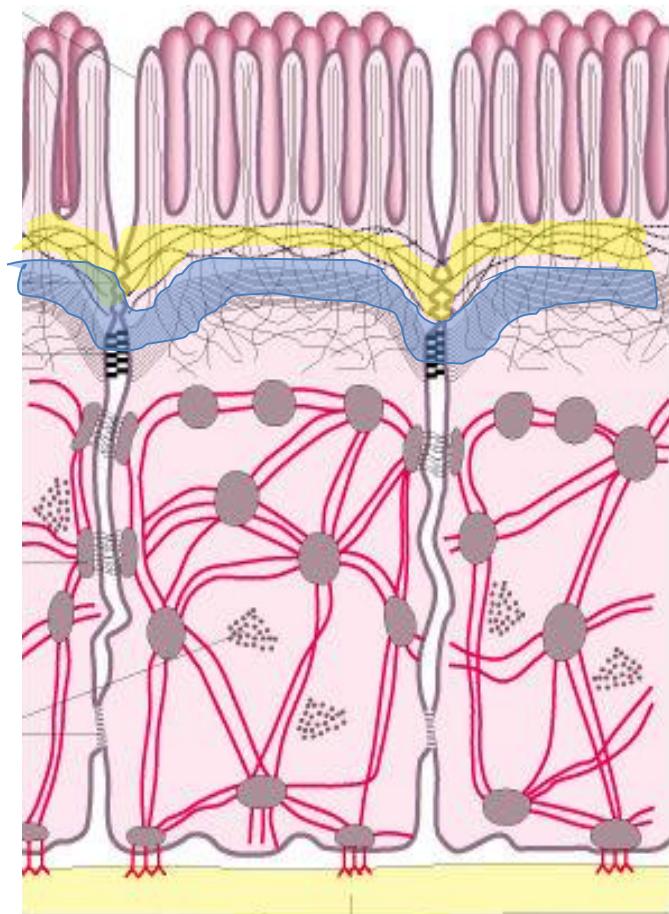
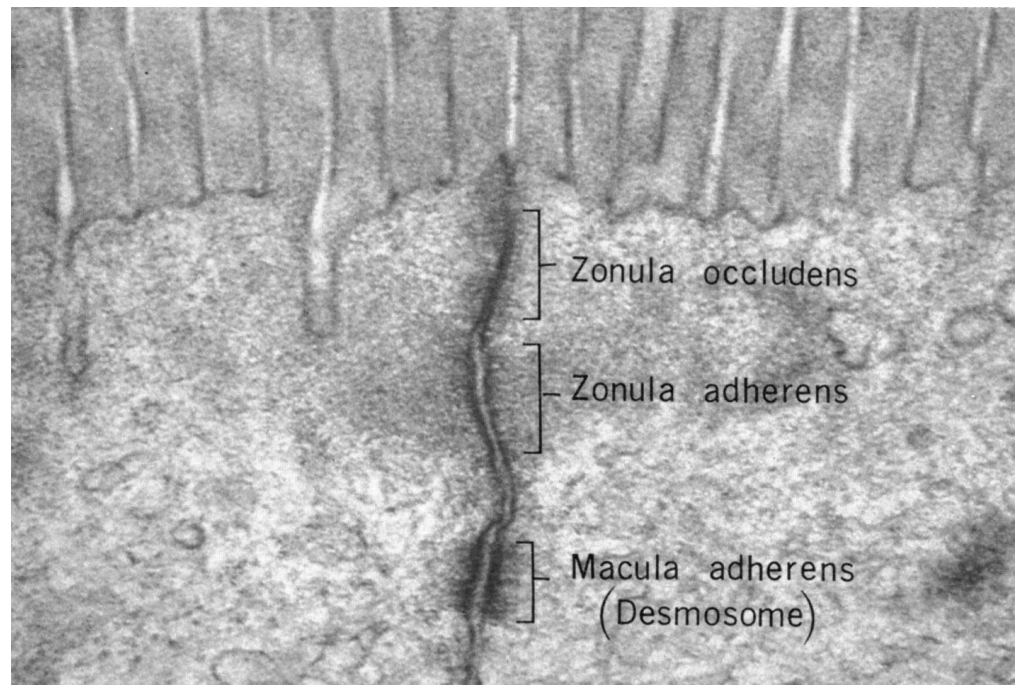
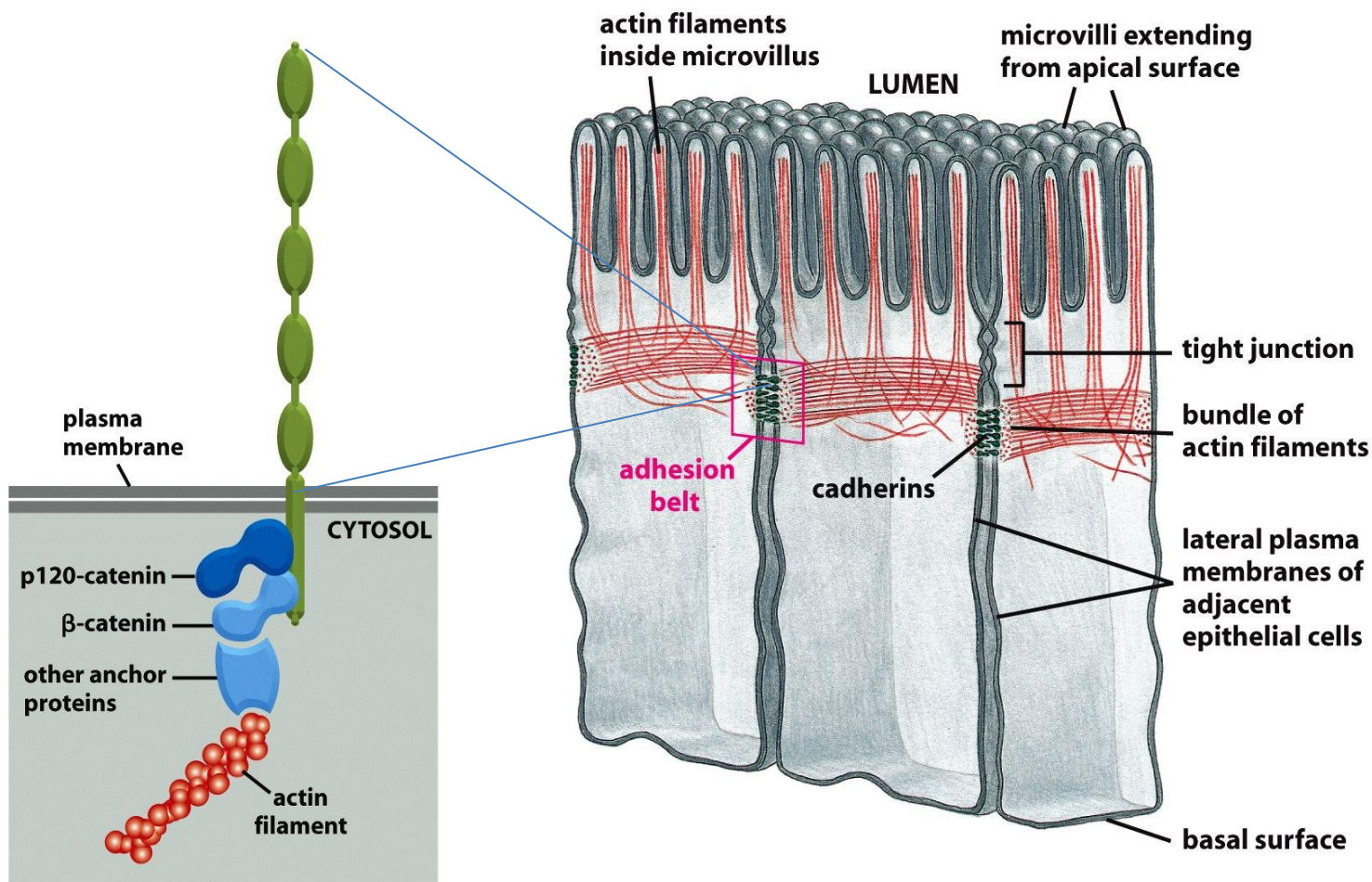


Lámina basal

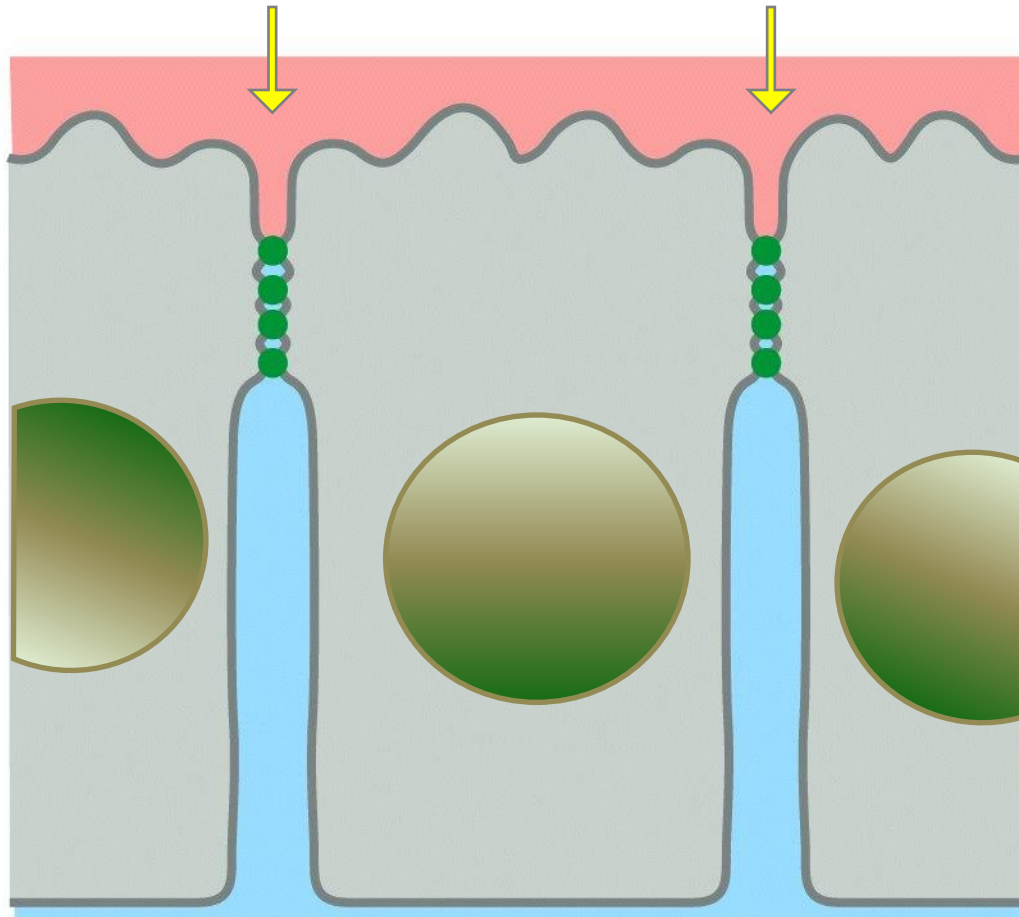


Пояс адгезионного контакта образован молекулами кадгеринов.  
Внутри клетки они скреплены микрофиламентами из актина.

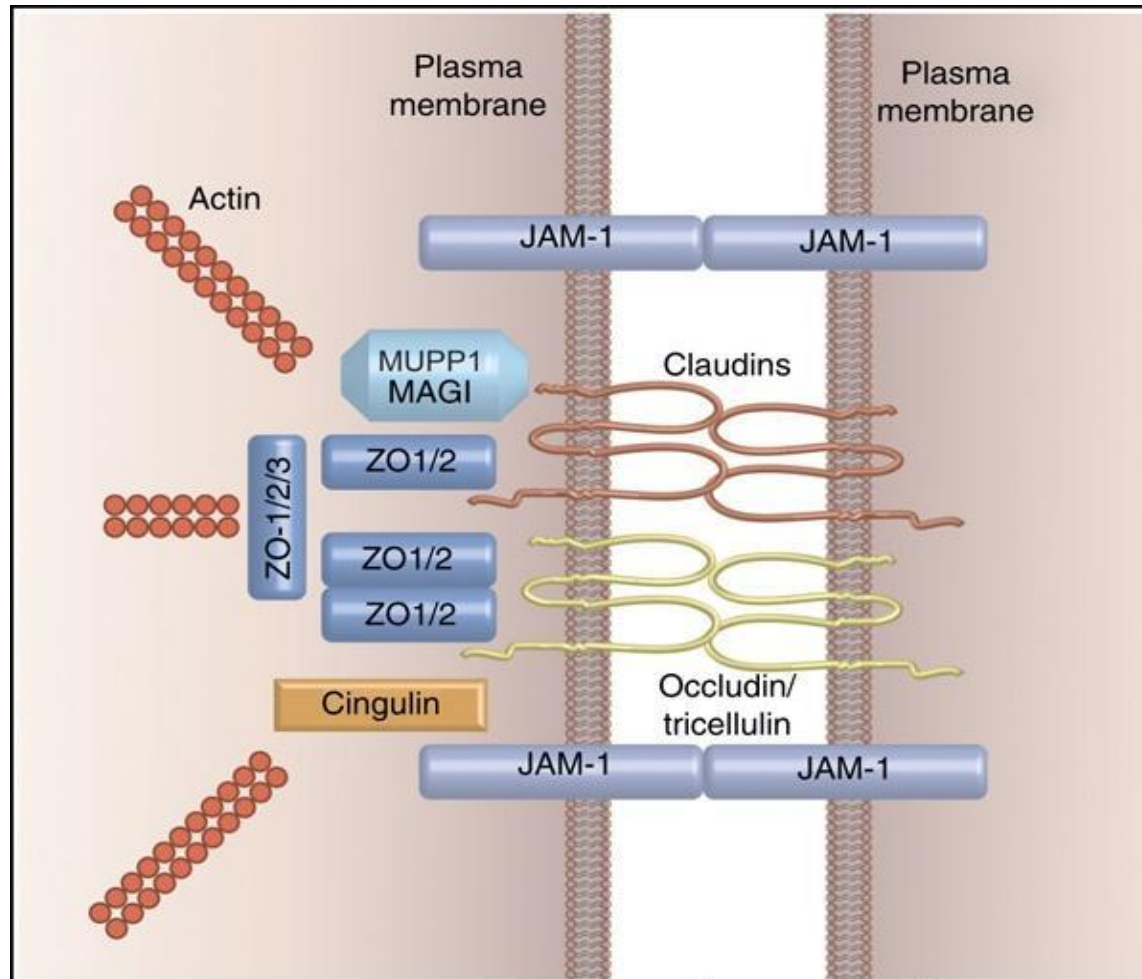
Пояс адгезионного контакта не запирающий,  
он удерживает клетки вместе



**Проникновение веществ через эпителий строго ограничено  
плотным контактом (tight junction)**



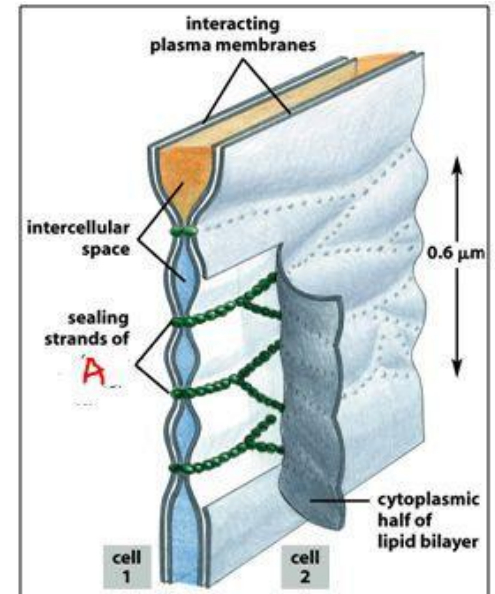
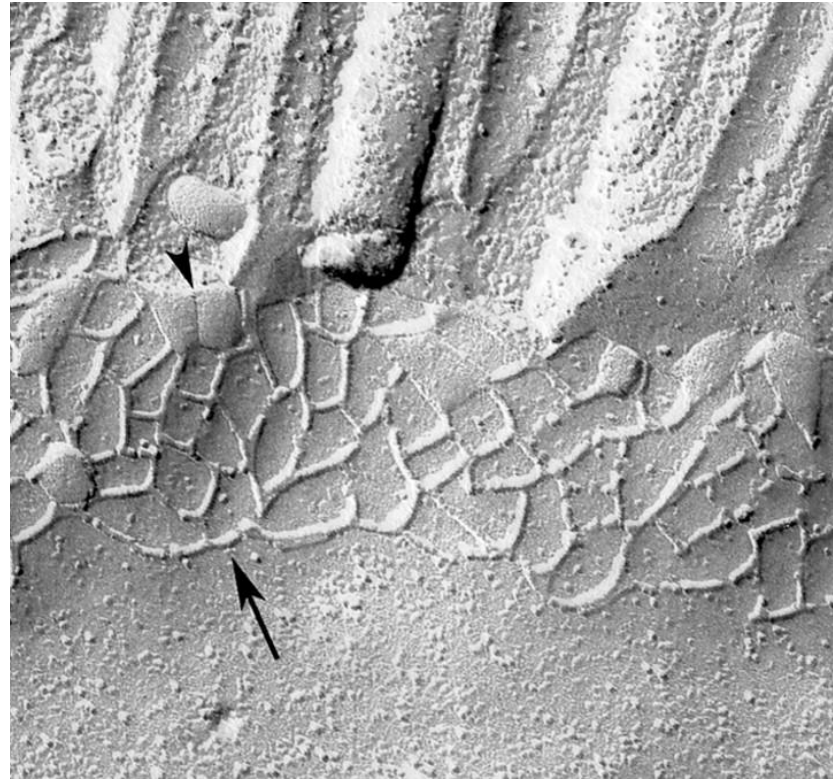
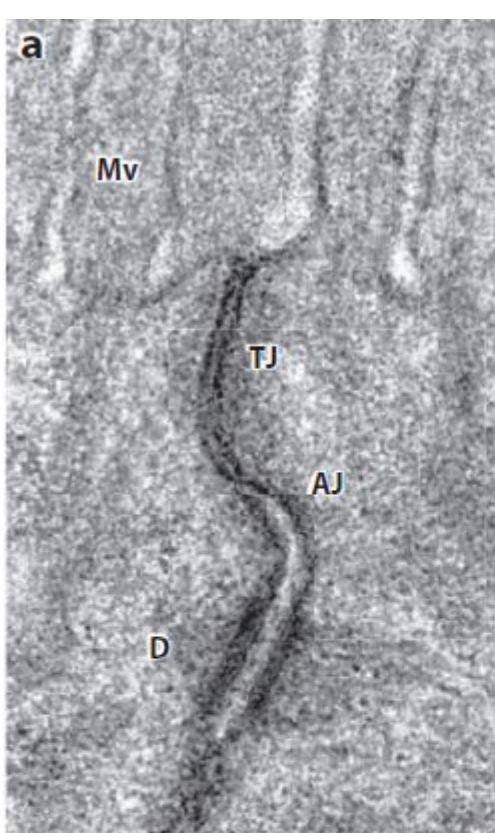
## Структура плотного контакта (tight junction)



**Schematic representation of the basic structural transmembrane components of tight junctions.** ZO-1 or ZO-2 is important for clustering of claudins and occludin, resulting in the formation of tight junctional strands. The role of the other scaffolding proteins (ZO-3/MAGI/MUP1) is less clear. The ZOs and cingulin can provide a direct link to the actin cytoskeleton. - *Journal of Investigative Dermatology* (2007) **127**, 2525–2532; doi:10.1038/sj.jid.5700865

# Tight junctions – запирающие или окклюзионные плотные контакты.

Сквозь эти запирающие швы проникают молекулы меньше 4 Ангстрем – вода и ионы



Mv –microvilly, TJ – tight junction, AJ – adhesive junction, D - desmosome

## Проницаемость плотного контакта (tight junction)

Через плотный контакт (парацеллюлярно) могут проникать только вода и ионы, размер каналов около 4-6 Ангстрем

Диаметр большинства ионов от 3 до 4 Ангстрем.

Молекула воды 2,8 Ангстрем

Пищевые субстраты – простые сахара, аминокислоты, липиды и др. – транспортируются специальными транспортными системами через клетки эпителия (трансцеллюлярно)

Изменение количества, состава, свойств белков, образующих tight junction (фосфорилирование, пальмитоилирование, комплекс с ионами Ca и др.), приводит к изменению проницаемости барьера.

### Пример:

Клаудины 1, 3, 4, 5, 8, 9, 11, 14 запирают барьер.

Клаудины 2, 7, 12, 15 формируют поры.



## Цитокины, которые повышают проницаемость плотного контакта (tight junction) между клетками эпителия

**Table 1** Cytokines and growth factors which increase intestinal TJ permeability

Cytokine and growth factor	Permeability <sup>a</sup>	Cell	Mechanism <sup>b</sup>
IFN- $\gamma$	Increase	T84	Myosin II-dependent vacuolarization, internalization of JAM-A, occludin, claudin-1 and claudin-4 [96, 97]
TNF- $\alpha$	Increase	Caco-2	ZO-1 $\downarrow$ [103]
	Increase	Caco-2	MLCK $\uparrow$ , pMLC $\uparrow$ [104, 106]
	Increase	HT29/B6	Claudin-2 $\uparrow$ [107]
TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$	Increase	Caco-2	MLCK $\uparrow$ , pMLC $\uparrow$ [109, 110]
LIGHT/IFN- $\gamma$	Increase	Caco-2	MLCK $\uparrow$ , pMLC $\uparrow$ , Caveolar endocytosis (occludin, ZO-1 and claudin-1) [111]
IL-1 $\beta$	Increase	Caco-2	Occludin $\downarrow$ [116]
	Increase	Caco-2	MLCK $\uparrow$ , pMLC $\uparrow$ [117]
IL-4	Increase	T84	Claudin-2 $\uparrow$ [121]
IL-6	Increase	Caco-2, T84	Claudin-2 $\uparrow$ [128]
IL-13	Increase	T84	Claudin-2 $\uparrow$ [142]
	Increase	HT29/B6	Claudin-2 $\uparrow$ [141]
	Increase	Caco-2	Potentiate oxidant [150]

<sup>a</sup> Permeability is based on results for TER and the paracellular passage of molecules

<sup>b</sup> Symbols  $\uparrow$  and  $\downarrow$  indicate increases and decreases in the protein or mRNA expression, respectively

## Цитокины, которые уменьшают проницаемость плотного контакта (tight junction) между клетками эпителия

**Table 2** Cytokines and growth factors which decrease and restore intestinal TJ permeability

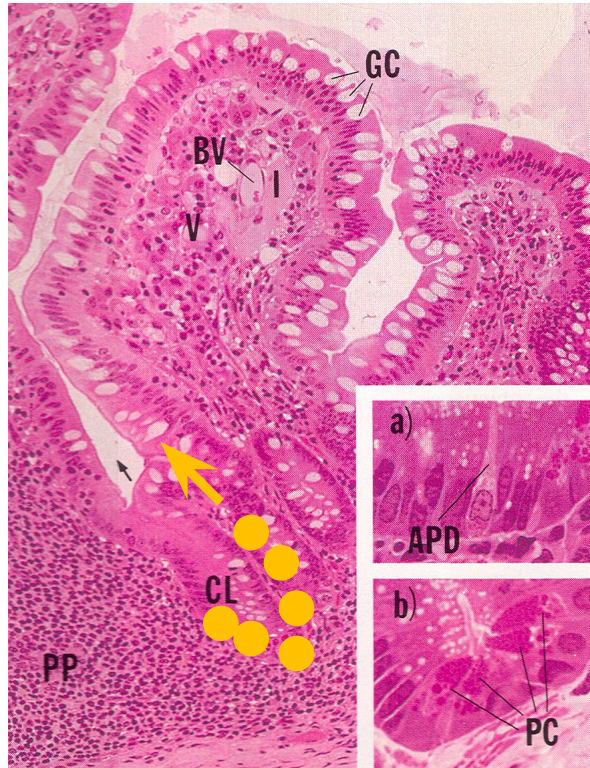
Cytokine and growth factor	Permeability <sup>a</sup>	Cell	Mechanism <sup>b</sup>
IL-10	Decrease	T84	Neutralize IFN- $\gamma$ [134]
IL-17	Decrease	T84	Claudin-1 $\uparrow$ , Claudin-2 $\uparrow$ [146]
TGF- $\alpha$ antibody	Decrease	Caco-2	Neutralize hydrogen peroxide [149]
TGF- $\beta$	Decrease	T84	Claudin-1 $\uparrow$ [151]
	Decrease	HT29/ B6	Claudin-4 $\uparrow$ [152]
	Decrease	T84	Neutralize EHEC, restoration of occludin, claudin-2 and ZO-1 expression [151]
	Decrease	T84	Neutralize IFN- $\gamma$ [152]
	Decrease	T84	Neutralize cryptosporidium parvum [153]
EGF	Decrease	Caco-2	Neutralize hydrogen peroxide, restoration of occludin and ZO-1 distribution [155]
	Decrease	Caco-2	Neutralize hydrogen peroxide, restoration of actin cytoskeleton assembly [157, 292]
	Decrease	Caco-2	Neutralize ethanol, restoration of microtubule assembly and oxidation/nitration of tubulin [158]
	Decrease	Caco-2	Neutralize acetaldehyde, restoration of occludin and ZO-1 distribution [42, 159]

<sup>a</sup> Permeability is based on results for TER and the paracellular passage of molecules

<sup>b</sup> Symbols  $\uparrow$  and  $\downarrow$  indicate increases and decreases in the protein or mRNA expression, respectively

**Границы постоянно обновляются**

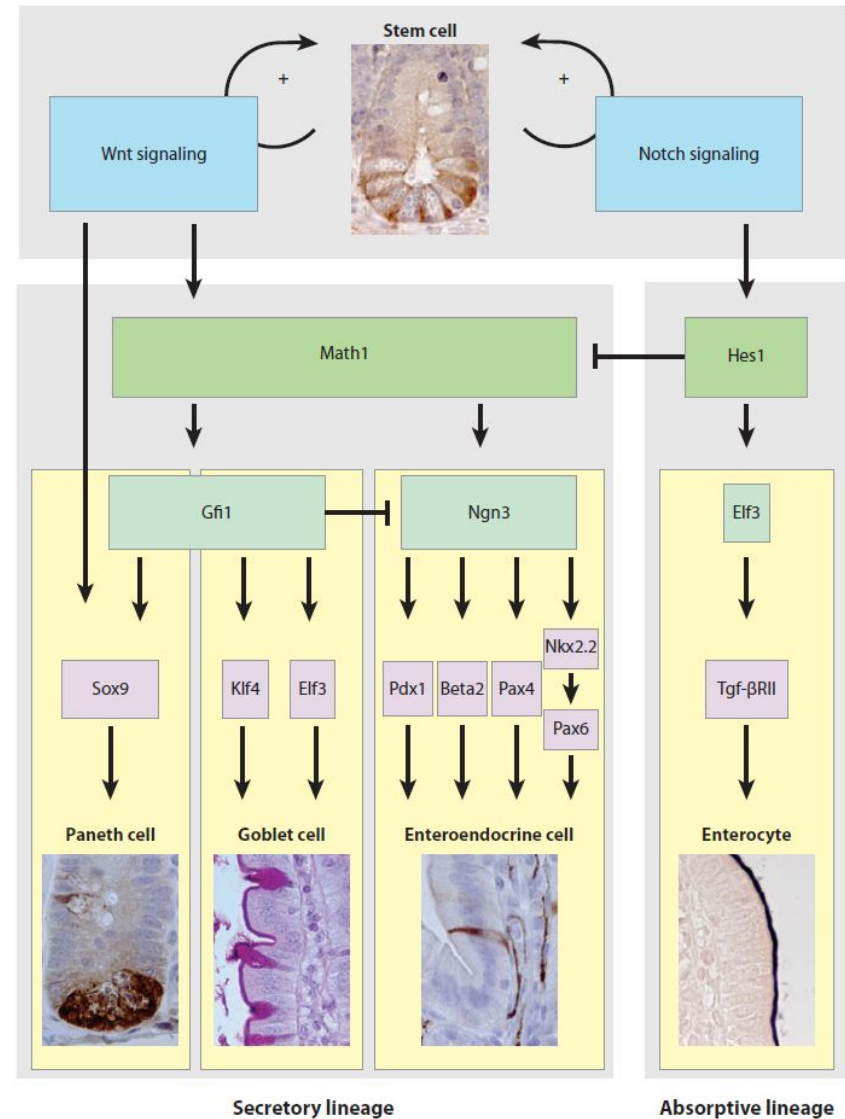
Обновление эпителия кишечника происходит за 5-6 дней.  
 За это время происходит замена 100 млрд. клеток (у человека).  
 В течение жизни этот процесс создает  $6 \times 10^{14}$  клеток



В глубине крипт вновь возникающие клетки  
 встраиваются в эпителий, оттесняя кверху  
 другие клетки эпителия.

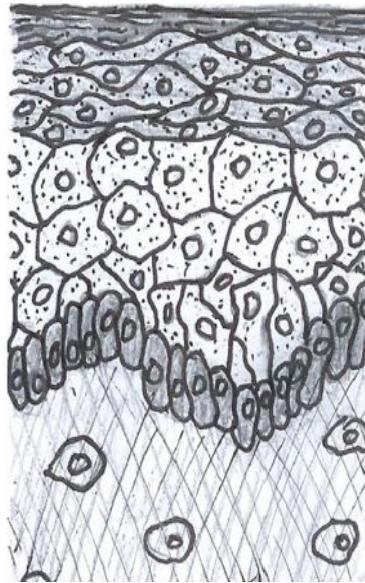
На самом верху на апикальной части,  
 умирающие клетки эпителия сбрасываются.

Из стволовых клеток образуются все типы  
 клеток эпителия кишечника



## Эпидермис тоже постоянно обновляется

Рогово  
й  
Гранулярн  
ый  
  
Шиповаты  
й  
  
Базальны  
й



Базальный слой размножается, сдвигаясь кверху, дифференцируется, умирает, встраивается в щиты рогового слоя.

Вновь образующиеся клетки движутся 2 недели из базального слоя в гранулярный слой.

Еще 4 недели они пересекают роговой слой, пока не окажутся на самой поверхности и не будут сброшены. На полную замену эпидермиса уходит 48 дней.

Эпителий дыхательных путей обменивается медленно (~ 200 дней). Альвеоциты 2 типа образуют все типы клеток альвеол, а клетки Клара (Clara cells) в бронхиолах размножаются и дифференцируются в клетки реснитчатого эпителия и в бокаловидные клетки бронхов. Скорость возобновления эпителия дыхательных путей резко возрастает после его повреждения.



Обведены овалами светящиеся (размножающиеся) клетки Клара

**Границы тонкие, прочные, гибкие  
самообновляющиеся**



**Долговечные**



## Граница долговечная (выносливость)

Легкие – 750 000 000 вдохов-выдохов, 1 млрд . литров (= 5 объемов Биофака): воздух, пыль, дым, благо- и зловония, от холодного до горячего разница 50°С, и никогда не происходит даже мельчайших разрывов и трещин.

Кишечник – за 70 лет через кишечник проталкивается 30 тонн пищи. Там и косточки, и комки, и песчинки, там и едкие жидкости, там и огромное количество микробов. Этой границе все нипочем. При вскрытии она, как новенькая: блестящая, гибкая, эластичная, ни трещинки, ни потертости. За все это время ни прокола, ни разрыва.

Кожа – как минимум, 50 лет остается гладкой, как новенькая, потом начинает слегка морщиниться. А представьте кожаный портфель или куртку, которую Вы носите, не снимая 24 часа в сутки в течение 20-30 лет!!

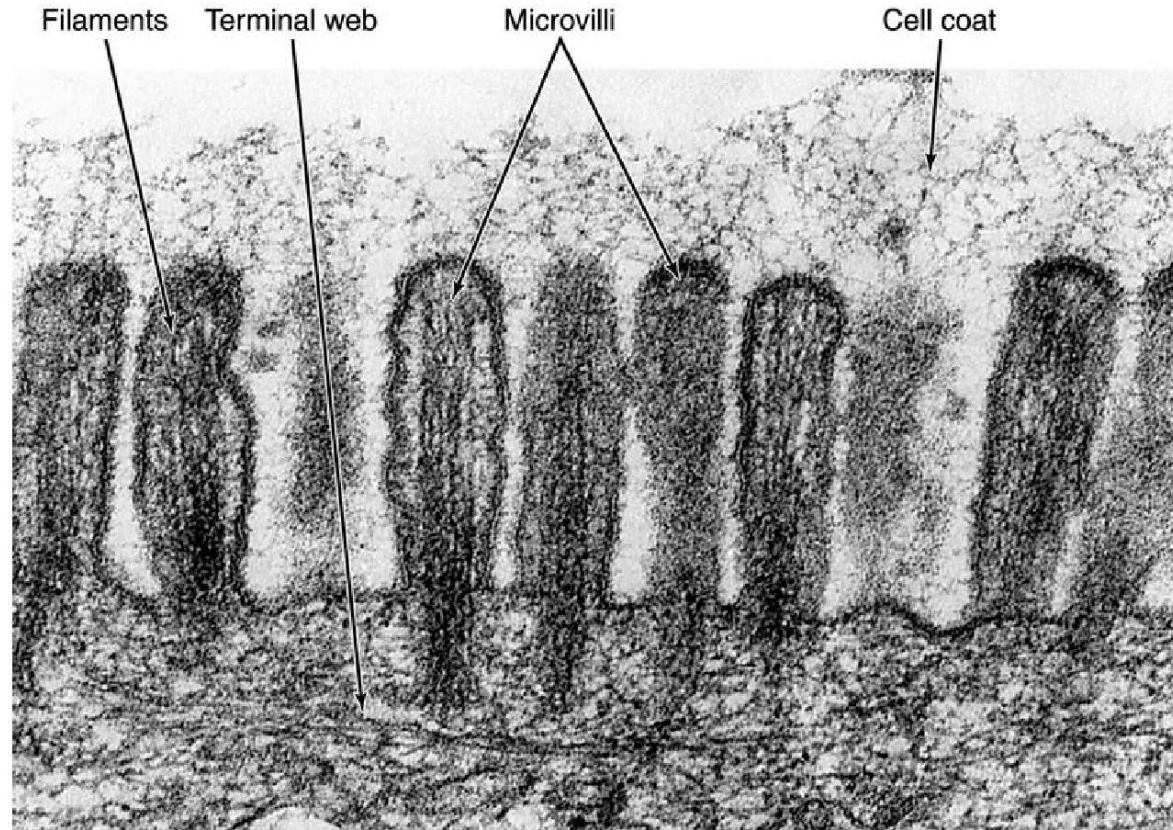


**Защита границы за пределами нашего организма  
(гликокаликс, слизь)**

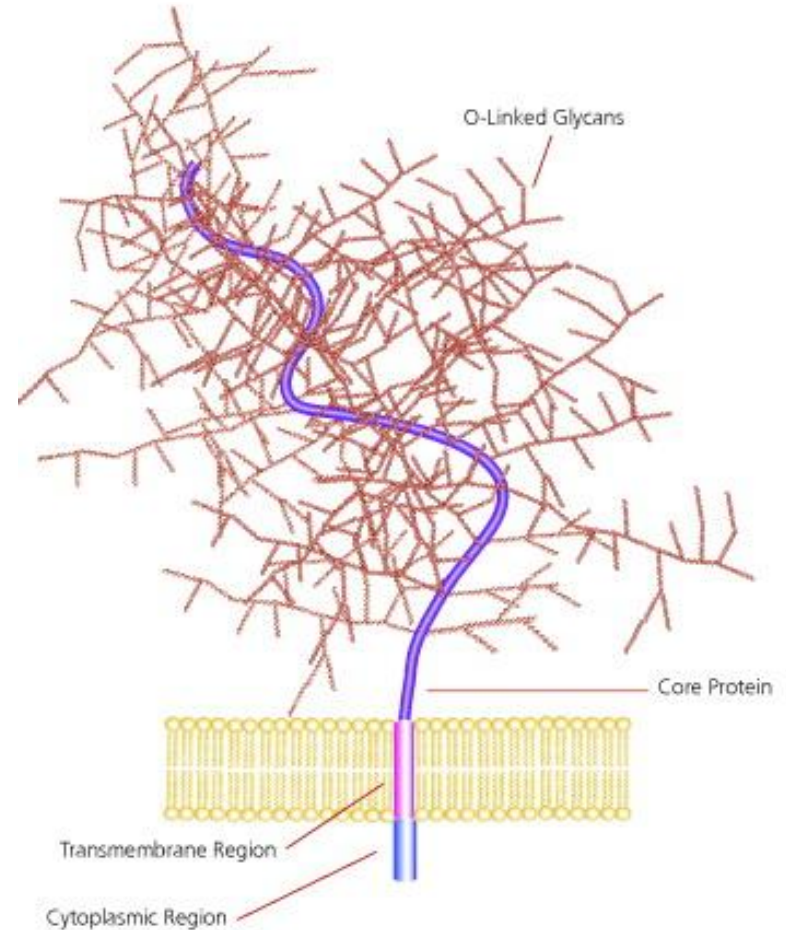


Поверхность эпителия густо покрыта мембранными молекулами гликоконъюгатов – молекул с большим содержанием олигосахаридных цепочек

Гликокаликс  
~50-100 нм



Встроенный в клеточные мембраны муцин – основной элемент гликокаликса – создает преграду, трудно преодолимую для любых частиц, в том числе, микробов



## Бокаловидные клетки эпителия производят много слизи



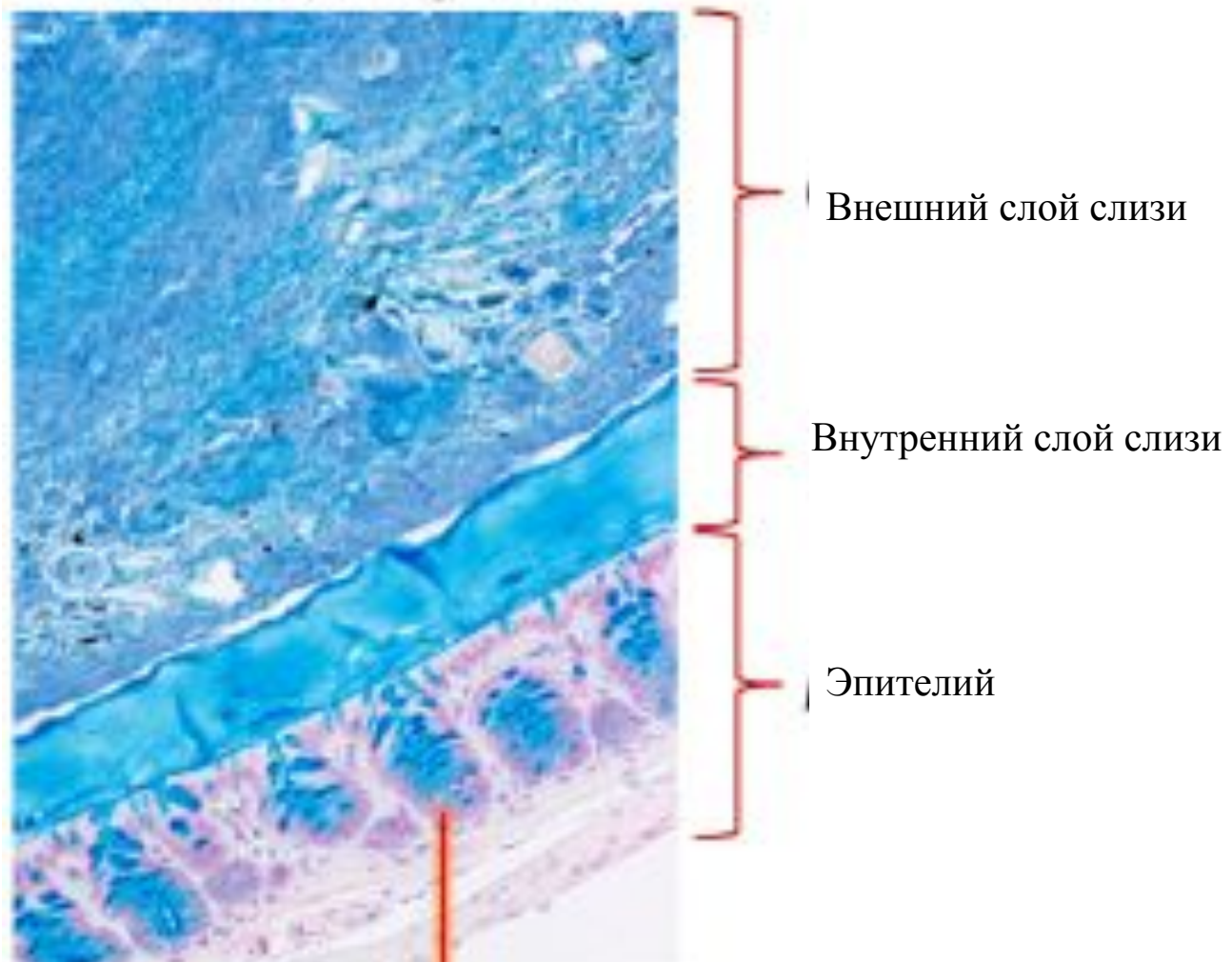


Слизь вырабатывается непрерывно и в больших количествах

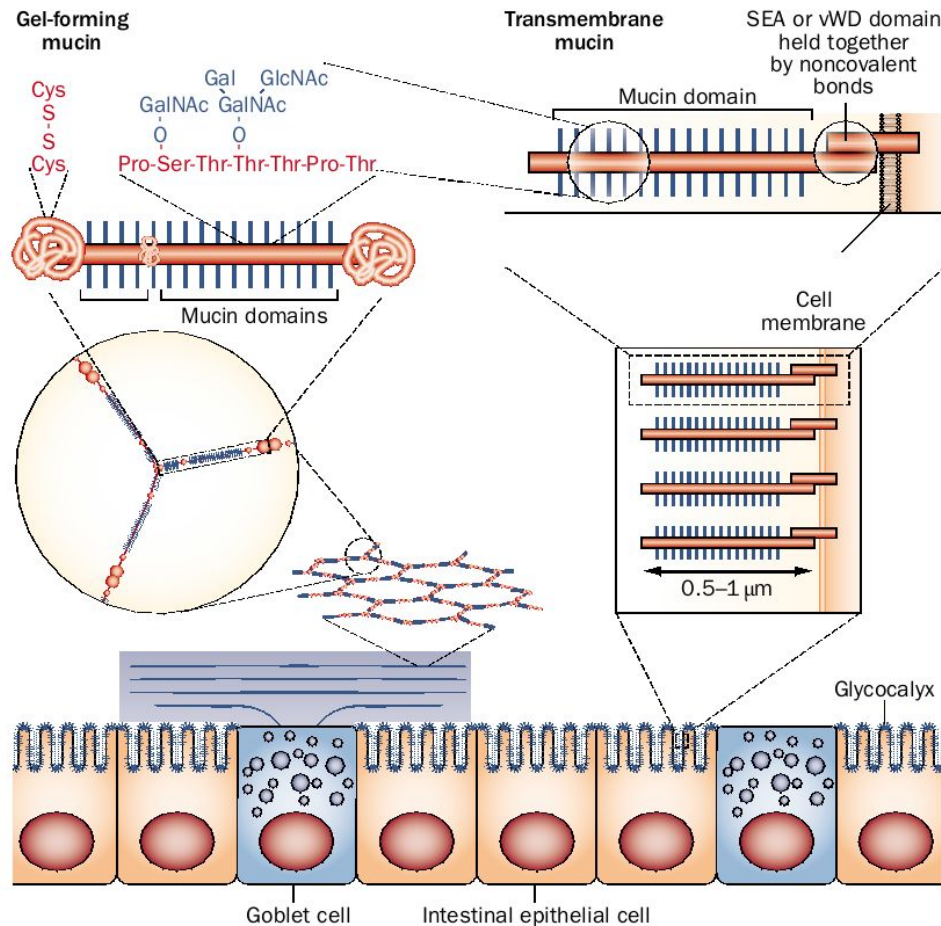
В ЖКТ взрослого человека ежедневно производится порядка 1 литра слизи,  
за год – 360 литров! В течение жизни – 25 тонн!!



Слизь образует гель. Вблизи эпителия – плотный и вязкий,  
подальше от эпителия - рыхлый

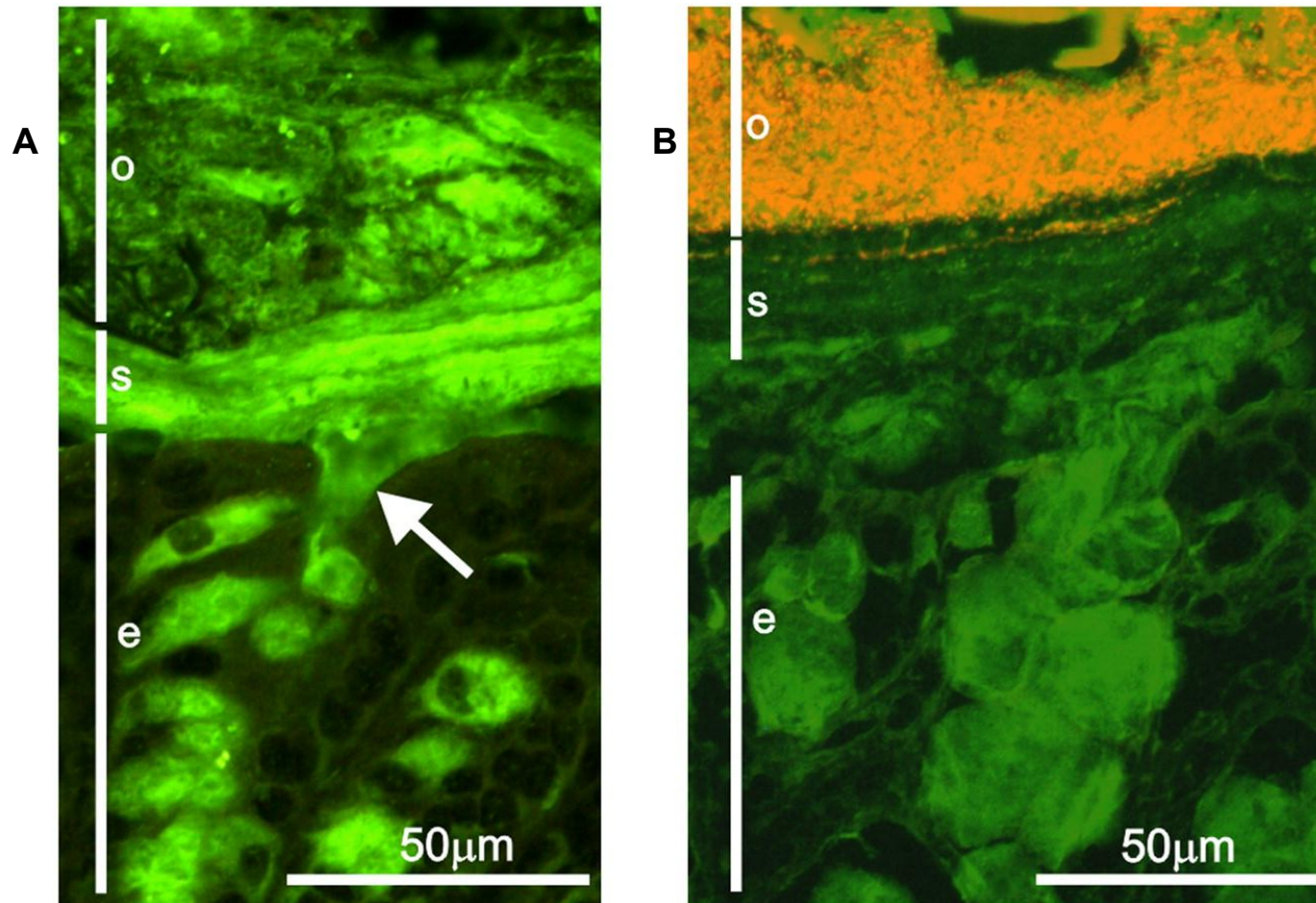


# Строение мембранного и гелеобразного муцина



**Figure 1** | Simplified model of a gel-forming mucin produced by goblet cells and transmembrane mucins attached to the apical membrane of enterocytes. Left: the MUC2 mucin polymer is packed in the granulae of the goblet cells and during secretion expands to form flat ring-like structures that stack under each other. The enlarged ring shows the oligomeric nature of the MUC2 polymer, and above the MUC2 monomer is shown with its central mucin domains and exemplified O-glycans. The MUC2 N-termini and C-termini are held together with numerous disulphide bonds. Right: the apical side of the intestinal enterocytes are covered by a glycocalyx made up of mucins that are anchored in the cell membrane. The long and extended mucin domains make up the glycocalyx. The cleaved and associated SEA and vWD domains are indicated as well as the mucin domain. Abbreviations: SEA, sea urchin-enterokinase-agrin domain; vWD, von Willebrand domain.

**Муцин образует плотный слой (S – stratified) слизи толщиной 50 мкм вблизи поверхности эпителия толстой кишки, и еще 150 мкм более рыхлой слизи над этим слоем**



Слизь в бокаловидных клетках и в просвете толстой кишки - зеленая, микробы в просвете кишечника – оранжевые.



Толщина слоя слизи в разных отделах ЖКТ варьирует от 150 до 800 мкм

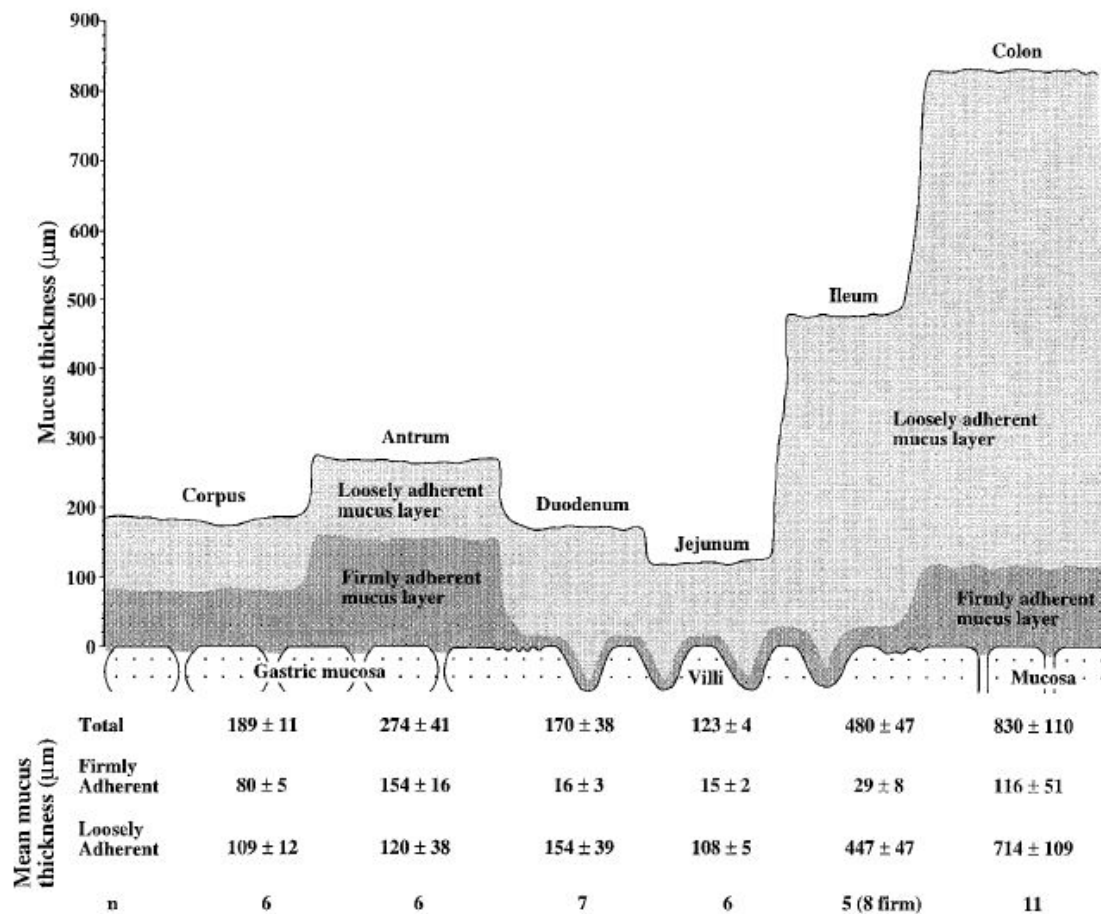


Fig. 1. A schematic figure showing the thicknesses of the 2 mucus gel layers in vivo in the corpus, antrum, midduodenum, proximal jejunum, distal ileum, and proximal colon of the rat gastrointestinal tract. The mucus gel layer was continuous and did not follow the contours of the villi in the intestine. However, on removal of the loosely adherent layer, mucus was also removed between the villi, leaving behind a firmly adherent mucus layer attached to the mucosa. In the stomach and colon, the firmly adherent layer was continuous, but in the small intestine the firmly adherent layer had a patchy distribution and was absent on individual villi. Both mucus gel layers were translucent. The loosely adherent mucus layer was removable by careful suction, whereas the firmly adherent mucus layer was not. The table presents values for mucus thickness as means ± SE for each group.

# Серьезная преграда для микробов

1 мкм



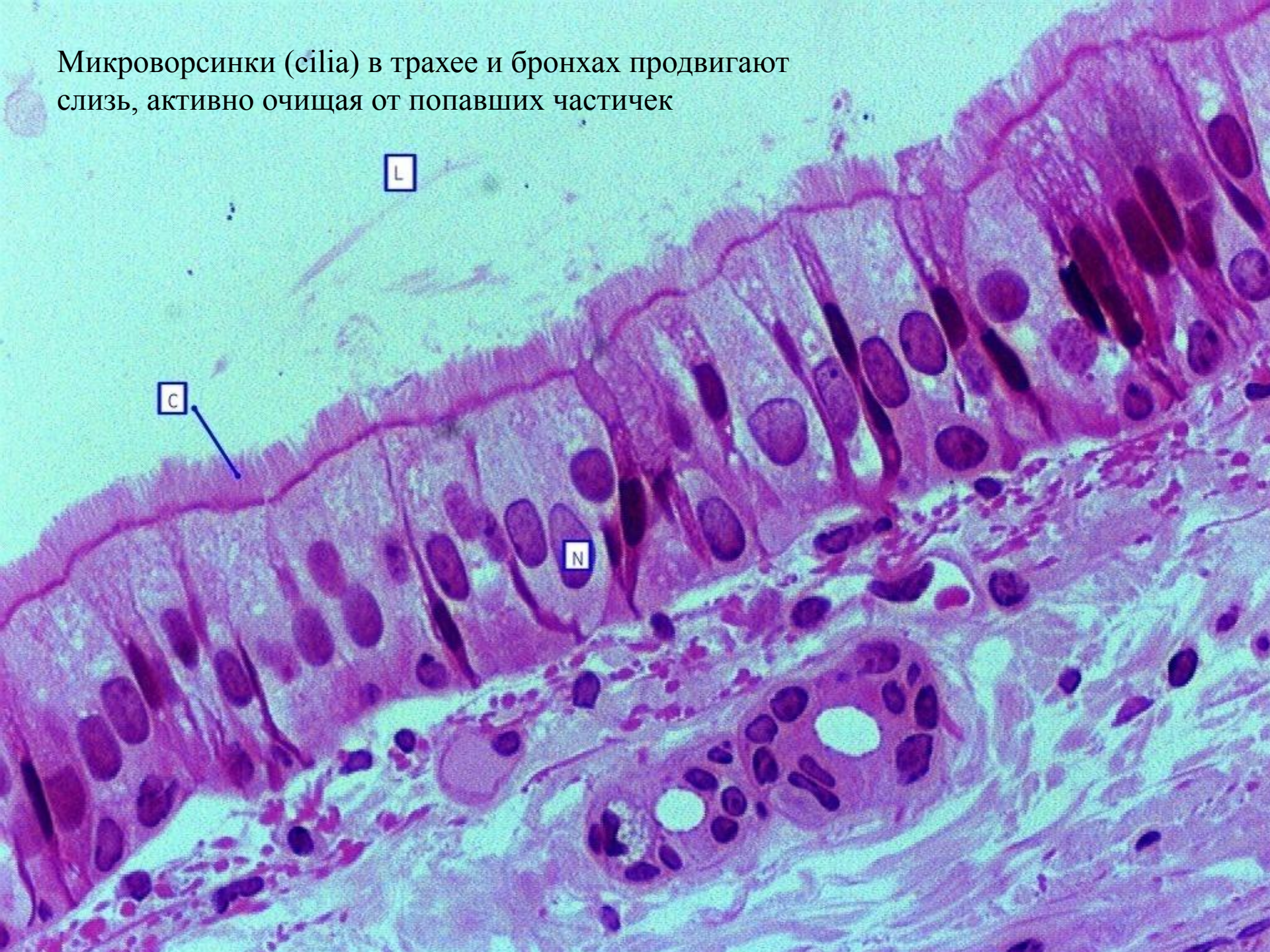
50-100 мкм

Эпителий

На поверхности эпителия дыхательных путей тоже вырабатывается слизь.  
Клетки эпителия имеют подвижные реснички, чтобы двигать эту слизь



Микроворсинки (cilia) в трахее и бронхах продвигают слизь, активно очищая от попавших частичек

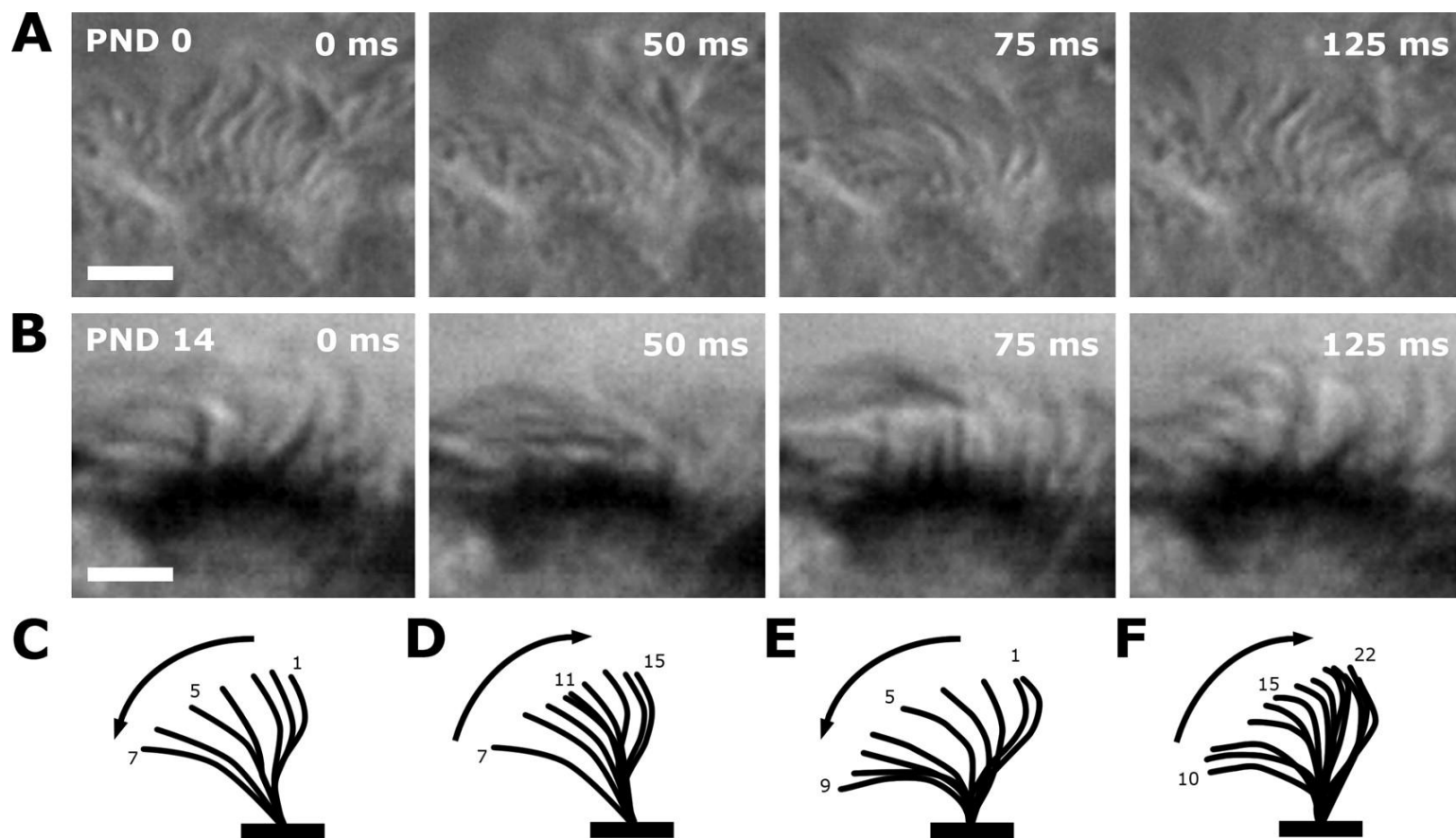


## Реснички (cilia) эпителия терминального бронха



Lung lining. Color-enhanced scanning electron micrograph (SEM) of a section through epithelial cells of the terminal bronchus (lung airway). Some of the cells are covered in cilia, tiny microscopic hairs. Rhythmic movements of the cilia serve to move mucus and trapped particles away from the gas-exchanging parts of the lung, and towards the throat, where they can be expelled. Magnification: x10,000 when printed at 10 cm wide.

## Волнообразные движения ресничек в трахее мыши



Каждая ресничка движется в одной плоскости – туда и обратно  $12 \pm 1$  Hz  
Отклонение от плоскости –  $3^\circ$

Граница, ядовитая для врагов



В нашем организме производится около сотни эндогенных антибиотиков.  
Они эффективны против бактерий, грибов, вирусов.

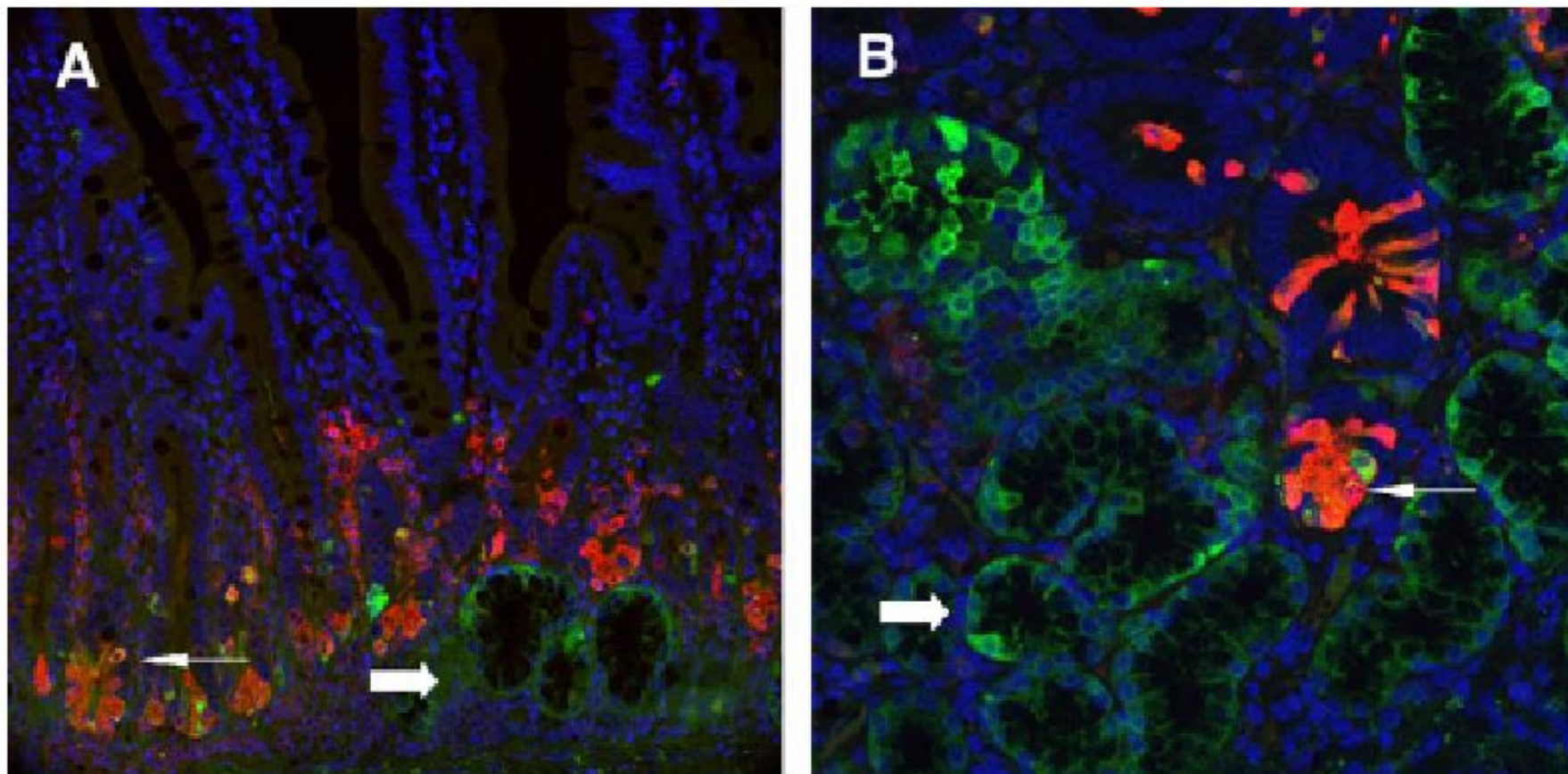
Границы тела с внешним миром вооружены антибиотиками более других тканей.



**Эндогенные антибиотики –  
защитные вещества белковой и пептидной природы:**

- дефенсины
  - кателицидины
    - гистатины
  - лактоферрин
    - лизоцим
    - псориазин
    - дермцидин
- и многие другие...

## Продукция альфа-дефенсина в стенке тонкой кишки здорового человека

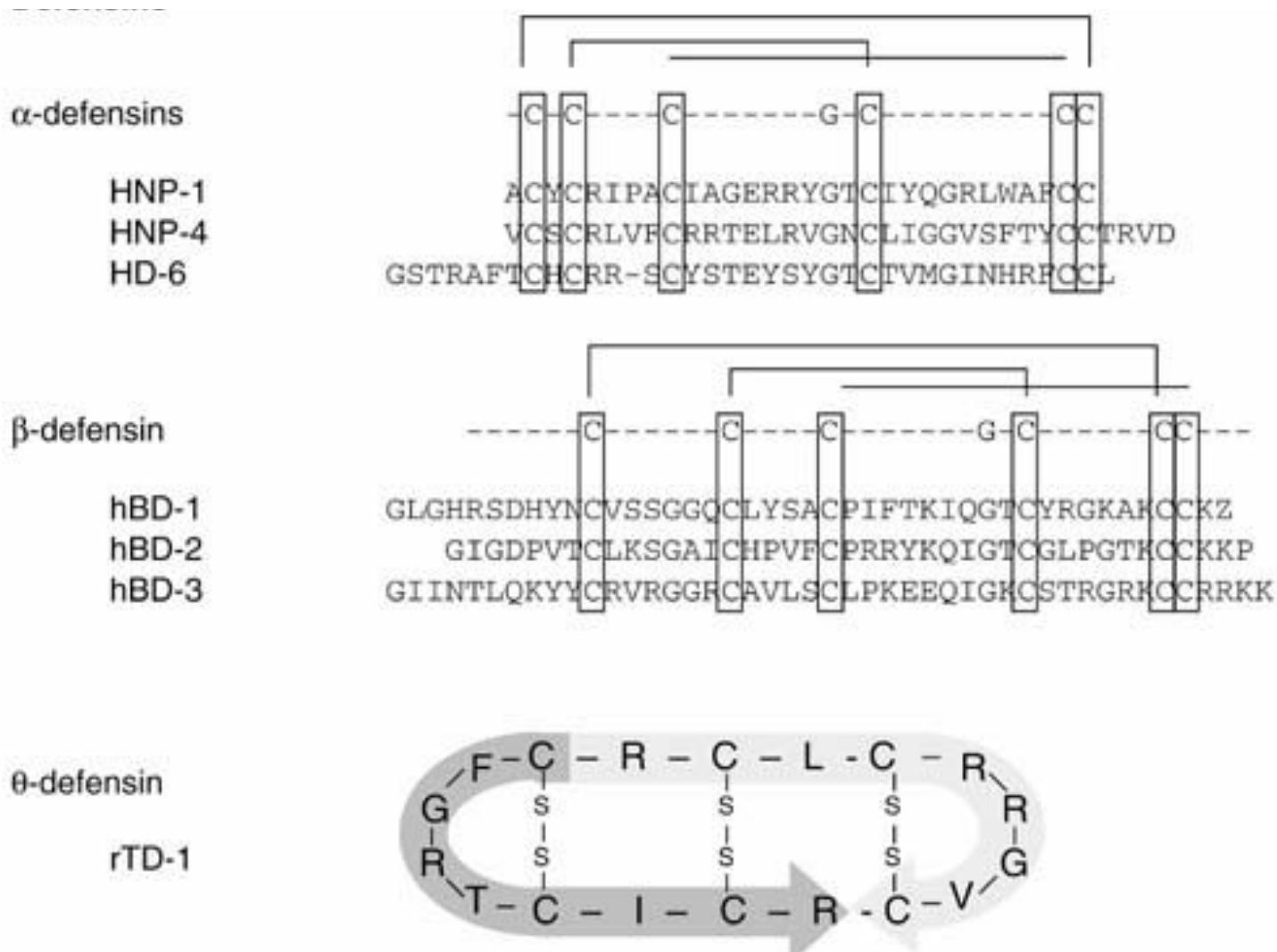


Дефенсин- $\alpha 5$  (красный) и лизоцим (зеленый) в слизистой кишки.

Широкие стрелки указывают клетки, в которых обнаруживается только лизоцим.

Узкие стрелки – клетки Панета, в которых дефенсин- $\alpha 5$  и лизоцим.

**Дефенсины – это катионные полипептиды, в которых 6 остатков цистеинов образуют 3 дисульфидные связи**



## Разнообразие

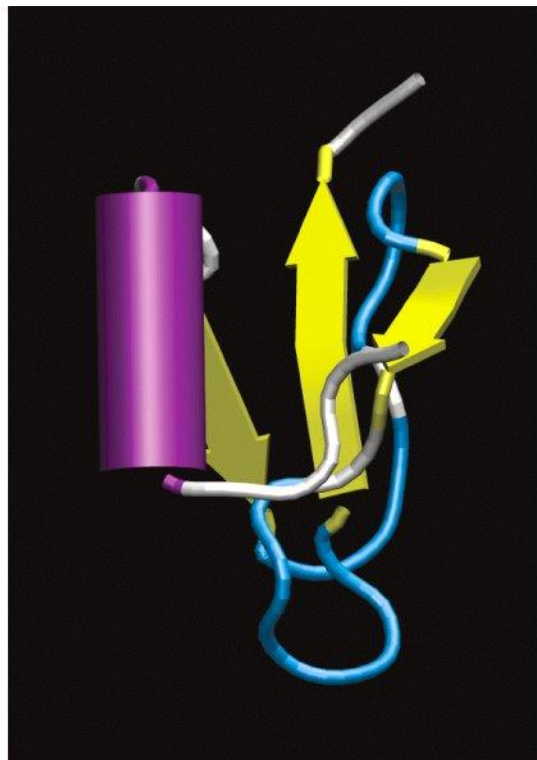
### дефенсинов

Type	Gene Name	Protein Name	Description
$\alpha$ -defensin	Defensin, alpha 1	Neutrophil defensin 1	Are expressed primarily in neutrophils as well as in NK cells and certain T-lymphocyte subsets. DEFA5 and DEFA6 are expressed in Paneth cells of the small intestine, where they may regulate and maintain microbial balance in the intestinal lumen.
	Defensin, alpha 1B	Defensin, alpha 1	
	Defensin, alpha 3, neutrophil-specific	Neutrophil defensin 3	
	Defensin, alpha 4, corticostatin	Neutrophil defensin 4	
	Defensin, alpha 5, Paneth cell-specific	Defensin-5	
	Defensin, alpha 6, Paneth cell-specific	Defensin-6	
$\beta$ -defensin	Defensin, beta 1	Beta-defensin 1	Are the most widely distributed, being secreted by leukocytes and epithelial cells of many kinds. For example, they can be found on the tongue, skin, cornea, salivary glands, kidneys, esophagus, and respiratory tract. It has been suggested (but also challenged) that some of the pathology of cystic fibrosis arises from the inhibition of $\beta$ -defensin activity on the epithelial surfaces of the lungs and trachea due to higher salt content
	Defensin, beta 2	Beta-defensin 2	
	Defensin, beta 103B	Beta-defensin 103	
	...	...	
	Defensin, beta 107A	Beta-defensin 107	
	Defensin, beta 110	Beta-defensin 110	
	...	...	
Defensin, beta 136	Beta-defensin 136		
$\Theta$ -defensin	Defensin, theta 1 pseudogene	not expressed in humans	Are rare, and thus far have been found only in the leukocytes of the rhesus macaque and the olive baboon, <i>Papio anubis</i> , being vestigial in humans and other primates

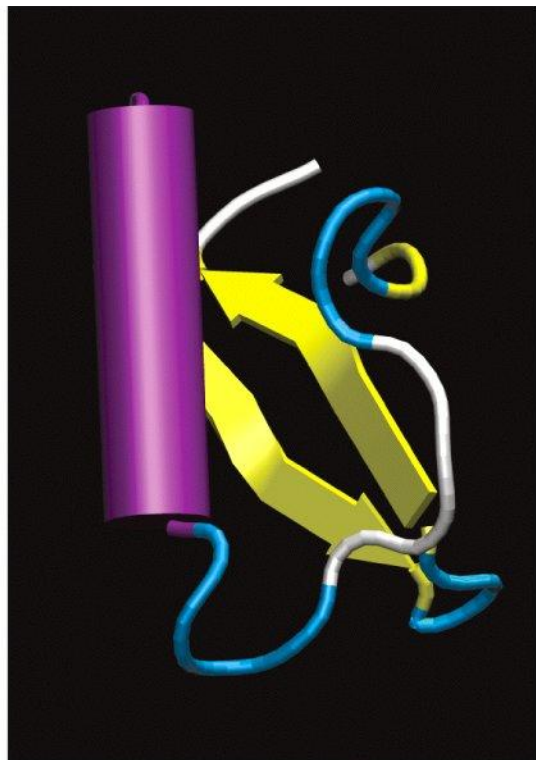
# Дефенсин



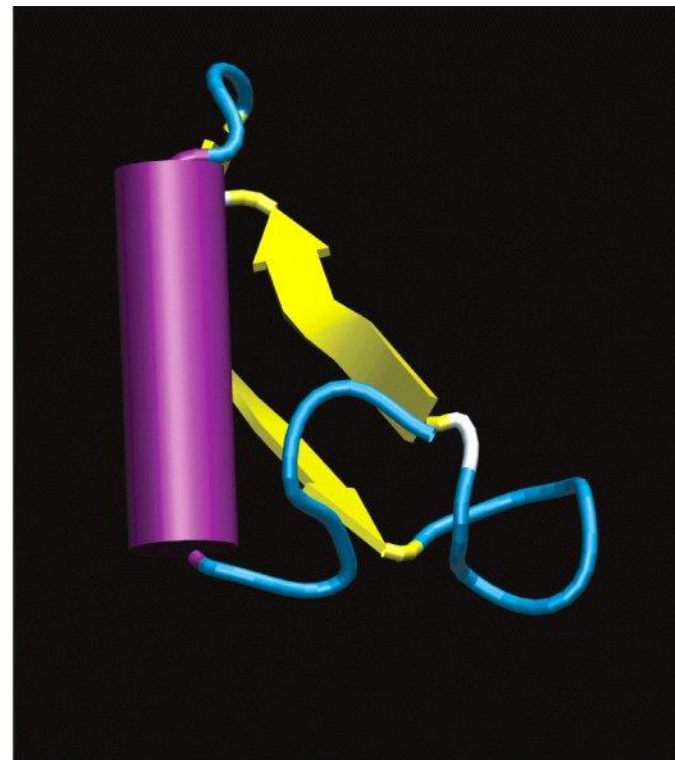
## Родственные дефенсины растений, насекомых и человека



AFP-1



дрозомицин



$\beta_2$ -дефенсин

## Известные механизмы действия дефенсинов на микробную клетку:

1. Образование ионных каналов и водных пор в липидных мембранах микроба.
2. Разрушение липидных мембран микроба.
3. Образование комплекса с микробными ДНК и РНК, и нарушение их функционирования

# Дефенсин образует зависящие от потенциала $K^+$ каналы в мембране бактерии

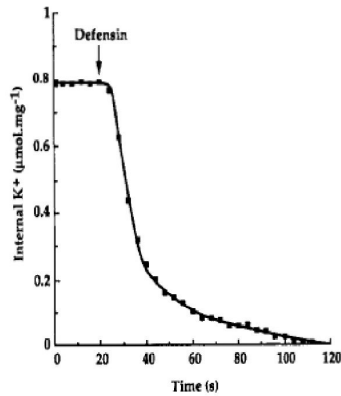


FIG. 1.  $K^+$  efflux induced by defensin. Logarithmic phase *M. luteus* cells were resuspended in 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7.8, at 37 °C (3 ml, 0.63 mg of cells, dry weight/ml). The cells were energized by addition of 0.2% glucose and 0.5 mM KCl. Defensin (2.2 µg/mg of cells, dry weight) was added at 20 s. The initial rate of the  $K^+$  efflux was measured in the linear part of the efflux curve.

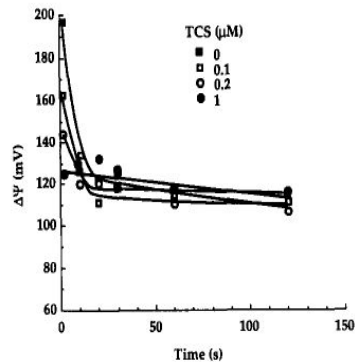


FIG. 6. Membrane potential changes induced by defensin. Cells (0.63 mg of cells, dry weight/ml) were incubated at 37 °C in 10 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7.8, containing 0.2% glucose and 0.5 mM KCl. [<sup>3</sup>H]TPP<sup>+</sup> (10 µM, 2.17 GBq/mmol) was added 5 min before addition of various concentrations of TCS: 0.1 µM (□), 0.2 µM (○), and 1 µM (●). In the control (■), no TCS was added. Three min after, defensin (2.2 µg/mg of cells, dry weight) was added. [<sup>3</sup>H]TPP<sup>+</sup> uptake by the cells was measured at different time intervals using the filtration method. ΔΨ values were calculated taking into account a cytoplasmic volume of 1.6 µl/mg of cells, dry weight.

15 pA  
1 s

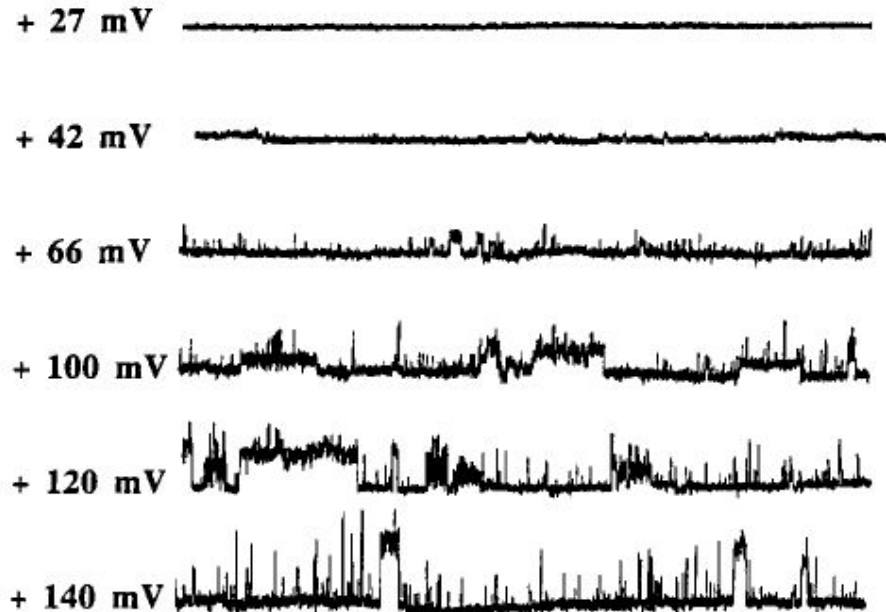
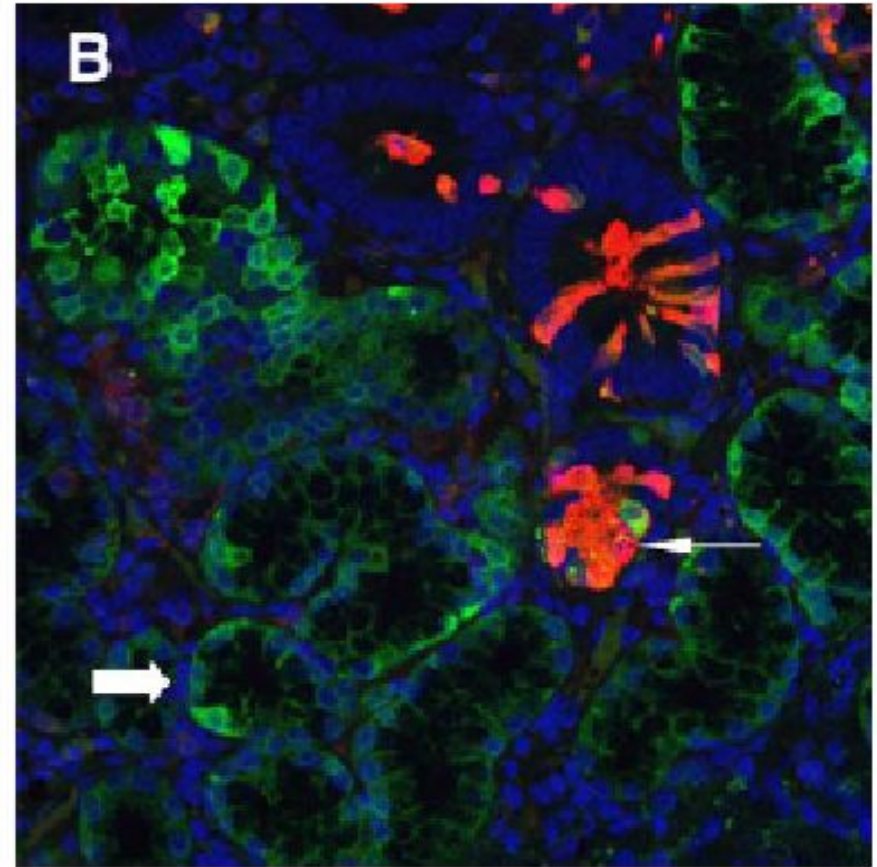
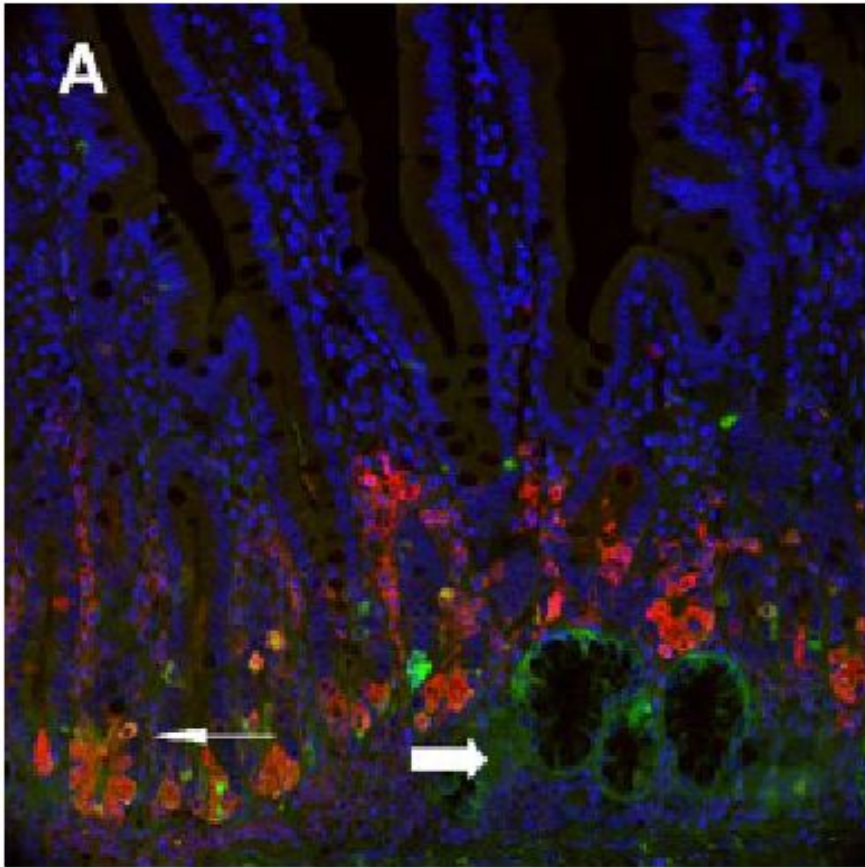
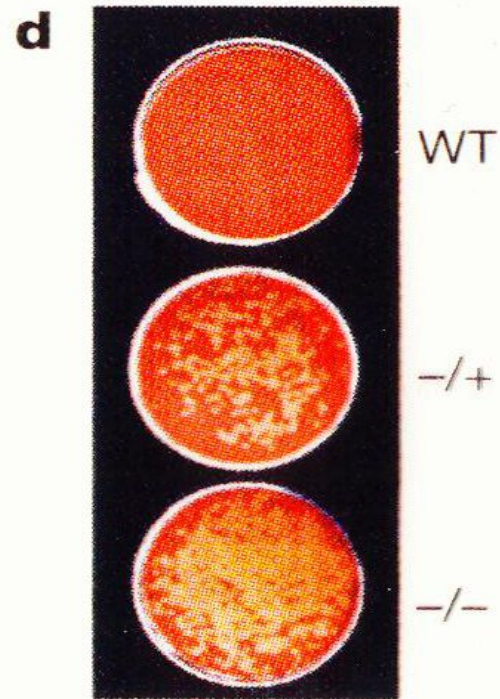
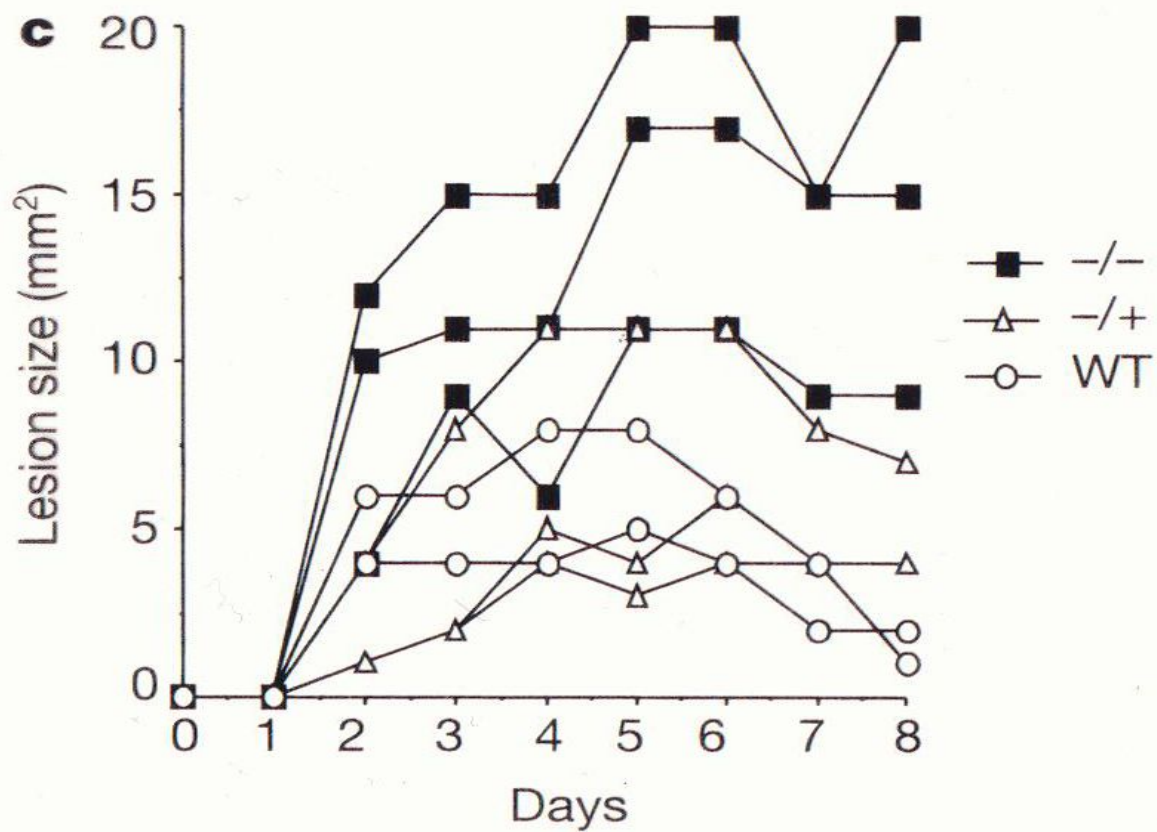
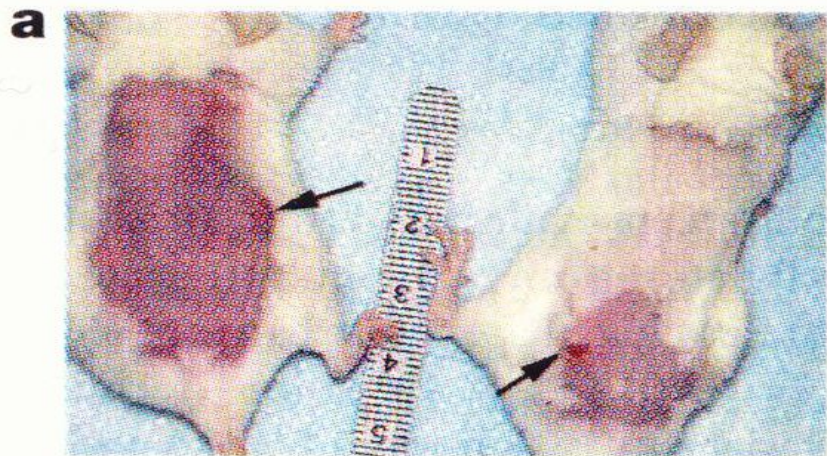


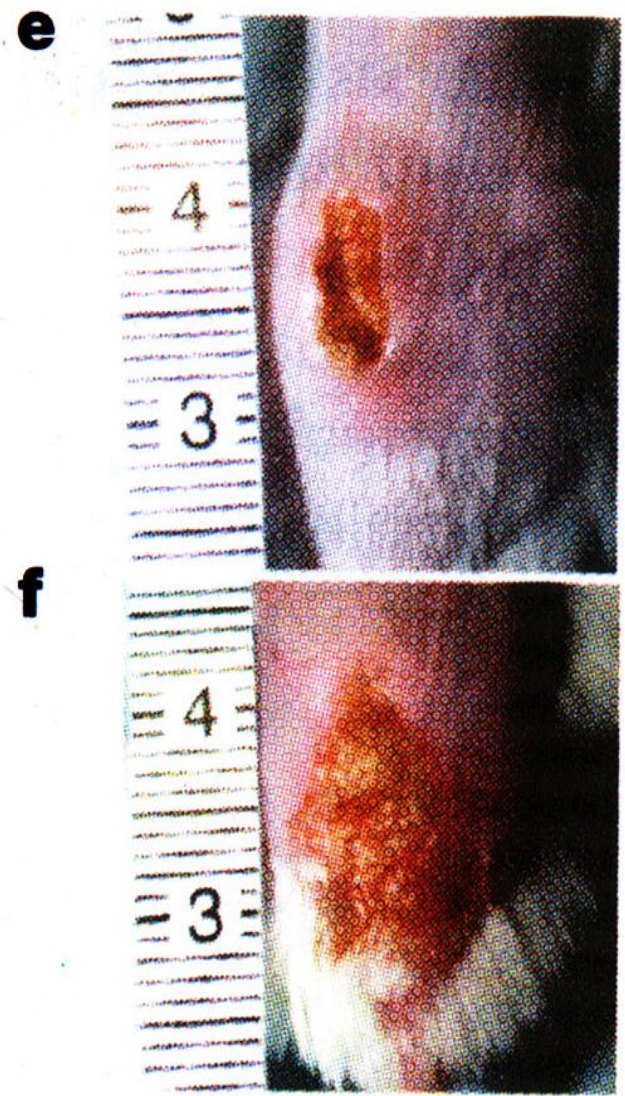
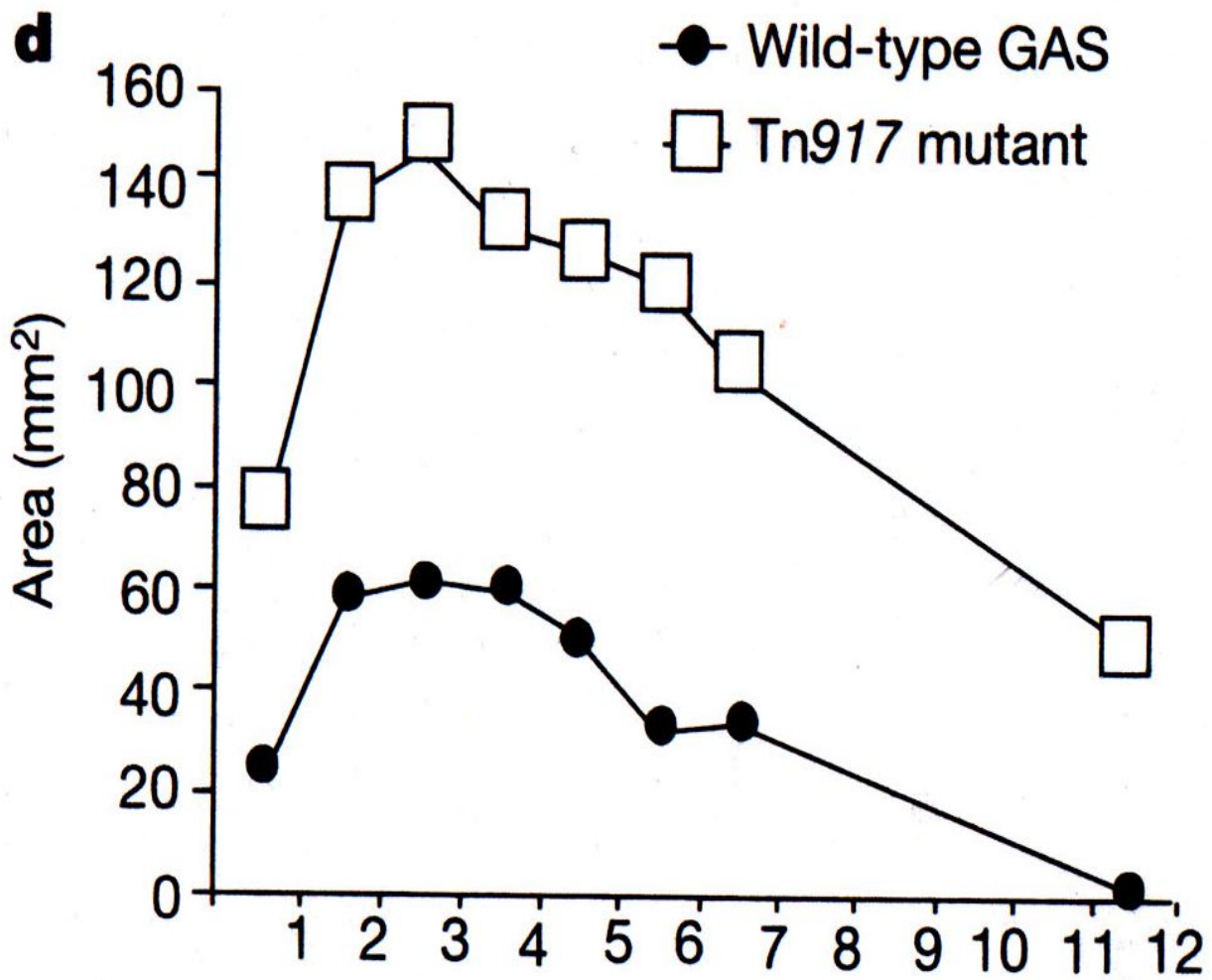
FIG. 8. Single-channel currents induced by defensin. Representative traces were obtained for different values of ΔΨ in a patch-clamp experiment performed on giant liposomes into which the peptide had been incorporated (10 µg of peptide/1 mg of lipid). The potential in the pipette served as reference. Bath medium contained 10 mM Hepes/KOH adjusted to pH 7.8 and 50 mM KCl. Pipette medium contained bath medium plus 0.4 mM CaCl<sub>2</sub>. Opening of channels corresponds to downward current deflections at negative potentials and upward current deflections at positive potentials. Note the heterogeneity both in conductance sizes and in opening and closing durations.





Дефенсин- $\alpha 5$  (красный) в слизистой двенадцатиперстной кишки.  
Узкие стрелки указывают клетки Панета, в которых обнаруживается дефенсин.





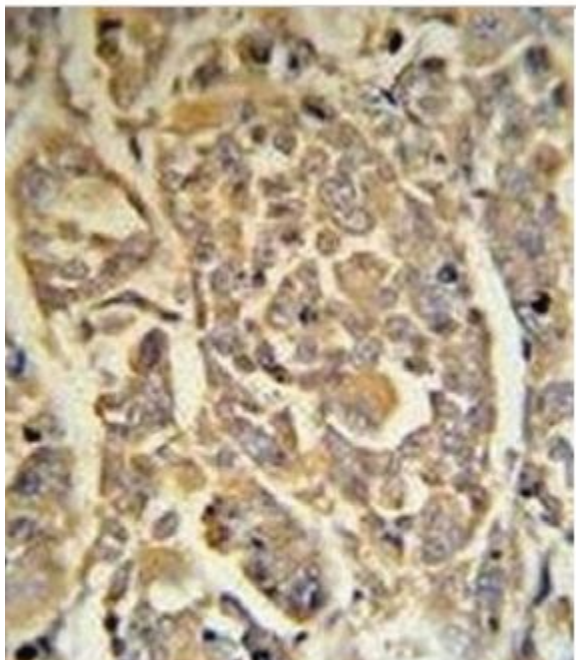
## Дермцидин

антимикробный полипептид, постоянно секретируется потовыми железами человека. Убивает Гр- и Гр+ бактерии и некоторые грибы

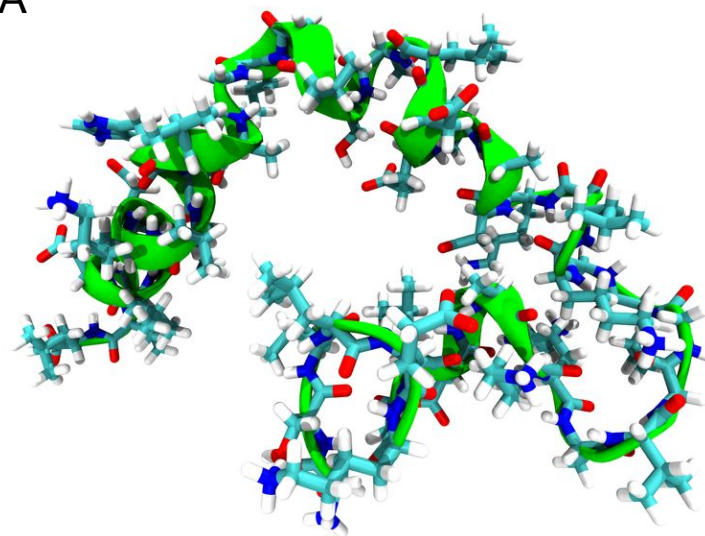
**DCD-1L** SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGAVHDVKDVLDSVL

**DCD-1** SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGAVHDVKDVLDSV

**SSL25** SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDA



Кожа человека, окрашена антителом к дермцидину (пероксидаза, DAB)



Human Dermcidin, 3D structure

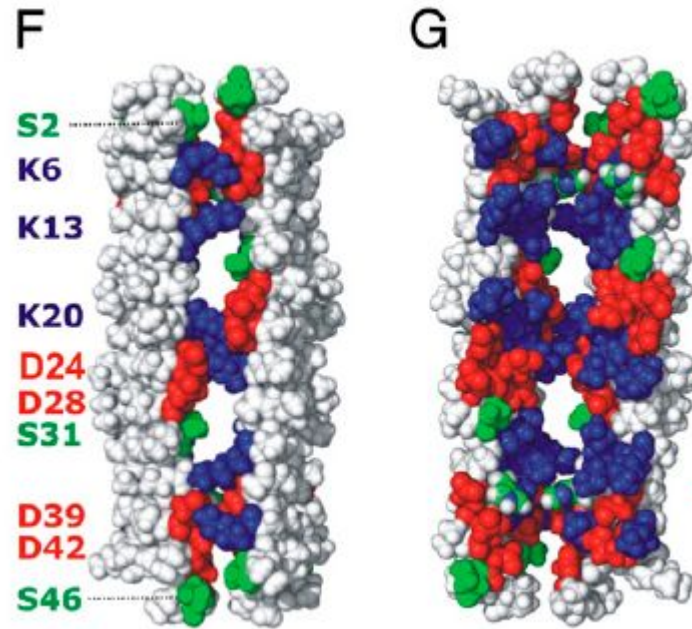
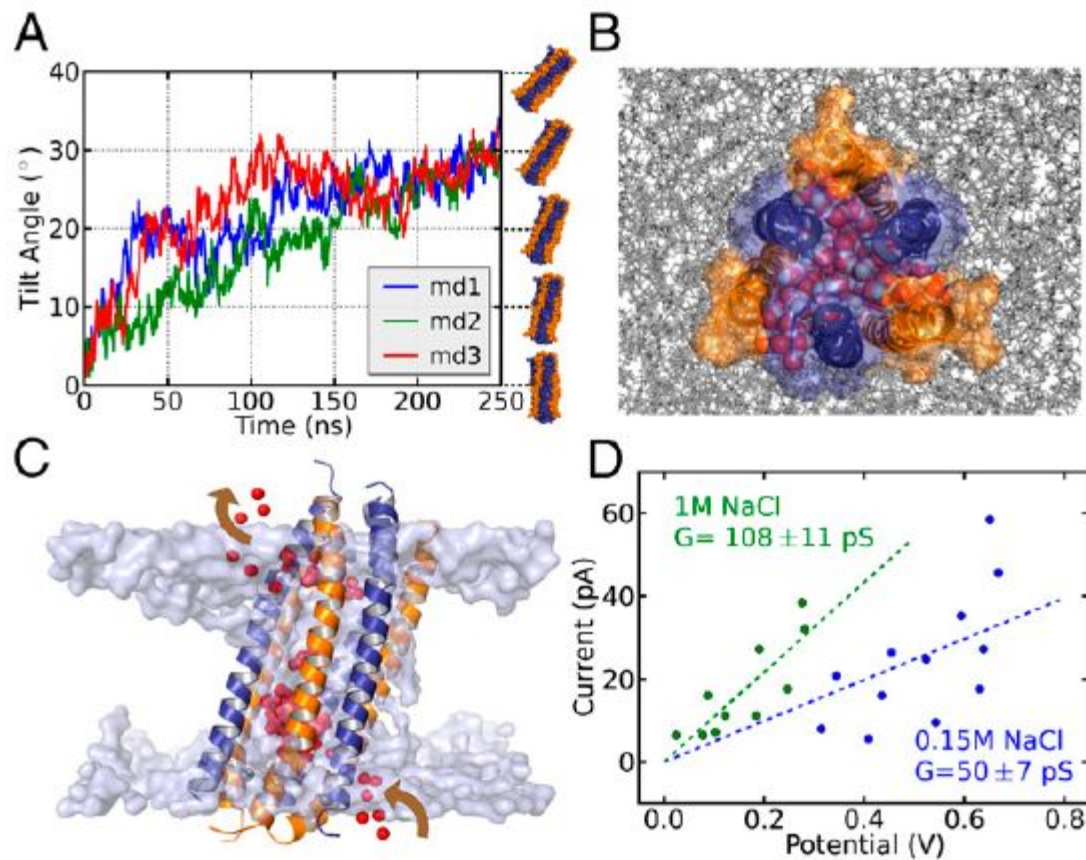
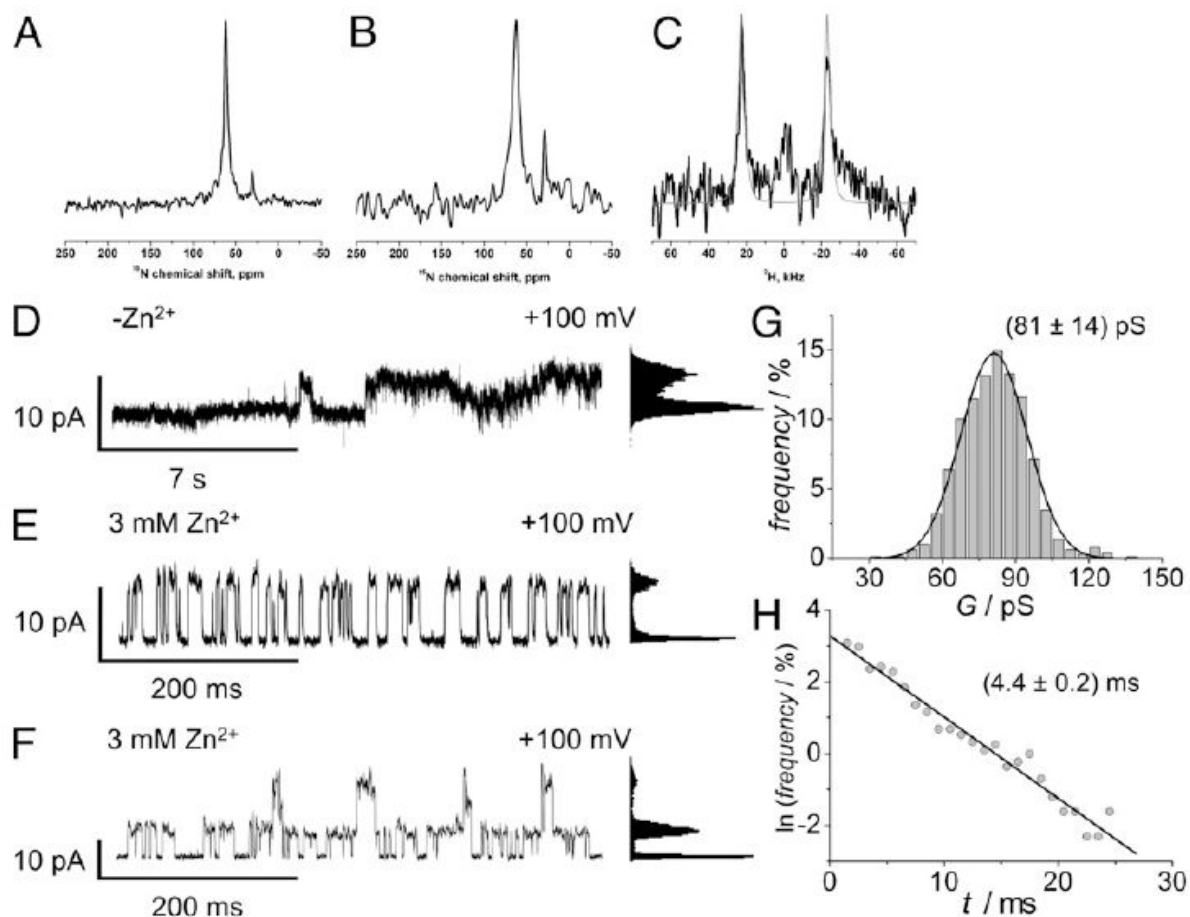


Fig. 1. Crystal structure and surface characteristics of the human dermcidin channel. (A) X-ray structure of the hexameric DCD channel shown in cartoon representation from the side and top (*Middle* and *Right*), and as surface representation (*Left*). The different orientations of the individual peptides relative to the membrane normal are marked in orange and dark blue, and termini are marked (NT, N terminus; CT, C terminus). Arrows combined with tilt angle and axes give the relative orientation. Residues involved in Zn binding are shown in stick representation and Zn ions are marked in gray. The symmetry axis of the channel is marked with C2 (for the side view) and C3 (for the top view). Two interfaces of different surface area are formed after trimerization and named IF1 and IF2. (B) Close-up into the Zn-binding site S1. Four residues (Glu5 and Asp11 from one peptide and Asp41 and His38 from the second) form each Zn-binding site. The distance between the Zn ions is marked by arrows. (C) Electrostatic surface representation of the channel with two monomers marked in ribbon representation. The channel comprises five alternating patches of elongated negative (red) and ring-like positive (blue) charge. (D) Side view of DCD (hydrophobic residues in magenta). (E) Ribbon model of DCD. The pore diameter is represented by spheres. The lateral entry points are marked with circles. (F) Hydrophilic residues on the trimeric interface (negatively charged residues in red, positively charged residues in blue, polar residues in green). Nonpolar residues are shown in white. (G) The hydrophilic channel interior. For clarity, the front dimer is omitted; colors as in F. (H) Channel radius along the pore axis.

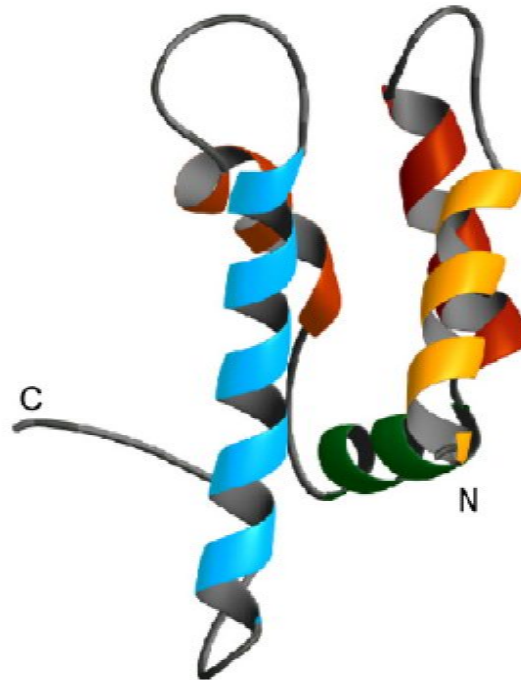


**Fig. 3.** Computational electrophysiology and molecular dynamics simulations of the channel. (A) Evolution of DCD tilt in three 250-ns single-bilayer MD simulations in POPE/POPG(3:1). (B) Water distribution (red/white spheres) in and around the DCD channel in the bilayer (gray); view along the channel axis. (C) Pathway of ion permeation. One complete  $\text{Cl}^-$  permeation event is shown, with red spheres representing snapshots of  $\text{Cl}^-$  position. The brown arrows indicate the direction of permeation. (D) The I-V relationships from computational electrophysiology simulations. Each data point was obtained from a 100-ns MD trajectory by monitoring the number of permeation events (and thus the current) and the overall transmembrane potential during this time window. Blue and green circles are from simulations with 0.15 M and 1 M NaCl in solution, respectively. Dashed lines: linear fit of the conductance data, with the slope (and the asymptotic SE) showing overall conductance.



**Fig. 2.** Electrophysiology and ss-NMR of DCD in the presence and absence of zinc ions. (A and B) Proton-decoupled  $^{15}\text{N}$  and (C)  $^2\text{H}$  ss-NMR spectra of 2 mol %  $[^{15}\text{N}\text{-Gly22}, ^2\text{H}_3\text{-Ala25}]\text{-DCD}$  in oriented POPE/POPG without  $\text{ZnCl}_2$  (A) and with fivefold molar excess of  $\text{ZnCl}_2$  relative to the peptide concentration (B and C).  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  (40.0 ppm) and  $^2\text{H}_2\text{O}$  (0 Hz) were used as external references and the spectra processed with an exponential line broadening of 50 (A and B) and 500 Hz (C), respectively. The gray line in C shows a simulated spectrum arising from a  $3^\circ$  Gaussian distribution for the peptide alignment and a spectral line width of 2 kHz. (D) Current trace and point amplitude histogram representing DCD activity in 1 M NaCl, 5 mM Hepes, pH 7.1 recorded at a holding potential of +100 mV. Protein activity was only rarely observed under these conditions. (E and F) Current traces and point amplitude histograms of DCD-1L in 1 M NaCl, 3 mM  $\text{ZnCl}_2$ , 5 mM Hepes, pH 7.1 recorded at a holding potential of +100 mV; (E) 3.3  $\mu\text{M}$  DCD-1L was added resulting in one defined conductance state. In (F) 7.9  $\mu\text{M}$  DCD-1L was used and two distinct conductance levels each of about 80 pS were monitored, suggesting the insertion of two channels. (G) An event histogram of the conductance levels ( $n = 1,009$ ) shows a mean conductance of  $G = (81 \pm 14)$  pS. (H) Open lifetime analysis with  $\tau = (4.4 \pm 0.2)$  ms.

Псориазин – небольшой антимикробный белок из семейства S100A7, в его структуре отчетливо видны 5 альфа-спиральных участков и 2 бета-шпильки (hairpin). Известно около 20 родственных белков S100A7 с мол.м. ~ 11 000 Да. Они существуют в виде антипараллельных димеров, связывают Ca и Zn



Псориазин синтезируют кератиноциты – эпителиальные клетки кожи, а также многие другие типы клеток. Псориазин обладает бактерицидной активностью.



# Псориазин образует поры в мембране бактерий

M. Michalek et al./ *Developmental and Comparative Immunology* 33 (2009) 740–746

745

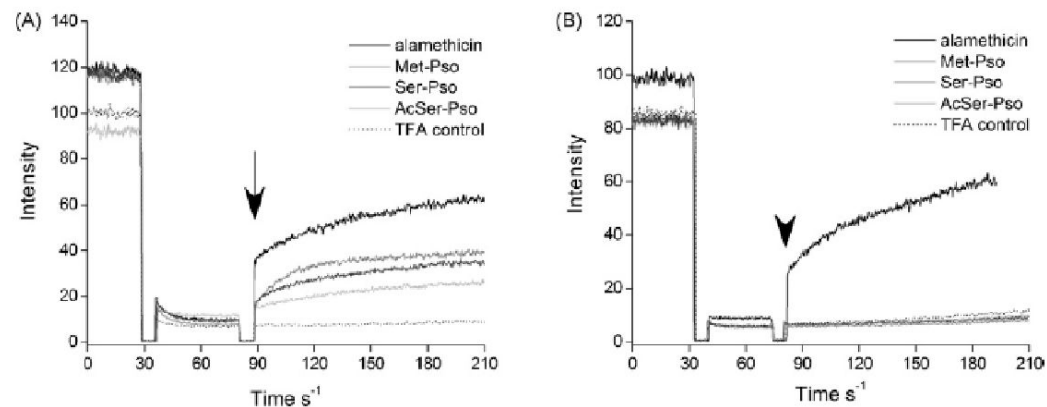


Fig. 5. Pore-forming activity by rh-psoriasin derivatives. The dissipation of valinomycin-induced diffusion potential was monitored as an increase of fluorescence over time. (A) For the Ser-Pso (2.4 nmol), Met-Pso (2.4 nmol) and AcSer-Pso (8.0 nmol) proteins, pore formation was measured at pH 5.2. (B) At pH of 7.4, pore formation was not detected for all three rh-psoriasin derivatives (Ser-Pso (4.8 nmol), Met-Pso (4.8 nmol) and AcSer-Pso (8.0 nmol)). Alamethicin (0.1 nmol) and the peptide solvent were used as a positive and negative control, respectively. Arrows mark the addition of peptide.

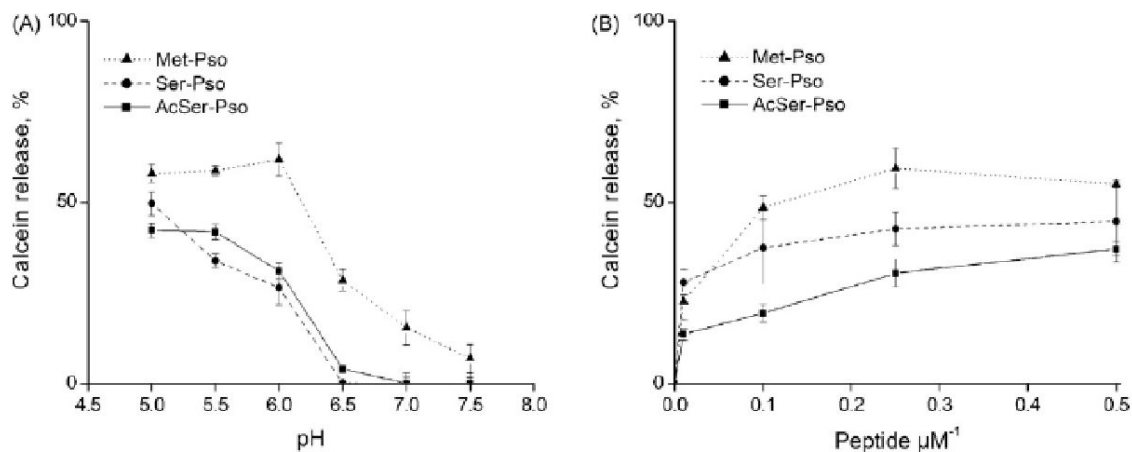


Fig. 4. Membrane permeabilization by the rh-psoriasin derivatives. The release of the fluorescent dye calcein from liposomes was measured. (A) The increase in fluorescence was measured at different pH values for a given concentration of 0.5  $\mu\text{M}$  of each rh-psoriasin derivative. All derivatives permeabilized the liposomes at pH values below 6.5. (B) At a pH value of 5.2 all derivatives permeabilized liposomes in a concentration-dependent manner. All data points correspond to mean values of three measurements and error bars denote the standard deviation.

Сходство структуры псориазина человека и амebaпорина амeбы свидетельствует о древнейшем происхождении антимикробных белков

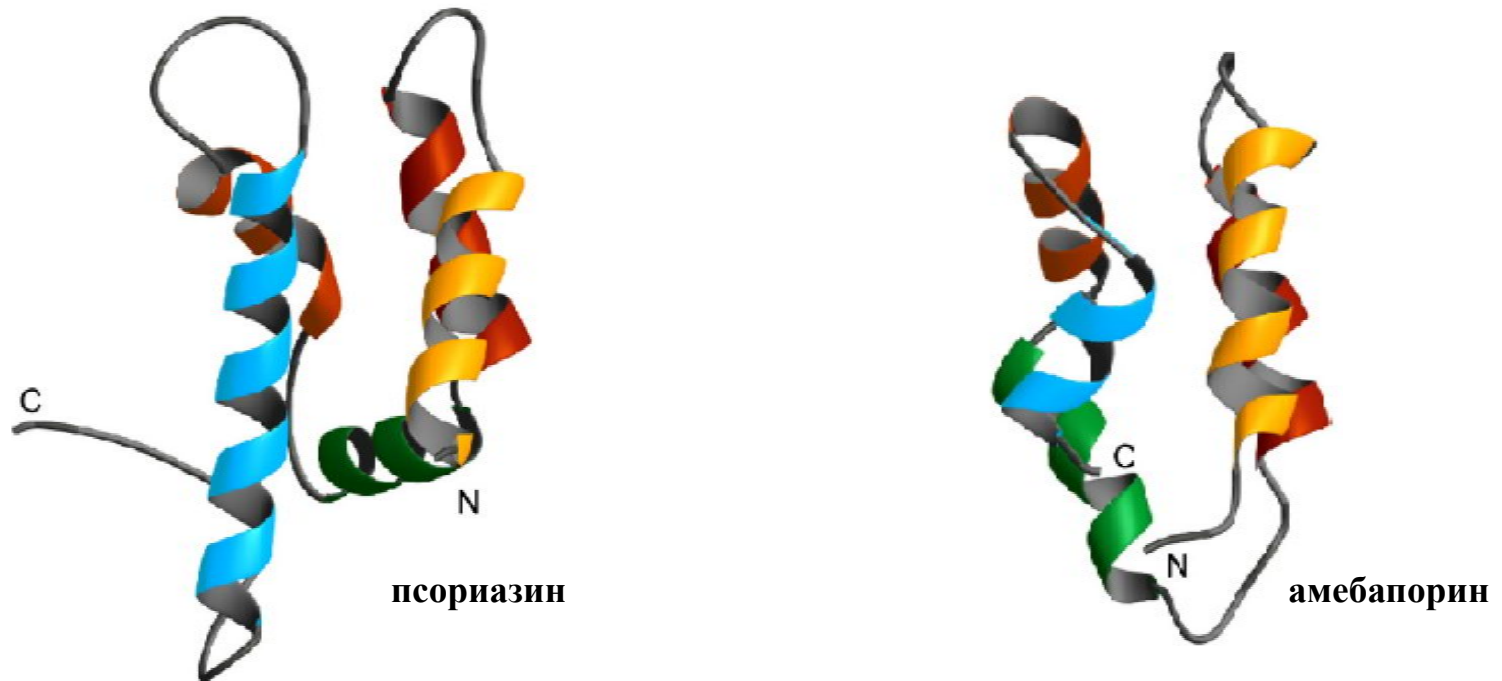


Fig. 1. Human psoriasisin and amoebapore A share the same fold. Ribbon representation of the three-dimensional structures of human psoriasisin (left, pdb accession code: 2ps1) and amoebapore A (right, pdb accession code: 1of9). Corresponding helices are depicted in same colours. N and C denote the N-terminus and C-terminus, respectively.

1. Граница высокоэффективна в смысле защиты от вторжений невидимых существ и веществ (более 95-97% времени жизни граница нас ограждает от неприятностей. Мы бодем не более 3-5% жизни (в среднем, 2 раза в год по 1 неделе). Болезнь означает, что граница не справилась, пришлось включить не только пограничные, но и все остальные защитные возможности.
2. Граница не мешает выполнению жизненно необходимых сложных биологических задач таких, как поиск пищи и воды, защита от макроопасностей (зубы, когти и др.) и половое размножение.
3. Граница незаменима и жизненно необходима, как головной мозг, сердце, почки и печень. Можно потерять половину печени и почек, но нельзя терять даже небольшой части границы. Потеря (0.1-10%) граничного эпителия неминуемо приводит к гибели.. Небольшой прокол в эпителии кишечника приведет к абсцессу кишечника или перитониту. Небольшой прокол в поверхности альвеол приведет к пневмотораксу и плевриту. Удаление 10 кв. см. кожи (<0,1% от всей кожи) поставит наш организм на грань гибели.

# Janeway's Immunobiology, 9<sup>th</sup> Edition

