

**Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка**

А.А. Стасенко

МІСЦЕВИЙ ІМУНІТЕТ

Навчальний посібник

Київ - 2021

УДК: 612.017:616-092.19

Рецензенти: Лісяний Микола Іванович, професор заслужений діяч науки та техніки України, член-кореспондент НАМН України, доктор медичних наук, керівник відділу нейроімунології ДУ Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України

Гаврилюк Анна Мирославівна, доктор біологічних наук, професор кафедри клінічної імунології і алергології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького

Рекомендовано до видання вченою радою ННЦ «Інститут біології та медицини» (протокол № 11 від 27 травня 2021 р.)

Стасенко А.А.

Місцевий імунітет [Електронний ресурс] : навч. посіб. / А.А. Стасенко ; ННЦ «Інститут біології та медицини» – К. : 2021. – 153 с.

Навчальний посібник (з курсом практичних занять) підготовлений відповідно до освітньо-професійної програми підготовки бакалаврів з напрямку «Імунологія» навчальної програми (галузевий стандарт вищої освіти України ГСВО ОПП-05) та дисципліни «Місцевий імунітет» для студентів біологічних спеціальностей педагогічних ВНЗ, а також для магістрантів і аспірантів.

Завданням курсу є формування у студента уявлення про особливості місцевого імунітету шлунково-кишкового тракту та шкіри, клітинні, молекулярні, молекулярно-біологічні основи процесів місцевого імунітету, принципи основних сучасних імунологічних методів, що застосовуються у різних областях і напрямках природничих наук.

Наведено питання для обговорення та приклади тестових питань. Отримані в ході проходження курсу знання дозволять сформуванню у студента уявлення про місцевий імунітет, а також отримати навички виконання окремих імунологічних методів з подальшою інтерпретацією результатів з метою виявлення тих чи інших імунних порушень.

УДК: 612.017:616-092.19

© Стасенко А.А., 2021

© Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини», 2021

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ПЕРЕДМОВА	7
ТЕМА 1. Місцевий імунітет. Секреторні імуноглобуліни.....	9
Визначення секреторних імуноглобулінів sIgA методом радіальної імунодифузії (РІД). Лабораторна робота №1	17
Імуноферментне визначення концентрації секреторного IgA (sIgA) в біологічних рідинах людини в клінічних, діагностичних та науково-дослідних лабораторіях. Лабораторна робота №2	26
ТЕМА 2. Імунна система кишечника.....	38
ТЕМА 3. Фагоцитоз. Методи оцінки фагоцитарної системи в біологічному матеріалі.....	51
Особливості визначення поглинальної активності нейтрофілів методом фагоцитозу в тканинах і рідинах. Лабораторна робота № 3	55
ТЕМА 4. Клітинні і гуморальні фактори імунітету печінки.....	62
Метод виготовлення мазка-відбитка печінки. Лабораторна робота № 4	79
ТЕМА 5. Киснева мікробіцидність систем нейтрофільних гранулоцитів.....	83
Особливості визначення метаболічної активності нейтрофільних гранулоцитів в НСТ-тесті в тканинах і рідинах. Виявлення нейтрофільних зовнішньоклітинних пасток. Лабораторна робота № 5	89
ТЕМА 6. Трефоїлові фактори –маркери мукозального бар'єру шлунково-кишкового тракту.....	98
ТЕМА 7. $\gamma\delta$ -Т-лімфоцити	104
ТЕМА 8. Мікрофлора кишечника і механізми імунорегуляції.....	115
ТЕМА 9. Шкіра як периферичний лімфоїдний орган.....	124
ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ	144
ДОДАТОК 1. Методичні вказівки для устудентів з освоєння дисципліни...	150
ДОДАТОК 2. Теми семінарських занять.....	152

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

МІ - місцевий імунітет

СО - слизові оболонки

ІЛ, ІЛ- інтерлейкіни (ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-10, ІЛ-13, ІЛ-17, ІЛ -22, ІЛ -23)

MALT - mucosa-associated lymphoid tissue

TALT - лімфоїдна тканина, асоційована з носоглоткою, євстахієвою трубою, вухом

NALT - назальноасоційована лімфоїдна тканина

BALT - бронхоасоційована лімфоїдна тканина

GALT - лімфоїдна тканина, асоційована з кишечником

SALT - лімфоїдна тканина, асоційована зі шкірою

Th1, Th2 і Th17 – субпопуляції Т-лімфоцитів хелперів

CD4+ і CD8+ - Т-клітини

IgM, IgG, IgA, IgE - імуноглобуліни

sIgA - секреторний IgA

SC -секреторний компонент

ДК (DC)- дендритні клітини

ILFs -ізольовані лімфоїдні фолікули

TGF- β – трансформуючий фактор росту - β

pIgR - полімерний імуноглобуліновий рецептор

РІД - радіальна імунодифузія

ВМБ -веронал-мединаловий буфер

ІФА - імуноферментний аналіз

БАР - бронхоальвеолярна рідина

НЗ - назальний змив

ВС - вагінальний секрет

К - копрофільтрат

СР - слізна рідина

PPC - розчин для розведення сироваток
ТМБ - тетраметилбензидин
ОЩ - оптична щільність
ОГ - оптична густина
АМП - антимікробні пептиди
ILC – (Innate lymphoid cells) - вроджені лімфоїдні клітини (ВЛК)
TLR -Toll-подібні рецептори (Toll-like receptors, TLR1, TLR2, TLR3 ... TLR10)
NLR - Nod-подібні рецептори
РАМР – патогенасоційовані молекулярні патерни (ділянки) на мікроорганізмах
TNF- α (ФНП- α) – фактор некрозу пухлин α
IBD - запальні хвороби кишечника
МНС – молекули головного комплексу гістосумісності (major histocompatibility complex)
CCR9 - інтегрин
Tregs – Т-регуляторні лімфоцити (regulatory T cells)
PPs - пейєрові бляшки (Peyer's patches)
LP –власна пластинка (lamina propria)
НГ - нейтрофільні гранулоцити
ФАЕ -фолікуло-асоційований епітелій
ФАМ– функціональна асиметрія мозку
ЕДТА -етилендіамінтетраоцтова кислота
ФІ – фагоцитарний показник
СОШ - слизова оболонка шлунка
ФІ - фагоцитарний індекс -% «активних» НГ із загального числа порахованих
ФЧ -фагоцитарне число - середнє число фагоцитованих мікробів на 1 НГ
ІБН - індекс бактерицидності НГ
LSEC -синусоїдальні ендотеліальні клітини
КС - клітина Купфера
НСС - печінкова зірчаста клітина

НК - природна кілерна клітина
LDCs (liver dendritic cells) - ДКП (дендритні клітини печінки)
ЛПС - ліпополісахарид
НСТ – нітросиній тетразол
НЗП - нейтрофільні зовнішньоклітинні пастки (Neutrophil Extracellular Traps, NETs)
СЦІ - середній цитохімічний індекс
АФП - α -фетопротеїн
ПР - показник функціонального резерву клітин
TFF-1 (або PS2), TFF-2 (або спазмолітичний поліпептид SP) і TFF-3 (або кишковий поліпептид ITF) - різновиди трефоїлових факторів
DETC (Dendritic epidermal T cells) – дендритні епідермальні Т-клітини
gpr15 (orphan G protein-linked chemoattractant receptor) - рецептор хемоаттрактант, зв'язаний з білком G
UACL - асоційовані з виразкою клітинні лінії
SC (stratum corneum) - роговий шар
TJ (tight junctions) - щільні з'єднання
АД - атопічний дерматит
КЦ -кератиноцити
КЛ - клітини Лангерганса
DTH (delayed type hypersensitivity) -гіперчутливість уповільненого типу
AMP (Antimicrobial peptides) - антимікробні пептиди
CHS (contact hypersensitivity) - контактна гіперчутливість
TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) – тимічний стромальний лімфопоетин
ЕК – ендотеліальні клітини

ПЕРЕДМОВА

Навчальний посібник «Місцевий імунітет» присвячений дуже актуальній як для фундаментальної науки, так і для практичної медицини тематиці. На сьогоднішній день доведено, що клітинні та гуморальні фактори імунітету, працюючи на місцевому рівні - у біологічних рідинах та тканинах організму, несуть головне навантаження у захисті організму від чужорідних та аутологічних патологічно змінених антигенів. Печінку з повним правом можна назвати периферичним органом імунної системи, тому принципово важливими є знання про білоксинтезуючу та імунну функцію печінки, яку забезпечують локалізовані поміж гепатоцитами макрофаги, Т-лімфоцити та НК-клітини. Шлунково-кишковий тракт є унікальним комплексом імунних клітин, інкорпорованих у кишковий епітелій, з мікробіцидними факторами, синтезованими фізіологічною мікрофлорою кишківника. Цікавою та досі маловивченою є функція $\gamma\delta$ -Т-лімфоцитів, які першими реагують на проникнення патогену в епітеліальні клітини і сприяють активації макрофагів, гранулоцитів, НК- клітин.

Інформація про вищеперелічені механізми, яка подана у посібнику достатньо повно і на сучасному рівні, є дуже важливою для практичних лікарів та вчених-медиків, бо висвітлює певні ланки імунітопатогенезу хвороб печінки та кишківника, першопричиною яких є порушення цілісності та функцій місцевого імунного захисту. Інформація про роль товстого кишківника у імунному захисті організму є важливою і для лікарів алергологів - для розуміння процесів розвитку псевдоалергічних реакцій у певної категорії пацієнтів.

У складі посібника є і лабораторна частина - методи визначення секреторних імуноглобулінів sIgA методами радіальної імунодифузії (РІД) та імуноферментним у біологічних рідинах людини, методи оцінки фагоцитарної

системи в біологічному матеріалі, особливості визначення поглинальної активності нейтрофілів і т.д. для застосування в клінічних, діагностичних та науково-дослідних лабораторіях.

Псібник містить фундаментальні основи знань для вивчення функціонування місцевого імунітету людини та ряд лабораторних імунологічних методів для дослідження чисельності чи концентрації різних чинників місцевого імунітету.

**Професор кафедри клінічної імунології та
алергології ЛНМУ імені Данила Галицького**

А.М.Гаврилюк

ТЕМА 1. МІСЦЕВИЙ ІМУНІТЕТ. СЕКРЕТОРНІ ІМУНОГЛОБУЛІНИ

Місцевий імунітет (MI), або імунна система слизових оболонок (CO), є важливим компонентом специфічного протиінфекційного захисту людини на поверхнях, безпосередньо сполучених із зовнішнім середовищем (шкіра, слизові оболонки очей, дихальна, травна системи та уrogenітальний тракт).

Імунна система слизових оболонок відкритих локусів (місцевий імунітет) має унікальну структуру, забезпечує збереження імунного гомеостазу в організмі людини і свого специфічного субпопуляційного складу лімфоцитів та інших клітин - «партнерів» по імунній відповіді.

При цьому цілком фізіологічні імунні реакції, спрямовані на підтримання гомеостазу організму, майже завжди супроводжуються запальною відповіддю (власне запалення є невід'ємною частиною успішної реалізації імунітету).

Нежить, кашель, біль у горлі, діарея та диспепсія, запалення шкірних покривів, з одного боку, і алергічні реакції, з іншого, - виникнення всіх цих проблем не обходиться без участі мукозального імунітету.

Як не дивно, незважаючи на різну локалізацію і досить різні прояви, в основі патогенезу всіх цих станів (і багатьох інших) лежать одні й ті ж механізми активації мукозального імунітету.

Імунітет слизових реалізується через єдину структуровану систему, що отримала назву «мукозоасоційована лімфоїдна тканина» (MALT) (mucosa-associated lymphoid tissue - MALT). Структуризація MALT йде по поверхнях в залежно від того, де анатомічно розміщується та чи інша бар'єрна тканина:

TALT - носоглотка, євстахієва труба, вухо.

NALT - носова порожнина, рот і ротоглотка, кон'юнктива.

BALT - трахея, бронхи, легені, грудні залози (у жінок).

GALT - 1) стравохід, шлунок, тонкий кишечник;

2) товстий кишечник і проксимальні відділи уrogenітального тракту; дистальні відділи уrogenітального тракту.

SALT - шкіра (дерма).

MALT - це найбільша частина імунної системи, де на загальній площі 400 м² розташовуються близько 50% імунокомпетентних клітин. Тут представлені клітини як вродженого імунітету, так і набутого. Крім клітин в MALT сконцентровані і інші механізми захисту.

У будь-якій частині MALT механізми захисту мають подібну організацію (хоча є і відмінності між ними):

Верхній «інертний» бар'єр є шаром слизу або, у випадку шкіри, «сухий» шар, що складається з кератину. Основні захисні фактори, представлені на цьому рівні, - це фізичний бар'єр, протимікробні пептиди, секреторний IgA, компоненти системи комплементу і мікробіота.

Очевидно, що інертність цієї структури досить умовна, так як тут постійно протікають активні реакції кілінга мікроорганізмів і велика кількість біохімічних процесів метаболічної спрямованості.

Епітеліальний пласт довгий час розглядався тільки як фізичний бар'єр. Сьогодні подібне уявлення істотно змінилося.

По-перше, було встановлено, що епітеліальні клітини експресують рецептори відповідальні за взаємодію з мікроорганізмами, які здатні запускати активацію цих клітин з наступною продукцією протимікробних пептидів, а також каскадом регуляторних молекул (цитокинів) і експресією на епітеліоцитах корецепторів для клітин імунної системи.

По-друге, в складі «непроникного» епітеліального пласта були виявлені дендритні клітини (переважно ротова порожнина, дихальна система, уrogenітальний тракт, шкіра) і М-клітини (тонкий кишечник, мигдалини, аденоїди), які здійснюють контрольоване перенесення через бар'єр всередину організму чужорідної матеріал.

Цей контрольований «трафік» необхідний для підтримки в «тонусі» бар'єрного імунітету та оповіщення імунної системи про зміни в оточенні

(наприклад, про дисбаланс мікробіоти або про потрапляння на слизові оболонки і шкіру патогенних мікроорганізмів).

Інакше кажучи, імунна система бар'єрних тканин знаходиться весь час в стані «тліючої» активації, що дозволяє їй швидко і ефективно реагувати на агресію чужорідних речовин (вірусів, бактерій, грибів і т.д.).

В підепітеліальній пухкій сполучній тканині lamina propria (власна пластинка) дифузно, у високій концентрації розташовуються клітини вродженого імунітету: кілька популяцій дендритних клітин, макрофаги, природні кілери, гранулоцити, вроджені лімфоїдні клітини і т. д.

Під епітелієм в lamina propria знаходяться так звані «ізольовані лімфоїдні фолікули», які є представниками адаптивного імунітету в бар'єрних тканинах. Ці фолікули мають чітку організацію з Т- і В-клітинними зонами і гермінативним центром. Т-клітинні зони містять практично всі субпопуляції $\alpha\beta$ TCR CD4 + Т-хелперів (Th1, Th2 і Th17), які продукують ІЛ-10, Т-регуляторні клітини, CD8 + Т-ефектори.

У складі В-клітинних зон переважають В-лімфоцити, секретуючі ІgА. Саме в ці фолікули дендритні клітини і М-клітини доставляють антигенний матеріал, ініціюючи адаптивну імунну відповідь.

Адаптивна імунна система бар'єрних тканин тісно пов'язана з регіонарними лімфатичними утвореннями: пейєровими бляшками, апендиксом, мигдалинами і т. д., які дозволяють перевести імунну відповідь з місцевого рівня на системний.

Крім єдиної структурної організації, описаної вище, існує ще одна особливість, яка робить MALT окремою (і навіть майже автономною в деякому сенсі) підсистемою в рамках загального імунітету. Це так званий «закон хомінг MALT».

Відповідно до цього закону активація адаптивного імунітету в будь-якій частині MALT приводить до формування пулу антиген-специфічних клітин,

частина якого залишається в місці початку імунної відповіді, а інша виходить в системний кровотік і розселяється (хомінг) тільки в інші компартменти MALT.

Наприклад, якщо проникнення патогена відбулося в кишечнику (GALT), то через деякий час секретуючі патоген-специфічні IgA B-лімфоцити можна буде виявити в бронхолегеневих лімфатичних фолікулах lamina propria (BALT).

За рахунок цього механізму формується глобальний захист всіх бар'єрних тканин.

Основними функціональними одиницями МІ є епітеліальні клітини, що покривають слизові оболонки органів, сполучені з зовнішнім середовищем, і лімфоїдний апарат субепітеліального простору. У складі МІ виділяють секреторний імунітет.

В якості найбільш поширеного класу антитіл, знайденого в просвіті кишечника людини і більшості інших ссавців, секреторний IgA (sIgA) вже давно визнаний компонентом першої лінії оборони в захисті кишкового епітелію від кишкових патогенів і токсинів.

sIgA є головною гуморальною складовою місцевого імунітету, який утворюється шляхом кооперації імунокомпетентних і епітеліальних клітин. Існуючі структурні особливості sIgA склалися в процесі еволюційного розвитку імунітету.

Секреторний імуноглобулін А - це димер, належить до глікопротеїнів, містить дві молекули IgA, секреторний компонент - позаклітинну секреторну ділянку рецептора полімерних імуноглобулінів і J-ланцюг (рис.1.1). Секреторний компонент утворюється в епітеліальних клітинах, забезпечує стійкість молекули sIgA до дії ферментів, перешкоджає адгезії вірусів і бактерій до СО, стимулює антибактеріальну активність фагоцитів і лімфоцитів по відношенню до патогенних мікробів, блокує антигени і харчові алергени, здатні провокувати алергічні реакції.

В даний час доведено, що димерні форми IgA продукує велика частина плазматичних клітин, що стикаються з епітеліальними поверхнями.

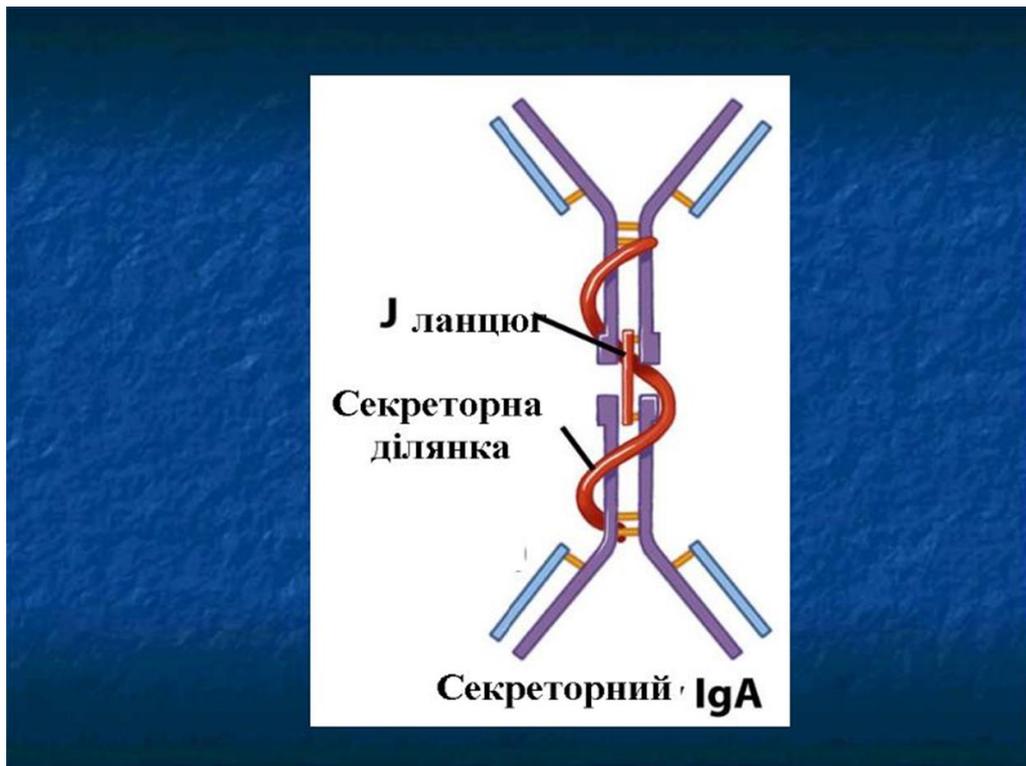


Рис.1.1. Будова секреторного імуноглобуліну А (містить дві молекули ІgА, секреторний компонент - позаклітинну секреторну ділянку рецептора полімерних імуноглобулінів і J-ланцюг).

Важливо, що димер молекули ІgМ, з'єднаний з допомогою J-ланцюга з секреторною ділянкою, також може переноситися через слизові оболонки. Є дані, що цей клас імуноглобулінів у дітей, так само як sІgА, може брати участь у захисті слизових оболонок від інфекцій. Така ситуація найбільш актуальна у дітей раннього віку, коли sІgА ще не утворюється, або синтезується недостатньо, а sІgМ вже присутній.

Захисні властивості sІgА пояснюються не тільки здатністю блокувати мікробні антигени, але і високою стійкістю до протеаз. Ці властивості дають йому можливість функціонувати в секретах відкритих локусів.

Крім того, sІgА пов'язує компоненти комплементу, перешкоджає адгезії мікроорганізмів, їх токсинів, харчових, бактеріальних алергенів на епітелії

слизових, таким чином, не дозволяє їм проникати у внутрішнє середовище людини через епітеліальний шар СО.

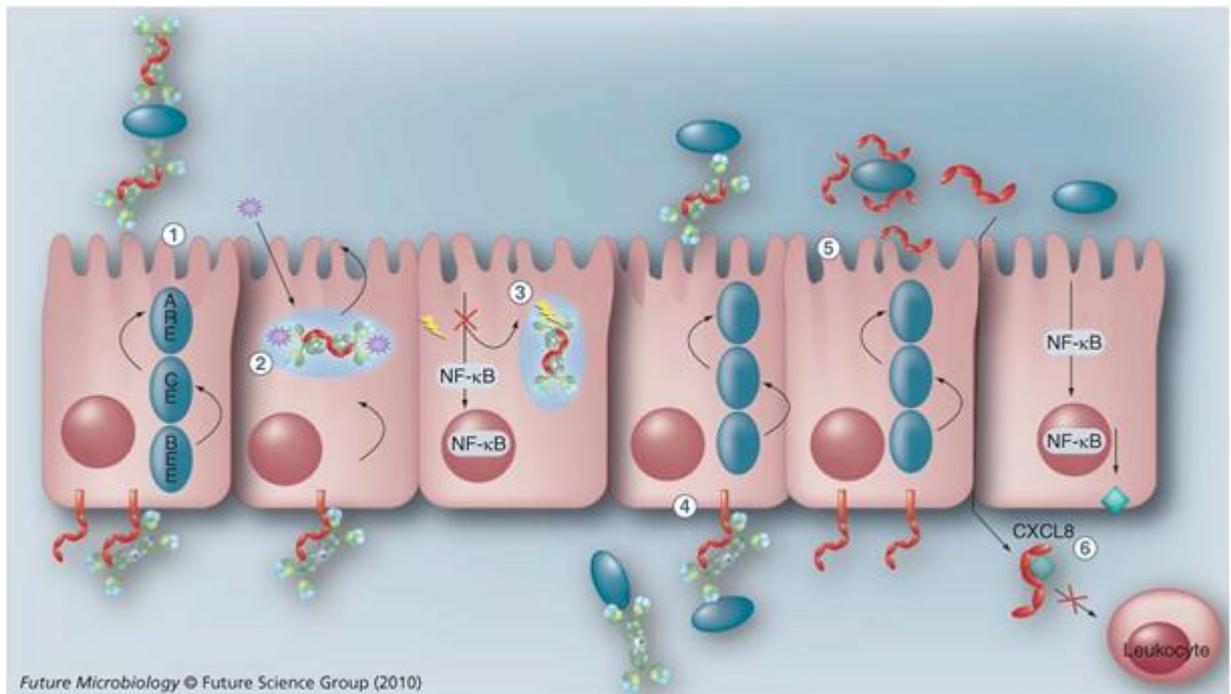


Рис. 1.2. Властивості, за допомогою яких полімерний IgA, секреторний імуноглобулін А (SIgA) або секреторний компонент (SC) може сприяти захисту поверхонь слизової оболонки.

На рис.1.2 зображено механізми, за допомогою яких полімерний IgA, секреторний імуноглобулін А (SIgA) або секреторний компонент (SC) може сприяти захисту поверхонь слизової оболонки.

1: Полімерний IgA, що продукується місцевими плазматичними клітинами, транспортується через епітеліальні клітини за допомогою полімерного Ig-рецептора (pIgR) і вивільняється в просвіті як SIgA, здійснюючи імунне виключення через взаємодію з антигенами (наприклад, бактеріями, вірусами, токсинами). 2: Полімерні IgA на шляху до опосередкованої pIgR секреції можуть перехоплювати віруси, що надходять у внутрішньоклітинні ендосомні компартменти, і виводити їх у вигляді невірулентних імунних комплексів.

3: Нейтралізація грамнегативного бактеріального ліпополісахариду шляхом трансцитозу полімерного IgA призводить до блокування опосередкованої NF-κB активації прозапальних реакцій і, таким чином, запобігає пошкодженню епітеліального бар'єру. 4: Полімерний IgA може нейтралізувати інфекційні агенти, які проникли у власну пластинку через порушення епітелію під час запалення; подальший транспорт pIgR сприятиме очищенню імунних комплексів. 5: Вільний секреторний компонент, що міститься в секретах, при нейтралізації продуктів, що походять від патогенів, за допомогою гліканів, що знаходяться на його поверхні, захищає епітеліальні поверхні від фізичних пошкоджень; ця властивість зберігається, коли SC пов'язаний з полімерним IgA в SIgA. 6: Вільний SC, і, можливо, у формі SIgA, може зменшити біологічну активність прозапального хемокіну CXCL8, швидше за все, як нековалентний комплекс, тим самим обмежуючи залучення лейкоцитів у місце запалення.

Дозрівання лімфоїдного апарату, що відповідає за синтез sIgA, завершується до 10-12 років. Очевидно, що до цього віку дитина частіше наражається на ризик розвитку хвороб бактеріальної та вірусної етіології.

Виробництво sIgA проти специфічних антигенів слизової залежить від вибірки М клітин Пейєра, від обробки антиген-представляючими клітинами, такими як дендритні клітини (ДК), від активації Т - клітин, а також, в кінцевому рахунку В класу клітин перемикачів рекомбінації в кишковій лімфоїдній тканині (GALT), брижових лімфатичних вузлах, і, можливо, сусідніх (власній пластинці слизової оболонки MLNs).

Ізольовані лімфоїдні фолікули (ILFs) в тонкій кишці також функціонують в індукції імунних відповідей слизових оболонок. Кілька цитокінів, в тому числі IL-4, TGF-β, IL-5, IL-6, IL-10, відіграють важливу роль в стимуляції кишечника для вироблення імуноглобулінів.

Частина цих цитокінів, зокрема, TGF- β і IL-10, також необхідні для підтримки толерантності слизових оболонок, створивши таким чином один з численних зв'язків між sIgA, імунітетом і кишковим гомеостазом.

МІ є важливим імунологічним бар'єром для багатьох патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів, складним комплексом пристосувальних реакцій, які формуються в процесі еволюційного розвитку людини. Гуморальна складова місцевого імунітету sIgA забезпечує захист людини від інфекційних чинників (бактерії, віруси, паразити) і антигенів іншого походження.

sIgA шляхом ендцитозу переносить через епітеліальний шар СО полімерний імуноглобуліновий рецептор (pIgR).

Таким чином, імуноглобулін А взаємодіє з внутрішньоклітинними патогенами, в першу чергу - з вірусами, блокує розмноження, ампліфікації генетичного матеріалу, складання та ін. процеси їх активації, а також виносить мікроорганізми в просвіт кишечника.

Крім здатності sIgA пригнічувати мікробну адгезію, на слизовій оболонці він нейтралізує і запобігає надходженню у внутрішнє середовище людини великої кількості потенційно небезпечних харчових білків, біополімерів і інших речовин, здатних викликати алергічні реакції.

Припускають, що полімерна форма IgA регулює широке коло захисних функцій, завдяки взаємодії sIgA з безліччю рецепторів і медіаторів.

Наводяться дані, що щодня в середньому синтезується більш, ніж 60 мг sIgA на кг маси тіла. Про значущу роль sIgA в захисті внутрішнього середовища організму свідчить і той факт, що у дорослої людини поверхня слизової оболонки має величезну площу. Вона становить 400 м².

Домінування sIgA на СО багато в чому визначає його роль для виживання людини.

Визначення секреторних імуноглобулінів sIgA методом радіальної імунодифузії (РІД).

Лабораторна робота №1

План заняття:

1. Місцевий імунітет. Секреторні імуноглобуліни.
2. Отримання і обробка зразка змішаної слини.
3. Принцип метода радіальної імунодифузії (РІД).
4. РІД в дослідженні секреторних імуноглобулінів.
5. Підготовка реактивів до кількісного визначення секреторних Ig.
6. Підготовка обладнання і допоміжного матеріалу.
7. Техніка постановки аналізу.
8. Облік результатів аналізу. Інтерпретація результатів аналізу.
9. Контроль якості.

Практичні навички

- Розведення компонентів, приготування реактивів і робочої суміші (моноспецифічна сироватка і агар).
- Освоєння роботи на водяній бані.
- Освоєння техніки заливки робочої суміші на горизонтальну поверхню.
- Освоєння техніки розведення контрольної сироватки.
- Вміння правильно внести зразок в лунку.
- Вміння включити центрифугу на необхідні оберти.
- Вміння працювати з біноккулярною лупою.
- Вміння працювати на аналітичних вагах.
- Вміння працювати на іонометрі (вимірювання рН).
- Освоєння техніки побудови калібрувальної кривої.

Методичні вказівки до виконання заняття

Визначення секреторних імуноглобулінів sIgA

Для виконання заняття необхідно знання теоретичного матеріалу.

Одним з найбільш простих і надійних методів визначення концентрації імуноглобулінів основних класів та секреторних імуноглобулінів є радіальна імунодифузія (РІД), розроблена Mancini та співавт. (1965). Оцінка секреторних імуноглобулінів sIgA проводиться в змішаній слині, змивах зі слизових.

Рівень імуноглобулінів визначається з використанням тест-системи, розробленої в Московському науково-дослідному інституті епідеміології та мікробіології імені Г.М. Габричевського МОЗ РФ. У склад набору входять моноспецифічні антисироватки для визначення sIgA, IgG, IgA і ампула зі стандартом (з відомим вмістом імуноглобулінів).

Принцип методу. Метод оснований на реакції утворення нерозчинного комплексу, який виявляється імуноглобуліном зі специфічними антитілами до нього в тонкому шарі агару. Цей преципітат має форму візуально видимого кільця, діаметр якого пропорційний логарифму концентрації імуноглобуліну, що визначається.

При визначенні sIgA вимірюють діаметр кільця преципітата, який утворюється при внесенні дослідної слини в шарі агару, в якому попередньо диспергована моноспецифічна сироватка проти sIgA людини. Моноспецифічна сироватка містить антитіла проти sIgA і вільного секреторного компонента. Діаметер кільця преципітації прямо пропорційний концентрації дослідного sIgA. Вміст sIgA в досліджуваних пробах визначають відносно контрольного зразка з відомою концентрацією sIgA.

Реактиви і обладнання:

- водяна баня,
- горизонтальний стіл,
- скельця для заливки агаром,
- пробійник для вибивання лунок в агарі (діаметр - 2 мм),
- волога камера,
- сироватка діагностична моноспецифічна проти секреторних IgA (готова),

- контрольний матеріал, який являє собою імунохімічний чистий секреторний імуноглобулін А з певною концентрацією білка (готовий комерційний),
- веронал,
- мединал,
- 2 % агар на веронал-мединаловому буфері (ВМБ),
- 0,1 % розчин амідочорного,
- біноккулярна лупа,
- лінійка для вимірювання кілець (типу Берінгверке).

Отримання і обробка матеріалу для дослідження нестимульованої змішаної слини:

- через 1 годину після сніданку ретельно прополоскати рот кип'яченою водою і зібрати слину в стерильну пробірку протягом 10 хв. Виміряти загальний об'єм слини;
- для отримання проби для дослідження перенести 1 мл слини в чисту пробірку і відцентрифугувати зразок при 1500-2000 об/хв (400 g) протягом 20 хв.
- перенести піпеткою 500 мкл надосадової рідини в пробірку типу «епендорф» для аналізу. При неможливості використання проби в день її отримання зберігати зразки при $-4 - 8^{\circ}\text{C}$; при тривалому зберіганні - при -20°C .

Підготовка реактивів для аналізу:

- підготувати веронал-мединаловий буфер (ВМБ): зважити 1,28 г мединала, 0,23 г веронала, додати 125 мл дистильованої води. Виміряти рН ВМБ ($\text{pH } 8,36 \pm 0,04$);
- підготувати 2 % агар: до 2 г сухого агару додати 100 мл ВМБ і 1 мл 0,1 % розчину мертиоляту. Підігріти на водяній бані до розплавлення. В гарячому вигляді агар розлити в центрифужні пробірки і зберігати в холодильнику при $t = -4 - 8^{\circ}\text{C}$ до використання;

- розчинити в 2 мл дистильованої води моноспецифічну сироватку проти sIgA людини;
- розчинити в 0,5 мл дистильованої води контрольну сироватку з певною концентрацією білка 2 мг/мл. Зберігати до використання в холодильнику при -20°C . Якщо при тривалому зберіганні утворюється пластівчастий осад, повторно відцентрифугувати при 2000 об/хв.;
- підготувати робочу суміш: 2 % агар і моноспецифічну антисироватку в співвідношенні 2,7 мл агара і 0,3 мл антисироватки. Змішати їх при $t = 55-57^{\circ}\text{C}$;
- підготувати чисті обезжирені предметні скельця для заливки агаром;
- приготувати 0,1 % розчин барвника амідочорного: зважити 0,1 г амідочорного і розчинити в 100 мл розчину 7% льодяної оцтової кислоти.

Техніка постановки РІД:

- предметне скло покласти на горизонтальний стіл, окреслити його краї склогографом, щоб не розтікався агар, і залити скло 3 мл робочої суміші. Товщина шару агару 1-2 мм;
- поки на склі застигає агар, підготувати розведення контрольного зразка sIgA в наступних розведеннях: нерозведений, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8;
- в застиглому агарі зробити лунки на відстані 15 мм одна від іншої;
- в перший ряд лунок внести по 2 мкл контрольного зразка в розведеннях: нерозведений, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8;
- в останні лунки внести по 2 мкл досліджуваних зразків;
- скельця витримати у вологій камері 24 год при кімнатній температурі.

Облік результатів:

- після закінчення інкубації профарбувати агар 0,1 % розчином амідочорного протягом 10 хв і виміряти кільця преципітатів за допомогою бінокулярної лупи, клиноподібної лінійки (рис. 1.3) або штангенциркуля.

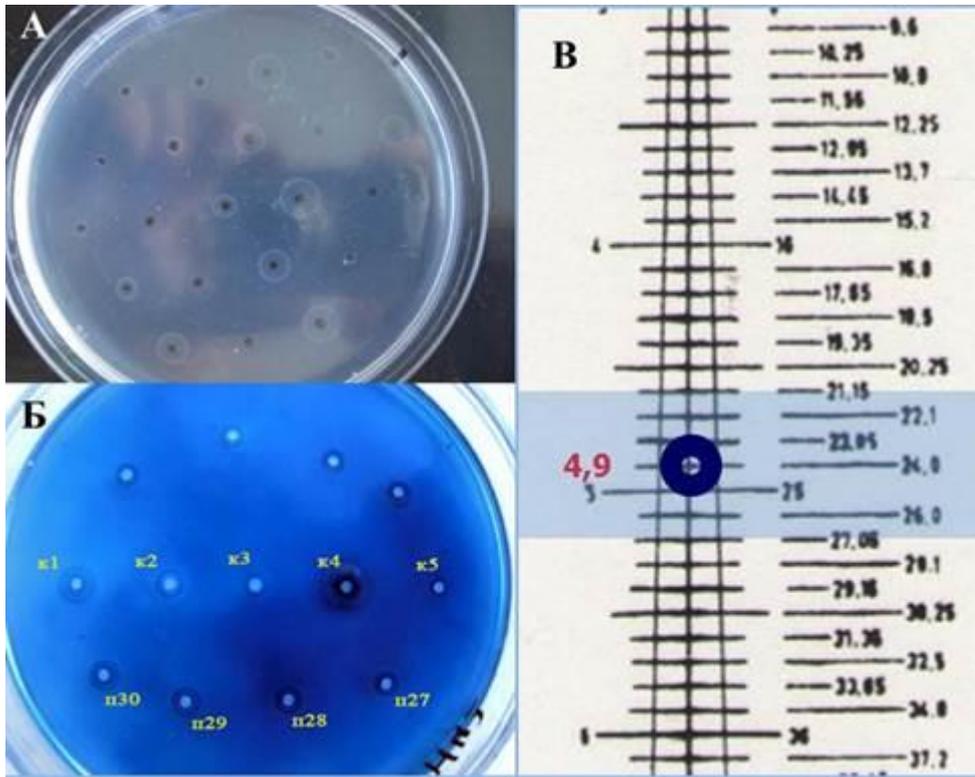


Рис. 1.3. Преципітати при постановці реакції Манчіні для визначення концентрації імуноглобулінів: А - нативний препарат, Б - пофарбовані преципітати, В - вимірювання діаметра преципітата клиноподібною лінійкою (збільшено)

-
- Концентрацію sIgA визначити по калібрувальній кривій, побудованій на напівлогарифмічному папері:
- побудувати калібрувальну криву залежності діаметра преципітату від концентрації Ig секретів. По осі абсцис відкладаються діаметри кілець преципітації, а по осі ординат – відповідні їм концентрації контрольного зразка sIgA; з'єднуються нанесені точки калібрувальної кривої;

при оцінці концентрації Ig в зразках по осі абсцис відкладається діаметр кільця преципітату, встановлюється перпендикуляр до перетину з калібрувальною кривою. Точка перетину проектується на вісь ординат і вираховується концентрація sIgA (рис.1.4).

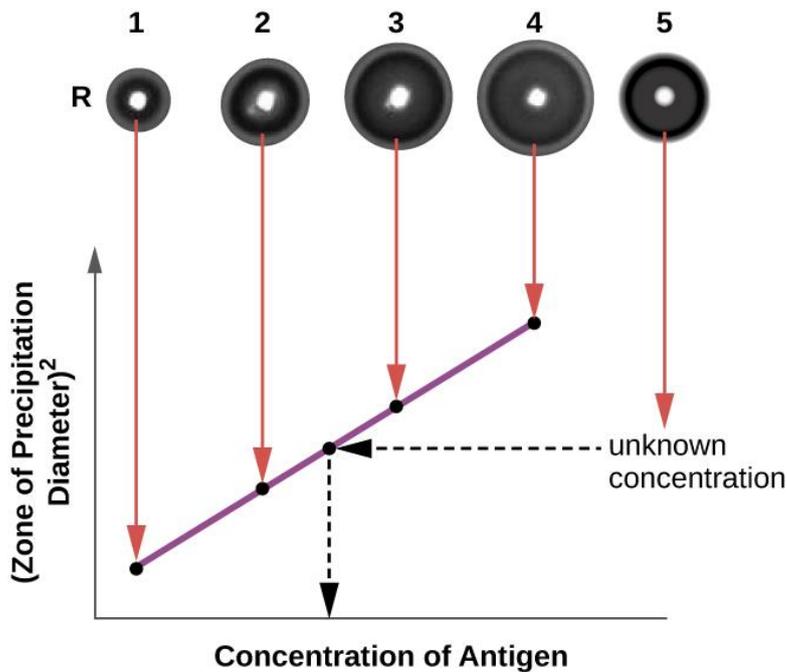


Рис. 1.4. Стандартна крива для визначення концентрації антигену в зразку.

Інтерпретація результатів

Змішана слина містить сироваткові білки, зокрема Ig. Для диференційованого визначення кількості і співвідношення сироваткового і секреторного IgA проводиться дослідження на двох типах антисироваток: до sIgA і до сироваткового IgA. Це дає можливість визначити додатковий показник – вільний секреторний компонент, який дорівнює різниці результатів концентрацій секреторного і сироваткового Ig. Збільшення трансудації sIgA відбувається при запальних процесах слизової ротової порожнини.

У здорових людей концентрація sIgA₁ – 0,27-0,70 г/л, sIgA₂ – 0,29-0,60 г/л, sIgA₁/sIgA₂ – 0,8-1,2 умов. од.

Контроль якості. На попередньо побудованій карті Шухарта (контроль правильності та відтворюваності) вносяться контрольні значення sIgA при кожній постановці.

Можливі причини помилок при проведенні РІД і заходи по їх усуненню вказані в табл.1.1.

Характеристика причин аналітичних помилок, які найбільш часто зустрічаються при проведенні РІД

Характеристика помилки	Метод	Можливі причини	Заходи щодо зниження помилок
Занижені результати	РІД	1.Зміни фізико-хімічних ластивостей аналіту (полімеризація) 2.Мале розведення антисироватки	1.Контроль правильності зберігання зразків для дослідження 2. Попередній підбір антисироватки і розведення стандартів
Занижені результати	РІД	3. Низький кут крутизни калібртки 4.Неідентичність структури стандартів і зразка 5.Незавершеність інкубації	3.Контроль адекватності стандартних матеріалів, паралельне дослідження іншим методом 4. Контроль часу інкубації
Завищені результати	РІД	1.Мономерні форми Ig 2. Високий кут крутизни калібртки 3.Низькі значення стандартних зразків 4.Тривала інкубація 5.Висока температура інкубації 6.Неправильне розведення зразків	1.Контроль зразка іншим методом при виявленні парапротеїну 2.Правильність зберігання зразків до дослідження 3.Відповідність концентрацій стандарта і зразків 4.Стандартизація температури і часу інкубації 5.Контроль розведення, використання відкаліброваних піпеток, одноразових наконечників

Місцевий імунітет має в своєму складі не тільки секреторні імуноглобуліни А і М, стійкі до протеолітичних ферментів. В його структуру також входить ряд клітинних утворень, які локально синтезують ферменти,

медіатори міжклітинної взаємодії, речовини, що пригнічують розмноження мікроорганізмів або знищують патогенів.

Питання для обговорення:

1. В чому полягає «закон хомінг MALT» ?
2. Імуноглобуліни. IgA як фактор гуморального імунітету.
3. Особливості організації молекул секреторного імуноглобуліну А.
4. Біологічна роль sIgA.
5. Розподілення в організмі sIgA.
6. Вікові особливості продукції sIgA.
7. Принцип метода радіальної імунодифузії.
8. Можливі причини помилок при проведенні РІД і заходи по їх усуненню.

Використана література

1. Шварцман Я. С. Местный иммунитет / Я. С. Шварцман, Л. Б. Хазенсон. - М.: Медицина. —1999. — 22с.
2. Климович В. Б. Иммуноглобулин А (IgA) и его рецепторы / В.Б. Климович, М. П. Самойлович // Медицинская Иммунология. - 2006. - Т. 8. - № 4. -С. 483-500.
3. Ярилин А. А. Основы иммунологии / А. А. Ярилин.- М. Медицина. - 1999. - 602с.
4. Хаитов Р. М. Физиология иммунной системы / Р. М. Хаитов. - М. - 2001. - 223с.
5. The cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor contains two internalization signals that are distinct from its basolateral sorting signals / С. Т. Okamoto, S. P. Shia, C. Bird et al. // J. Biol. Chem. - 1992. Vol. 267. - P. 9925–9932.
6. Subpopulations of human peripheral granulocytes and monocytes express receptors for IgA / M. W. Fanger, L. Shen, J. Pugh, G. M. Bernier // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. -1980. -Vol.77. - P. 3640-3644.

7. Стефани Д. В. Клиническая иммунология детского возраста / Д.В.Стефани, Ю. Е. Вельтищев. - 1977. – 275 с.
8. The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA / C. S. Kaetzel, J. K. Robinson, K. R. Chintalacharuvu et al. // Proc. Natl.Acad. Sci. USA. - 1991. - Vol. 88. - P. 8796-8800.
9. Regulation of the formation and external transport of secretory immunoglobulins / I. N. Norderhaug, F. E. Johansen, H. Schjerven, P. Brandtzaeg// Crit. Rev. Immunol. - 1999. - Vol.19. - P. 481-508.
10. Kerr M. A. The structure and function of human IgA / M. A. Kerr // Biochem.J. - 1990. - Vol. 271. - P. 285-296.
11. Cunningham-Rundles C. Human secretory component/ C. Cunningham-Rundles, M. E. Lamm, E. C. Franklin // J. Biol. Chem. - 1974. - Vol. 249. - P. 5654–5657.
12. Brandtzaeg P. Human secretory component. VI. Immunoglobulinbinding properties / P. Brandtzaeg // Immunochemistry. -1977. - Vol. 3. - P.179–188.
13. Areceptor for IgA on human T lymphocytes / L. G. Lum, A. V. Muchmore, D. Keren, et al. // J. Immunol. - 1979. - Vol.122. - P. 65-69.
14. Возрастные особенности иммунитета у детей (лекция для врачей)/ Л.А.Щеплягина, В. М.Чернов, И. В.Круглова, В. М.Делягин - Москва: Анита-пресс. - 2008. – 36 с.
15. Казеева Т. Н. Неизвестные функции иммуноглобулинов А / Т. Н.Казеева, А. Б. Шевелев // Биохимия. - 2007. - Т. 72, № 5. - С. 603-614.
16. Караулов А. В. Клиническая иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов / А. В. Караулов. - М.: Изд-во Медицинское информационное агентство, 1999. – 604 с.
17. Щеплягина Л.А. Секреторный иммуноглобулин А в формировании местного иммунитета в детском возрасте / Л.А. Щеплягина // Лечение и профилактика . – 2016. - № 3(19). – С. 49-55.

18. Козлов И.Г. Микробиота, мукозальный иммунитет и антибиотики: тонкости взаимодействия Регулярные выпуски «РМЖ» №8(1) от 15.08.2018 стр. 19-27
19. Потемкина Е. Е. Пособие по лабораторной клинической иммунологии / Е. Е. Потемкина, Р. З. Позднякова, Л.Е.Манукян. – М.: Изд-во РУДН, 2003. – 283 с.

Імуноферментне визначення концентрації секреторного IgA (sIgA) в біологічних рідинах людини в клінічних, діагностичних та науково-дослідних лабораторіях.

Лабораторна робота № 2

План заняття:

1. Принцип імуноферментного аналізу (ІФА).
2. Приготування реактивів і обладнання для проведення аналізу.
3. Техніка постановки ІФА.
4. Облік результатів.
5. Контроль якості.

Практичні навички:

- вміння приготувати реактиви;
- вміння працювати з обладнанням (ІФА-аналізатором), програмувати відповідно до завдань;
- при ручному розрахунку результатів вміти побудувати калібрувальну криву визначення sIgA;
- вміння провести контроль якості.

Секреторний IgA належить до маркерів так званого місцевого імунітету. Збірка цього секреторного імуноглобуліну відбувається на базальній мембрані лімфоїдних і епітеліальних клітин з попередника секреторного компонента і димера сироваткового IgA в підрядному апараті очей, в стінках органів дихальної, травної, статевої систем. Це пояснює інтерес практичних лікарів до визначення sIgA в таких біологічних рідинах як сльози, слина,

бронхоальвеолярний лаваж, секрет цервікального каналу, копрофільтратах та інших. Зміна кількості sIgA (як правило, його зменшення) в цих аналітах дозволяє оцінити стан секреторного імунітету в різних органах при їх патології, а також контролювати динаміку лікування.

Незважаючи на те, що синтез sIgA відбувається тільки в епітеліальних клітинах слизових і гепатоцитах, він виявляється і в сироватці крові.

Відомо, що підвищений вміст sIgA спостерігається в сироватці крові (дорослих і дітей) хворих на інфекційні та соматичні захворювання: пухлини кишечника і молочної залози, гострі кишкові і респіраторні інфекції. При цьому збільшення вмісту sIgA в крові пов'язано не з пошкодженням епітелію шлунково-кишкового і респіраторного трактів, а з посиленням його синтезу в пошкоджених органах.

О.Ф. Мельниковим висловлена гіпотеза про можливість діагностики стану імунної недостатності організму неінвазивним методом по визначенню імуноглобулінів та інших захисних білків в секретах організму, які прямо або опосередковано контактують із зовнішнім середовищем. Основу концепції становить гіпотеза про те, що для організму людини найбільш важливим є збереження рівноважного стану слизових оболонок з макросвітом і мікроорганізмами, що вимагає більше локальних захисних білків, ніж сироваткових. З багатьох відомих гуморальних механізмів захисту слизових оболонок найбільш ефективними сьогодні визнані імуноглобуліни (антитіла) класу А, перш за все полімерні форми. Відхилення (як правило, зниження) в концентрації їх основних форм, а також зміни в співвідношенні представників окремих класів імуноглобулінів та інших захисних білків, наприклад лактоферину і лізоциму, можуть бути підставою для діагностики імунної недостатності (вторинного імунодефіциту).

Принцип методу оснований на двохстадійному «сендвіч»- варіанті твердофазного імуноферментного аналізу з використанням моноклональних антитіл до секреторного компоненту sIgA і до α - ланцюга IgA.

Під час першої інкубації відбувається зв'язування sIgA, що міститься в аналізованому зразку, з моноклональними антитілами до секреторного компоненту sIgA, іммобілізованими на внутрішній поверхні лунок.

Під час другої інкубації кон'югат моноклональних антитіл до α – ланцюга IgA з пероксидазою хрому зв'язується з sIgA, іммобілізованими в ході першої інкубації.

Імунні комплекси, що утворилися «іммобілізовані моноклональні антитіла - sIgA - кон'югат», виявляють кольоровою реакцією з використанням субстрату пероксидази - перекису водню і хромогену - тетраметилбензидину. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації sIgA в аналізованому зразку. Після вимірювання величини оптичної щільності розчину в лунках на підставі калібрувального графіка визначають концентрацію sIgA в аналізованих зразках.

Реактиви: Для визначення sIgA в змивах слизової, слині, ротової рідини та ін. секретах використовуються тест-системи «IgA секреторний - ІФА - БЕСТ» (Новосибірськ).

Специфічність аналізу. У наборі «IgA секреторний - ІФА - БЕСТ» використовуються моноклональні антитіла, що володіють високою специфічністю до sIgA. Перехресного зв'язування з IgM, IgG, IgA, IgE або альбуміном в фізіологічних концентраціях не спостерігалось.

Чутливість аналізу - 0,35 мг / л.

Тривалість аналізу - 1 год. 25 хв.

Забезпечення отримання правильних результатів аналізу

Достовірність і відтворюваність результатів аналізу залежать від виконання таких основних правил:

- для дезінфекції досліджуваних зразків, посуду і матеріалів, що контактують з досліджуваними і контрольними зразками, слід використовувати дезінфікуючі засоби, що не роблять негативного впливу на якість ІФА, наприклад, комбіновані засоби на основі ЧАС (четвертинних амонієвих

сполук), спиртів, третинних амінів. Використання дезінфікуючих засобів, що містять активний кисень і хлор (перекис водню, деохлор, хлорамін), в приміщеннях, де проводять ІФА, призводить до серйозного спотворення результатів;

- не проводьте ІФА в присутності парів кислот, лугів, альдегідів або пилу, які можуть змінювати ферментативну активність кон'югатів;

- ферментативна реакція чутлива до присутності іонів металів, тому не допускайте контактів будь-яких металевих предметів з кон'югатом і розчином ТМБ;

- уникайте забруднення компонентів набору мікроорганізмами і хімічними домішками, для цього використовуйте в роботі чистий посуд і чисті одноразові наконечники для кожного реагенту, контролю, зразка;

- робочі поверхні слід обробляти 70% етиловим спиртом (не допускається використання перекису водню, хлорвмісних розчинів);

Вимоги до зразків

На один аналіз потрібно по 20 мкл різних біологічних рідин людини.

При необхідності зразки різних біологічних рідин можна тривалий час зберігати при мінус 20°C (до 6-ти місяців). Після розморожування їх ретельно перемішують, осад відокремлюють центрифугуванням. Теплова обробка зразків повинна бути виключена, оскільки вона може призвести до часткової денатурації sIgA.

Термін зберігання зразків - не більше 48 год при 2-8 ° С.

Копрофільтрат.

Копрофільтрат (екстракт 20% -ної суспензії фекалій) готують наступним чином: зразки фекалій збирають в стерильні флакони (пробірки) з пробкою місткістю 10 мл, 1 г зразка струшують з 5,0 мл розчину для промивання до отримання гомогенної суспензії, потім центрифугують при 3000 об / хв протягом 30 хв. sIgA досліджують в надосадовій рідині (копрофільтратах).

Термін зберігання копрофільтратів - не більше 24 ч.

Підготовка реагентів

Перед проведенням аналізу розкрити упаковку набору, витягти всі компоненти, в тому числі і запечатаний пакет з планшетом. Витримати всі компоненти набору і аналізовані зразки при температурі від 18 до 25°C не менше 30 хв.

При дробовому використанні набору після відбору частини вмісту флакони і пробірки негайно щільно закрити, помістити в холодильник і зберігати при 2-8°C в межах терміну придатності набору.

Калібрувальні та контрольний зразки, кон'югат, розчин тетраметилбензидину і стоп реагент готові до використання і не вимагають додаткового розведення.

Перед проведенням аналізу пробірки з калібрувальними і контрольним зразками струсити або центрифугувати на мікроцентрифузі так, щоб краплі розчинів зі стінок і кришки опустилися на дно. Потім вміст пробірок ретельно перемішати на вортексі або піпетуванням. Не допускати утворення піни!

Увага! Перед використанням всі розчини ретельно перемішати!

Підготовка планшета

Розкрити пакет вище замку і встановити на рамку необхідну для проведення аналізу кількість стрипів. Решта невикористаних стрипів негайно помістити знову в пакет з волагопоглиначем, видалити з нього повітря, щільно закрити замок і помістити в холодильник.

Зберігання: при температурі від 2 до 8°C протягом усього терміну придатності набору.

Підготовка зразків

При визначенні sIgA за допомогою набору реагентів «IgA секреторний - ІФА - БЕСТ» рекомендується використовувати наступні розведення зразків (див. табл. 1.2): сироватки крові - 1/100; бронхоальвеолярної рідини (БАР) - 1/100; назальних змивів (НЗ) - 1/500; вагінального секрету (ВС) - 1/1000;

копрофільтратів (К) - 1/1000; слізної рідини (СР) - 1/2000; слини - 1/2000 (при необхідності підбір розведень проводять самостійно).

Таблиця 1.2

Коефіцієнти для різних біологічних рідин

Біологічна рідина	Розведення в ІФА	Коефіцієнт розведення (k)
Сироватка крові	1: 100	1
Бронхоальвеолярна рідина	1: 100	1
Назальний секрет	1: 500	5
Вагінальний секрет	1: 1000	10
Копрофільтрат	1: 1000	10
Слина	1: 2000	20
Слізна рідина	1: 2000	20

Зразки розводять розчином для розведення сироваток (PPC).

Розведення сироваток і БАР здійснюється в 2 стадії: спочатку в 10 разів на окремому планшеті для титрування, потім ще в 10 раз безпосередньо в лунках стрипів для імуноаналізу з набору.

Розведення назальних змивів, слини, вагінального - 3 етапно. В окремому планшеті для титрування НС розводиться спочатку в 5 разів, ВС або К в 10 разів, слина і СР в 20 разів. Потім розведені зразки вдруге розводять в 10 разів, так само в окремому планшеті (отримуючи розведення в 50, 100, 200 раз секрету, слізної рідини і копрофільтратів проводиться відповідно). Третє розведення цих аналітів в 10 разів (до кінцевих розведень - 1 / 500, 1 / 1000 або 1/2000) відбувається в лунках стрипів з набору.

Якщо концентрація sIgA в аналітах перевищує 20 мг/л, зразок для повторного дослідження рекомендується додатково розвести в 2, 4, 8 разів.

Приготування промивного розчину

Розчин для промивання приготувати розведенням вихідного концентрату ФСБ-Т в 25 разів. Для цього відповідно до числа використовуваних стрипів (див. таблицю 1 інструкції до набору - витрати компонентів) внести в мірний циліндр необхідну кількість концентрату ФСБ-Т і довести до відповідного обсягу дистильованою водою.

При випаданні осаду солей в концентраті необхідно прогріти його при температурі від 30 до 40 °С до повного розчинення осаду.

Зберігання: не більше 5 діб при 2-8 °С.

Підготовка кон'югата

Кон'югат готовий до використання. Відповідно до числа стрипів, які будуть використані, відібрати в чистий флакон або в пластикову ванночку для реагенту необхідну кількість кон'югату.

Підготовка розчину тетраметилбензидину (ТМБ)

Розчин ТМБ готовий до використання. Виключити вплив прямого світла на розчин тетраметилбензидину відповідно до числа стрипів, які використовуємо, (див. таблицю витрати компонентів в інструкції до набору) відібрати необхідну кількість розчину ТМБ в чистий флакон або в пластикову ванночку для реагенту.

Увага! Для роботи з розчином ТМБ необхідно використовувати тільки одноразові наконечники. Посуд, призначений для розчину ТМБ, не можна відмивати із застосуванням синтетичних миючих засобів, оскільки навіть їх сліди ведуть до неконтрольованого окислення ТМБ в ході реакції. Після роботи посуд обполоснути водою, промити 70% етиловим спиртом і ретельно відмити дистильованою водою.

Проведення ІФА

1. Внесення РРС та зразків. В лунки стрипів, що призначені для калібрувальних і контрольного зразків, внести по 80 мкл РРС; в лунки, які використовуються для аналізованих зразків, внести по 90 мкл РРС.

Внести в дублях, починаючи з верхніх лунок перших двох стрипів, по 20 мкл калібрувальних зразків 0, 1, 2, 5, 10 і 20 мг/л. У наступну пару лунок внести по 20 мкл контрольного зразка.

Після внесення зразка в лунку, її вміст перемішати круговими рухами наконечника піпетки, яким вносили зразок, з одночасним 3-4-х кратним піпетуванням.

В лунки стрипів, які містять 90 мкл РРС, додати по 10 мкл попередньо розведених зразків різних біологічних рідин.

Для підвищення достовірності результатів аналізу досліджувані зразки рекомендується вносити в дублях.

Час внесення зразків не повинний перевищувати 10 хв при використанні всіх лунок планшета.

2. Інкубація

Стрипи заклеїти плівкою і інкубувати в термостаті при температурі 37 ° С протягом 30 хв.

3. Промивання

Після закінчення інкубації зняти липку плівку і помістити її в посудину з дезінфікуючим розчином. За допомогою промивного пристрою промити лунки планшета 5 разів розчином для промивання, чергуючи аспірацію і негайне заповнення лунок кожного стрипа. У кожен лунку вносити не менше 350 мкл промивного розчину в процесі кожного циклу промивання. Необхідно домагатися повного спорожнення лунок після кожного їх заповнення. Після закінчення промивання залишки вологи з лунок ретельно видалити, постукуючи перевернутим планшетом по фільтрувальному паперу.

4. Внесення кон'югату

В лунки планшета внести по 100 мкл кон'югату.

5. Інкубація

Стрипи заклеїти плівкою і інкубувати в термостаті при температурі 37 ° С протягом 30 хв.

6. Промивання

Після закінчення інкубації промити планшет 5 разів як описано вище.

7. Внесення ТМБ

Внести до всіх лунок по 100 мкл розчину тетраметилбензидину.

Для внесення розчину ТМБ використовувати пластикову ванночку і одноразові наконечники, що входять до складу набору.

8. Інкубація

Стрипи заклеїти плівкою і інкубувати в захищеному від світла місці протягом 25 хв при температурі 18-25 ° С.

9. Внесення стоп-реагенту

Внести до всіх лунок по 100 мкл стоп-реагенту з тією ж швидкістю і в тій же послідовності, як і розчин тетраметилбензидину.

10. Проведення вимірювань

Виміряти оптичну щільність за допомогою спектрофотометра в двохвильовому режимі: основний фільтр - 450 нм, референс-фільтр - в діапазоні 620-655 нм. Допускається вимірювання тільки з фільтром 450 нм.

Вимірювання проводити через 2-3 хв після зупинки реакції. Час між зупинкою реакції і вимірюванням оптичної щільності не повинен перевищувати 10 хв.

Умови правильності роботи набору

Враховувати, якщо будуть виконані наступні умови:

- співвідношення оптичної щільності калібрувальних зразків: $O_{\text{Ц}0} < O_{\text{Ц}1} < O_{\text{Ц}2} < O_{\text{Ц}5} < O_{\text{Ц}10} < O_{\text{Ц}20}$;
- $O_{\text{Ц}20} \geq 1,2$ од. опт. щільності;
- $O_{\text{Ц}0} \leq 0,2$ од. опт. щільності;
- обчислені за калібрувальним графіком значення концентрацій sIgA в контрольному зразку не виходять за межі значень, зазначених на етикетці флакона.

ОЩ0, ОЩ1, ОЩ2, ОЩ5, ОЩ10 і ОЩ20 - середнє значення оптичної щільності калібрувальних зразків 0; 1, 2, 5; 10 і 20 мг / л відповідно.

Розрахунок результатів аналізу

За результатами вимірювання обчислити середнє арифметичне значення оптичної густини (ОГ) у лунках з аналізованими зразками.

Побудувати калібрувальний графік залежності оптичної щільності (вісь ординат) від концентрації sIgA (вісь абсцис) в калібрувальних зразках. Для цього на доданому трафареті для побудови графіка проти концентрації кожного калібрувального зразка відкласти відповідне їй середнє значення оптичної щільності. Послідовно з'єднати отримані точки прямими лініями

Визначити концентрацію sIgA в контрольному зразку і аналізованих зразках за калібрувальним графіком. Для цього на осі ординат відзначити середнє значення ОГ аналізованого зразка. Провести пряму лінію, паралельно осі абсцис, до перетину з калібрувальним графіком. Від точки перетину опустити перпендикуляр на вісь абсцис. За отриманою точкою перетину визначити значення концентрації sIgA в зразку.

Залежно від ступеня розведення аналізованих зразків концентрації sIgA (визначені за графіком) множать на різні коефіцієнти (k). Розведення 1: 100 відповідає $k = 1$, розведення 1: 200 - $k = 2$ і т.д.

Наприклад, якщо необхідно визначити концентрацію sIgA в слині (розведення 1: 2000), то отримане (за графіком) значення концентрації sIgA необхідно помножити на $k = 20$.

Якщо концентрація sIgA в аналізованому зразку перевищує 20 мг / л, то даний зразок аналізують повторно після додаткового розведення (в 2, 4, 8 разів). Отриманий результат множать на k, відповідний розведенню зразка, а потім на величину додаткового розведення (2, 4, 8).

При динамічному спостереженні пацієнта для отримання результатів, які адекватно відображають зміну концентрації sIgA в крові, необхідно

використовувати набори реагентів одного найменування (одного підприємства-виробника).

Діагностичне значення. Секреторний IgA, як і інші імуноглобуліни, відноситься до гуморальних чинників імунітету.

Карта гуморального імунітету досить індивідуальна, проте, межі нормальних фізіологічних концентрацій досить добре окреслені для дорослих і дітей (див. табл. 1.2 і 1.3).

Як випливає з таблиць, дані різних авторів по нормам для деяких біологічних середовищ (секретів і виділень) істотно розрізняються.

Таблиця 1.3

Концентрація sIgA в біологічних рідинах здорових донорів

Концентрація sIgA мг/л	Біологічна рідина
1,69–5,47	Сироватка крові
1,3–13,3	Бронхоальвеолярний лаваж
14,6±9,5	Сеча
57,87–112,19	Вагінальний секрет
115,97–317,39 мкг/г фекалій	Копрофільтрат
115,3–299,7	Слина
161–371	Слізна рідина
71±22	Назальний змив
2210±1010	Еякулят
1310±1870	Ларингеальний секрет

Результати аналізу можуть залежати від багатьох причин: від прийнятого в лабораторії стандарту забору зразка для аналізу, від методики підготовки пацієнта до аналізу (наприклад, стимульована або не стимульована слина), від складу досліджуваної вибірки, від методики пробопідготовки і т.д.

Тому, наведені показники можна використовувати тільки як орієнтовні, і в кожній лабораторії рекомендується обчислити власні границі нормальних значень концентрації загального sIgA в різних біологічних пробах.

Контроль якості методу

На попередньо побудованій карті Шухарта, відкладається величина контрольної сироватки при кожній постановці.

Питання для обговорення:

1. Принцип методу ІФА.
2. Вимоги до забезпечення отримання правильних результатів аналізу.
3. Вимоги до зразків.
4. Етапи проведення ІФА.
5. Умови правильності роботи набору для проведення ІФА .
6. Розрахунок результатів аналізу.
7. Діагностичне значення визначення sIgA в різних біологічних пробах.
8. Концентрація sIgA в біологічних рідинах здорових донорів.

Використана література

1. Кукайн Э.М. Способы обнаружения секреторного иммуноглобулина А в биологических жидкостях человека / Э. М. Кукайн, Л. Б. Хазенсон // ЖМЭИ. – 1978. - №2. - С. 56–61.
2. Кукайн Э.М. Основы иммунитета и занятия физическими упражнениями / Э. М. Кукайн, Л. Б. Хазенсон, А. Н. Рыбкин // ЖМЭИ. – 1977. - № 8. - С. 106–111.
3. Мельников О.Ф. Концепция диагностики иммунной недостаточности на основе определения уровня защитных белков в секретах / О.Ф.Мельников, Д.И. Заболотный // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2006.- №3 (4).
4. IgA секреторный-ИФА-БЕСТ № ФСР 2010/07853 Набор реагентов для иммуоферментного определения концентрации секреторного иммуноглобулина А (sIgA).

ТЕМА 2. ІМУННА СИСТЕМА КИШЕЧНИКА

Вступ

Кишечник містить найбільший і найскладніший відділ імунної системи, постійно піддаючись впливу великої кількості різних антигенів, а тонкий кишечник людини має площу майже 400 м², приблизно в 200 разів більшу за площу шкіри. Багато важливих збудників хвороб використовують кишечник як шлях для проникнення, включаючи ВІЛ, бактерії та віруси, що викликають діарейну хворобу, і кілька груп багатоклітинних паразитів. Ще більша кількість антигенів походить від нешкідливих джерел, таких як харчові білки та комменсальна мікробіота. Імунна система кишечника повинна розрізняти ці різні види антигенів. Хоча такі антигени повинні генерувати захисні імунні реакції проти патогенів, активний імунітет проти нешкідливих матеріалів був би марним. Дійсно, реакції гіперчутливості до дієтичних антигенів або коменсальних бактерій можуть привести до захворювань, таких як целіакія та хвороба Крона, відповідно. Такі розлади зустрічаються рідко, оскільки в нормі реакцією на нешкідливі антигени в кишечнику є індукція імунологічної толерантності. У разі харчових білків толерантність впливає як на місцеві, так і на системні імунні відповіді, тоді як толерантність до коменсальних мікробів впливає лише на кишечник, можливо, тому, що ці антигени, здається, не піддаються дії системної імунної відповіді в нормальних умовах.

Окрім масштабу та складності антигенного навантаження, імунна система кишечника має кілька унікальних характеристик, які роблять її досить важливим відділом імунної системи. До них належать молекулярні механізми, що контролюють онтогенез вторинних лімфоїдних органів, пов'язаних з кишечником, характер місцевої вродженої відповіді, клітини та процеси, що беруть участь в поглинанні антигену, а також ефекторні та регуляторні ланцюги адаптивного імунітету. Тут ми опишемо як ці механізми об'єднуються для підтримки гомеостазу кишечника і захисту його від патогенної інвазії.

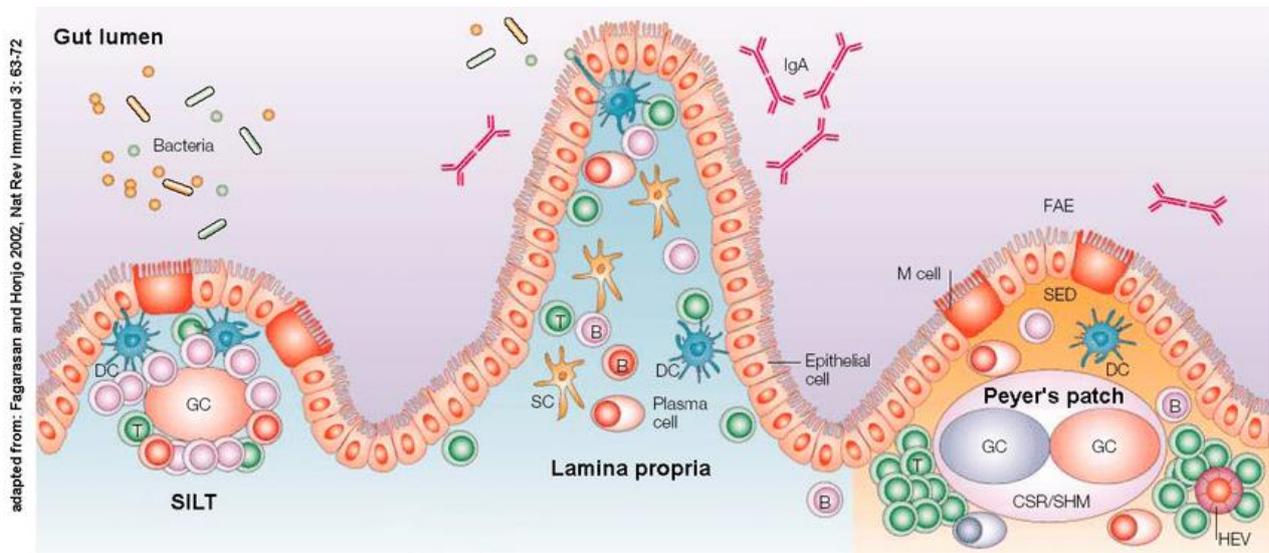


Рис.2.1. Основні елементи імунної системи кишечника. Мезентеріальні лімфатичні вузли (MLN) не зображені, хоча їх зазвичай класифікують як такі, що належать до кишкового відділу імунної системи. Дендритні клітини (DC) зображені синім кольором, стромальні клітини власної пластинки (SC) помаранчевим кольором, Т-клітини (Т) - зеленим, наївні IgM-позитивні В-клітини (В) / В-клітинні фолікули - рожевими, IgA-позитивні В-клітини (В) / плазматичні клітини / зародкові центри червоним кольором, а IgG-позитивні плазматичні клітини / зародкові центри сірувато-блакитним кольором. SILT, solitary intestinal lymphoid tissue – солітарна кишечна лімфоїдна тканина (поодинокі фолікули кишкової лімфоїдної тканини), HEV - high endothelial venule, висока ендотеліальна венула, SED, субепітеліальний купол, FAE, фолікулярний епітелій, М-клітина, мікроскладчата клітина, CSR, рекомбінація з переключенням класу, SHM, соматична гіпермутація.

Кишечник та його імунний апарат

Розсіяні імунні клітини в кишечнику

Велика кількість імунних клітин виявляється розкиданими по всій слизовій оболонці кишечника, як в епітелії, так і в LP. Вони включають ефекторну ланку локальної імунної відповіді і досить різні типи клітин зустрічаються у двох відділеннях. В той час як LP дуже високогетерогенні,

містять плазматичні клітини, CD4+ і CD8+, Т-клітини, вроджені лімфоїдні клітини (ILC - innate lymphoid cells) макрофаги, DC і еозинофіли, епітелій містить лише Т-клітини, більшість з яких - CD8+. Слизова також стікає до місцевих лімфатичних вузлів через аферентні лімфатичні протоки і також може брати участь у підготовці імунних відповідей.

Вроджені імунні відповіді в кишечнику

Вроджена імунна система забезпечує критичну першу лінію захисту в будь-якій тканині, подібно до того як кишечник, який знаходиться під постійним випробуванням.

Епітеліальний бар'єр

Хоча сам епітелій тонкий і крихкий, він є важливим бар'єром для вторгнення через щільні стики між абсорбційними епітеліальними клітинами. Бар'єру сприяє товстий шар слизу, що покриває поверхню епітелію, особливо товстої кишки. Слиз складається з складної суміші високо глікозильованих білків муцину та виробляється спеціалізованими епітеліальними клітинами, відомими як келихоподібні клітини.

У товстій кишці слиз знаходиться у двох шарах, внутрішньому шарі, який щільно прикріплений до поверхні епітелію і непроникний для бактерій разом із зовнішнім пухким шаром. У тонкому кишечнику присутній лише пухкий слиз.

Щільна структура слизу утворює міцний фізико-хімічний бар'єр проти збудників інфекцій, а слиз також діє як платформа для утримання секретованих антитіл та антимікробних медіаторів. Оскільки слиз також легко аглютинує, він дуже ефективно затримує і видаляє прикріплених мікробів. Вироблення слизу стимулюється наявністю інфекції, особливо складом паразитів, та власне і самі білки муцину мають антимікробні властивості. З цих причин слиз є одним з найбільш важливих захисних механізмів кишечника, дефекти у слизі підвищують сприйнятливість до запалення та інфекцій.

Інші важливі вроджені медіатори імунної відповіді в кишечнику включають лізоцим та різноманітні антимікробні пептиди (АМП), такі як

дефензини та regIIIg. Ці АМП є цитотоксичними для широкого спектра патогенних мікроорганізмів і виробляються спеціальною популяцією епітеліальних клітин, відомих як клітини Панета, виявленою на основі крипт, переважно в тонкому кишечнику. Виробництво АМП стимулюється цитокином IL-22, який секретується CD4+ Т клітинами та ILC.

Епітелій також бере участь у розпізнаванні місцевих агентів та індукції вродженого імунітету, які експресують патерн розпізнавальні рецептори, такі як Toll-подібні рецептори (TLR) та Nod-подібні рецептори (NLR). Внутрішньоклітинний рецептор бактеріальних пептидогліканів, Nod-2 достатньо вивчений, оскільки це ген сприйнятливості до ряду хвороб. Nod-2 експресується як імунними клітинами, так і епітеліальними клітинами, але до кінця незрозуміло які функції він виконує. Вірогідно, він регулює TLR-опосередковані цитокинові реакції на бактерії, а також важливий для аутофагії клітин Панета - процесу, який також бере участь у захисті від бактерій. Гени, що кодують компоненти ATG16L-1 та IRGM є додатковими факторами сприйнятливості до хвороби Крона, висвітлюючи зв'язок між антибактеріальним захистом та запальною хворобою кишечника (IBD).

Як відомо, епітеліальне вистилання кишечника включає 6 різних типів клітин: ентероцити, келихоподібні клітини, ентероендокринні клітини, клітини Панета, пучкові клітини (tuft cells) та М-клітини. Ці клітини в тій абоіншій мірі беруть участь в захисній функції слизової оболонки.

Міелоїдні ефекторні клітини в кишечнику

Клітини міелоїдного ряду у великій кількості присутні в нормальній слизовій кишечника, особливо макрофаги, ДК та еозинофіли, тоді як нейтрофіли зустрічаються рідко, якщо нема запалення.

Хоча кишкові макрофаги мають кілька особливостей коли вони високо активовані, зокрема їм притаманна фагоцитарна активність та експресія МНС класу II, в той же час вони не реагують, виробляючи типові медіатори макрофагів, такі як TNF, IL-6 або реактивні види O₂ при стимуляції такими

агентами, як бактерії або ліганди TLR. Це тому, що вони виробляють велику кількість IL-10 конститутивно, що блокує генерацію прозапальних реакцій. Окрім фагоцитування, макрофаги слизової оболонки експресують високий рівень скавенджер-рецепторів і виробляють медіатори, що сприяють оновленню епітеліальних клітин. Макрофаги можуть виконувати дві особливі функції в кишечнику. Розташовані безпосередньо під епітелієм, вони знаходяться в ідеальному положенні для поглинання та знищення будь-яких коменсальних або інших організмів, які виходять з просвіту. Ця функція насправді може бути другорядною у порівнянні з фізіологічною роллю бар'єрної функції, яка передбачає очищення, видалюючи ефективні епітеліальні клітини, які виробляють фактори росту і сприяють ремоделюванню тканин. Важливо те, що виробництво IL-10 дозволяє цим діям протікати без запалення. Також було показано, що виробництво IL-10 макрофагами слизової оболонки необхідно для виживання регуляторних T-клітин (Tregs) в кишечнику, додаючи ще один спосіб, яким макрофаги допомагають підтримувати місцевий гомеостаз.

На відміну від багатьох інших резидентних тканинних макрофагів, ті, що знаходяться в кишечнику вимагають постійного поповнення моноцитами крові, ймовірно, відображаючи необхідність постійного моніторингу цієї тканини. Після надходження в слизову оболонку моноцити диференціюються під контролем місцевого середовища, поступово набуваючи своїх протизапальних ролей (функцій). Цей процес зупиняється при запаленні, дозволяючи накопичуватися прозапальним моноцитам та розвитку патології тканин.

В даний час визнано, що в здоровому кишечнику знаходиться багато еозинофілів, які зазвичай асоційовані з алергічними реакціями та глистними інфекціями. Їхні функції не визначені, але вони можуть створювати посередників, які сприяють розвитку інших місцевих імунних клітин, таких як плазматичні клітини, що продукують IgA, FoxP3⁺ Tregs та DCs, а також індукують міграцію DC слизових оболонок до MLN. І навпаки, медіатори,

отримані з еозинофілів, можуть бути важливими при запаленні або наявній інфекції.

Вроджені лімфоїдні клітини

Вроджені лімфоїдні клітини мають велике значення для імунітету кишечника. Найчисленнішими з них є ILC3 NKp46+, які виробляють IL-17 та IL-22 у відповідь на мікробні продукти та цитокіни, такі як IL-1, IL-6 та IL-23. Кишкові ILC3 містяться в LP, де вони відіграють важливу роль на ранніх стадіях захисту від інфекції шляхом «залучення» нейтрофілів, стимулюючи вироблення AMP та посилення щільних з'єднань між епітеліальними клітинами. При запальних станах наявність IL-12 може спонукати ILC3 виробляти IFN- γ на додаток до IL-17 і, таким чином, сприяти пошкодженню тканин. ILC1, що продукують IFN- γ , також є в кишечних LP і епітелії, але ILC2, що продукують IL-5 / IL-13, зустрічаються рідко.

Кишкові ДК

Кишкові ДК мають кілька незвичних властивостей, зокрема ті, які знайдені в слизових LP. Більшість із них виражає α E-інтегрин (CD103), пов'язаний з β 7-інтегрином, і саме ці DC103+ відповідають за виробництво RA в результаті метаболізму дієтичного вітаміну А. Крім того, індукуючи експресію інтегрину CCR9 та α 4 β 7 на лімфоцитах, RA дозволяє CD103+ DCs керувати диференціацією FoxP3+Treg в стаціонарних умовах. Таким чином, вважається, що покоління Tregs кишечника і DCs є механізмом, що лежить в основі толерантності до нешкідливих антигенів в здоровому кишечнику. Існує дві популяції CD103+ DCs в LP. Одна ідентична CD103+ DC11b⁻ DC, знайдена в інших тканинах миші, які експресують XCR1, залежить від фактора транскрипції Batf3 і є відповідальною за CD8+ Т-клітини.

Іншою є XCR1⁻ є CD11b⁺ у мишей і унікальна для кишечника, формуючи більшість популяції в тонкому кишечнику LP. Обидві субпопуляції CD103+ виробляють RA, але невідомо, чи і як кожна з них може сприяти індукції толерантності *in vivo*. Фактично дослідження у мишей показують, що

відсутність CD103+CD11b+DC пов'язана з селективним дефектом у запальних Th17 клітин і має незначний вплив або зовсім не впливає на кількість Tregs. У звичайних LP також є CD103⁻DCs. Вони показують здатність CD103⁺ DCs мігрувати в дренажну систему до MLN і можуть також виробляти RA, але вони, схоже, спеціалізовані в індукції прозапальних T-клітин, а не Tregs. Усі ці підтипи DCs також присутні в PPs, хоча CD103⁺DCs зустрічаються набагато рідше і функції *in vivo* різних популяцій PP DCs достеменно не зрозумілі.

М-клітини шлунково-кишкового тракту та їх роль у формуванні місцевої імунної відповіді

Особлива роль в імунній системі кишечника належить мікроскладчатим клітинам (М-клітинам) фолікуло-асоційованого епітелію, який покриває люмінальні поверхні пейєрових бляшок. Епітелій в області пейєрової бляшки містить 5-10% М-клітин.

М-клітини є різновидом ентероцитів, вони розташовуються на поверхні групових лімфатичних фолікулів (пейєрових бляшок) і поодиноких лімфатичних фолікулів. М-клітини легко ідентифікуються на склепіннях пейєрових бляшок, де впорядковано розташовані між сусідніми епітеліальними клітинами. Ці клітини мають сплющену форму, малу кількість мікрворсинок і отримали свою назву в зв'язку з наявністю на їх апікальній поверхні мікроскладок. За допомогою мікроскладок вони здатні захоплювати макромолекули з просвіту кишки і формувати ендцитозні везикули, які транспортуються до базолатеральної плазмолемі і далі в міжклітинний простір. Таким чином можуть надходити з порожнини кишки антигени, які залучають лімфоцити, що стимулює імунну відповідь в лімфоїдній тканині кишечника.

Більшість етапів утворення асоційованої зі слизовою лімфоїдної тканини схожа з генезом периферичних лімфатичних вузлів, включаючи лімфатичний васкулогенез, васкуляризацію і колонізацію первинних лімфоїдних структур лімфоїдними попередниками і клітинну організацію лімфоїдних структур в функціонально різних областях. Делеція деяких генів зачіпає в основному

формування пейєрових бляшок, залишаючи інтактними лімфатичні вузли, тоді як інші мутації випереджають розвиток лімфатичних вузлів.

Локалізація пейєрових бляшок в строго певних ділянках травного тракту детермінована генетично і простежується в період ембріогенезу. Приблизно на 12,5 день ембріогенезу, відбувається формування лімфатичної васкулатури з венозних нирок, які зливаються в лімфатичні мішки. Відбрунькування і розростання венозних ендотеліальних клітин і дає лімфатичну васкулатуру. Ранні зачатки лімфатичних вузлів виникають в результаті інвагінації мезенхімної тканини в мішкоподібні розширення формуючих лімфатичних судин.

Кожна крипта в кишечнику є клональною одиницею, що утворює кільце закріплених стовбурових клітин, що генерують різні типи клітин, які диференціюються в міру їх міграції вгору в кілька сусідніх ворсинок. Клітини піддаються запрограмованій загибелі, коли досягають кінчика ворсинки і злущуються в просвіт або фагоцитуються локальними дендритними клітинами, які мігрують для дренажу мезентеричних лімфатичних вузлів.

Подібним чином оновлення фолікуло-асоційованого епітелію (ФАЕ) залежить від проліферації клітин в криптах, оточуючих слизовий лімфоїдний фолікул. ФАЕ ентероцит проходить програму диференціювання, куди входить і утворення М-клітин. Ця програма пов'язана з утворенням базального листка певного складу. Є непрямі докази того, що клітинні контакти і / або розчинні фактори від лімфоїдного фолікула слизової грають важливу роль в індукції М-клітин.

Зустрічаються і клітини з властивостями М-клітин і ентероцитів в ФАЕ, і крім того, число М-клітин може зростати протягом кількох годин після дії бактерій. Це підтверджує, що ентероцити можуть перетворюватися в М-клітини. Втрата епітеліальних клітин на верхівці купола ФАЕ супроводжується апоптозом, але апоптичні М-клітини не виявляються. Можливо, вони

піддаються апоптозу передчасно ще на периферії купола в пейєрових бляшках. Не виключено, що М-клітини реверсують назад в ентероцити.

М-клітини нерідко називають іммуноспостережувальними постами в кишковому епітелії. М-клітини на відміну від сусідніх ентероцитів мають зменшену цитоплазму через наявність базолатеральної кишені. Вони транспортують через апікальну мембрану до базолатеральної поверхні неінфекційні частки, паразитів, віруси і бактерії, включаючи *Brucella abortus*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, поліовіруси, ВІЛ 3, норовіруси, і реовіруси.

Таким чином мікроорганізми використовують трансцитозну активність М-клітин для перетину кишкового епітелію і інфікування господаря. Цікаво, що при передачі через їжу ботулінічний нейротоксин зберігав токсичність після трансцитозу через М-клітину. Захоплені з просвіту кишки антигени, потрапивши в базолатеральну «кишеню» М-клітини, контактують з вкритими під епітеліальним куполом пейєрової бляшки антигенпрезентуючими клітинами. Останні представляють інформацію про антиген Т-клітинам, індукуючи їх диференціювання. CD4 + Т-клітини, в свою чергу, активують В-клітини, що, в кінцевому підсумку, призводить до утворення плазмоцитів і продукції імуноглобулінів.

Оральне інфікування під час відсутності М-клітин (ієрсініями - *Y. enterocolitica*, пріонами, реовірусами і мишачими норовірусами) або блокується або зменшується. Цікаво, що деякі патогени можуть модулювати роль М-клітин при заборі антигену. *Salmonella typhimurium* і R36a штам *Streptococcus pneumoniae* здатні індукувати трансдиференціювання епітеліальних клітин в М-клітини і / або посилювати трансцитозну активність М-клітин, сприяючи інвазії і колонізації господаря. Захоплені з просвіту кишки антигени, потрапивши в «кишеню» М-клітини, контактують з вкритими під епітеліальним куполом пейєрових бляшок антигенпрезентуючими клітинами.

М-клітини вперше були описані в 1965 р. в епітелії апендикса кролика. Спочатку ці клітини були названі лімфоепітеліальні. Надалі при вивченні кишкового епітелію людини було показано наявність мікроскладок на апікальній поверхні клітин. Серед інших особливостей, описаних в даних літератури, необхідно відзначити: тонкий шар глікокаліксу, невелику кількість лізосом і мітохондрій, наявність базолатеральної «кишені», в якій були виявлені дендритні клітини, макрофаги і лімфоцити. Відзначено також ультраструктурні відмінності М-клітин, в залежності від виду тварини і області розташування. Охарактеризовані клітинні фенотипи фолікулярно-асоційованого епітелію і М-клітин. Необхідно підкреслити, що М-клітини є не тільки в кишковому епітелії, але і в епітелії повітроносних шляхів дихальної системи, де сприяють доставці антигенів в імунну систему. Описано щільні контакти і десмосоми між М-клітинами і сусідніми ентероцитами. Щільні контакти функціонують як сито, яке пропускає іони і електроліти, але запобігає перенесенню великих молекул. Це парацеллюлярний шлях, опосередковуючий перенесення речовин (розміром від 0,3 до 1,0 нм) через міжклітинний простір між кишковими епітеліальними клітинами.

М-клітини - головні ворота доставки люмінальних антигенів і ініціатори антигенспецифічних імунних реакцій. При цьому особлива роль належить секреторному IgA, який сприяє поглинанню та доставці антигенів у складі імунних комплексів з просвіту кишечника субпопуляціям дендритних клітин, розташованих в лімфоїдній тканині, асоційованій з кишечником (GALTs), і впливає на запальні реакції, зазвичай пов'язані з поглинанням патогенних мікробів і потенційно алергенних антигенів. Ця властивість sIgA пов'язувати антигени і проникати за допомогою М-клітини в пейєрову бляшку, називається зворотним трансцитозом. У зворотному екзоцитозі sIgA беруть участь рецептор дектин-1 і корецептор Siglec-5, які експресуються на М-клітині. Це реальна можливість доставки антигену в слизову оболонку кишечника, використовуючи sIgA як носій. sIgA, вибірково зв'язуючись рецепторами М-клітин,

переноситься через епітелій до дендритних клітин, присутніх в області субепітеліального купола, в кінцевому рахунку викликаючи їх дозрівання і міграцію в міжфолікулярні області. При цьому sIgA нейтралізує мікроби і ендотоксини в епітеліальних клітинах без пошкодження тканин.

Протягом останніх років з'явилися описи властивостей нових рецепторів на поверхні М-клітин: дектин 1 (з яким селективно зв'язується sIgA), кластерін, катепсина Е, секретогранін V і інші, здатні виконувати певну роль в життєдіяльності М-клітин. Однак їх специфічна функція вивчена недостатньо.

Наявність описаних вище рецепторів на М-клітинах відіграє незвичайну роль. Різні патогени можуть використовувати М-клітини для інфікування організму. Описана роль М-клітин, як вхідних воріт для *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium* підвид *paratuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, ВІЛ, вірусу грипу, поліовірусу і реовірусів. Норовіруси (NoVs) і реовірус проходять кишковий епітеліальний бар'єр через М-клітини. Що стосується реовірусів, то білок сигма 1 ($\sigma 1$) зовнішнього капсида реовірусів зв'язується з альфа ($\alpha 2$, $\alpha 3$) - сіаловою кислотою М-клітин. Реовірус ендочитується М-клітиною і переноситься в її інтраепітеліальну кишеню і субепітеліальну тканину, де може інфікувати багато типів клітин. Незважаючи на те, що «визначення» кишкових антигенів М-клітинами є важливою ланкою для запуску специфічного імунітету, ця функція може робити можливим прохід мікроорганізмів або їх токсинів через епітелій слизової оболонки.

Заключення

Слизова оболонка постійно піддається впливу різних антигенів і мікробіоти та ретельно регулює надходження люмінальних антигенів. Націлювання на молекули, специфічні до М-клітин, може посилювати проникнення антигену, ініціювати імунну відповідь і індукувати захист від мукозальних патогенів. Виходячи з того, що М-клітини активно беруть участь в ініціації імунітету, а також сприяють попаданню вірусів і бактерій в організм, в даний час проводяться численні дослідження з розробки мукозальних вакцин.

М-клітинні специфічні маркери можуть бути використані для доставки антигену в імунні індуктивні сайти слизової оболонки. Кон'югація антигенів з лігандами для рецепторів М-клітин може опосередковувати їх доставку в М-клітини і індукувати посилені імунні відповіді слизової оболонки після перорального введення. М-клітини є ідеальними мішенями для компонентів мукозальних вакцин. Останні забезпечують захист слизових оболонок на додаток до основного імунітету, і являються ідеальною стратегією для запобігання інфекційним захворюванням, більшість з яких ініційовані вторгненням патогенів через слизову оболонку.

Питання для обговорення:

1. Які унікальні характеристики притаманні імунній системі кишечника ?
2. Епітеліальний бар'єр кишечника.
3. Мієлоїдні ефektorні клітини в кишечнику.
4. Вроджені лімфоїдні клітини кишечника.
5. Кишкові ДК.
6. М-клітини шлунково-кишкового тракту та їх роль у формуванні місцевої імунної відповіді.

Використана література

1. Encyclopedia of Immunology. – Editor in Chief Michael J.H. Ratcliffe - 2016 Vol.5. – 523 p.
2. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system /Pelaseyed Th., Joakim H. Bergstro, m Jenny K. Gustafsson et al. // Immunological Reviews. –2014. - 260(1):8-20.
3. Allan M Mowat, William W Agace Regional specialization within the intestinal immune system // Nat Rev Immunol. 2014 Oct;14(10):667-85.
4. Акопова Е.О., Урванцева И.А. М-клетки желудочно-кишечного тракта и их роль в формировании местного иммунного ответа // «Научно-практический

электронный журнал Аллея Науки». – 2017. – Том 1, № 11. – С. 265-270 Alley-science.ru.

5. Бахмет А.А. Морфологическая характеристика селезенки, паховых лимфатических узлов и лимфоидных бляшек тонкой кишки крыс при эмоциональном стрессе и в условиях воздействия некоторых олигопептидов (автореферат диссертации на соискание научной степени доктора медицинских наук – анатомия человека) 2010. – 43 с.

6. Дьяченко Г.Н., Динамика клеточного состава пейеровых бляшек мышей при экспериментальном заражении *Trichinella spiralis* // Мед. паразитология и паразитарные болезни, 1999. -, С. 27-28.

7. М-клетки – один из важных компонентов в инициации иммунного ответа в кишечнике /А.С. Быков, А.В. Караулов, Д.А. Цомартова, Н.Л. Карташкина, В.Л. Горячкина, С.Л. Кузнецов, Д.А. Стоногина, Е.В. Черешнева // Инфекция и иммунитет. - 2018, Т. 8, № 3, с. 263–272.

ТЕМА 3. ФАГОЦИТОЗ. МЕТОДИ ОЦІНКИ ФАГОЦИТАРНОЇ СИСТЕМИ В БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ

Протягом багатьох десятиліть фагоцитоз вважався основною антимікробною стратегією нейтрофілів при інфекційній патології. В процесі розвитку інфекції нейтрофіли виконують свою основну функцію - поглинання мікроорганізмів, власних пошкоджених клітин і продуктів їх розпаду, елімінують їх, використовуючи кисневі і кисневонезалежні механізми.

Історія відкриття фагоцитозу нейтрофілів в 1882 р пов'язана з ім'ям російського мікробіолога І.І. Мечникова, який за це відкриття спільно з П. Ерліхом отримав Нобелівську премію в галузі медицини (1908 р.). Відкриття вченого стало основою формування імунології як науки.

Подальші дослідження фагоцитозу показали, що крім нейтрофілів здатністю до фагоцитозу володіють моноцити (тканинні макрофаги).

Відкриття фагоцитозу І.І. Мечниковим було одним з найбільш вражаючих досягнень молоді тоді ще імунології і він був першим, хто зрозумів значення фагоцитозу як найважливішого механізму несприйнятливості організму до інфекційних захворювань. Воно сильно вплинуло на напрям досліджень і теоретичних побудов принаймні на півстоліття вперед.

Фагоцитоз - це процес поглинання нейтрофілами мікроорганізмів з подальшим їх руйнуванням і виділенням з організму, механізм якого складається з декількох стадій: активація клітини, хемотаксис до мікроорганізму, рецепторне розпізнавання і адгезія до поверхні патогена.

Розпізнавання нейтрофілами мікроорганізмів є пусковим моментом фагоцитозу. Воно засноване на їх розпізнаванні за допомогою поверхневих і внутрішньоклітинних рецепторів. Найбільш значущими рецепторами людини є Toll-подібні рецептори (toll-like receptors, TLR1, TLR2, TLR3 ... TLR10), що мають значну спорідненість в структурі і механізмах дії. Кожен з TLRs зв'язується для розпізнавання зі своїм високо консервативним мікробним

лігандом (хімічною структурою), специфічним для великих груп мікроорганізмів - Pamp (pathogen associated molecular patterns), а також з численними ендogenousними лігандами, що утворюються при пошкодженні власних тканин організму (фібриноген, білки теплового шоку і інші). Наприклад, для TLR1 такими лігандами є ліпопептиди, а для TLR2 - пептидоглікан грампозитивних і грамнегативних бактерій, для TLR4 - ендотоксин грамнегативних бактерій і т.д. (рис. 3.1).

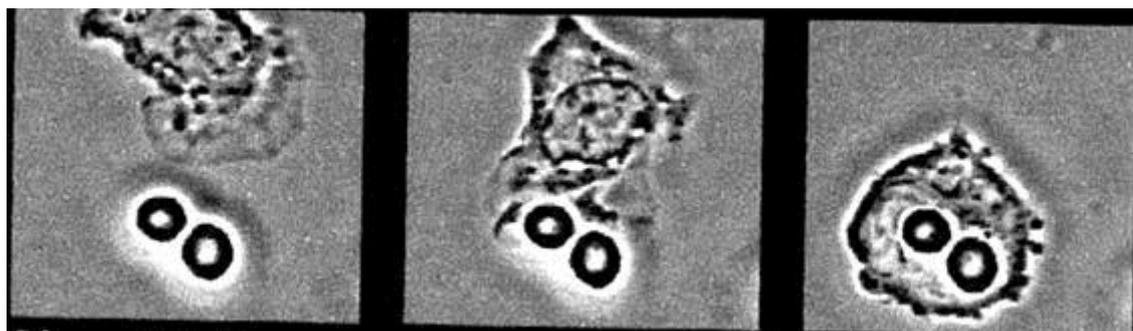


Рис.3.1. Поглинання нейтрофілами мікроорганізмів (фагоцитоз) з утворенням вакуолей.

Фагоцитоз є істотним клітинним механізмом, пов'язаним зі знищенням бактерій вродженою імунною системою. Поглинання патогена і забезпечення високо цитотоксичного середовища всередині фаголізосоми є відмінними ознаками в механізмі вбивства. Це запобігає поширенню бактерій всередині господаря і забезпечує захист від клінічних проявів інфекції. Відомо, що фагоцитоз мікроорганізмів може бути виконаний зокрема двома клітинами вродженої імунної системи: макрофагами і нейтрофілами.

Для адекватної оцінки стану місцевого імунітету велику діагностичну значимість має функціональна активність нейтрофільних гранулоцитів (НГ), про яку судять по здатності до фагоцитозу, перетравлювання і оксидазній

біоцидній активності. Зв'язування TLRs зі специфічними лігандами призводить до активації нейтрофілів, уповільнює їх апоптоз і індукує секрецію цитокінів.

Драматичні та швидкі зміни форми клітини, мабуть, найкраще продемонстрували фагоцити, такі як нейтрофіли. Ці клітини завершують процеси розповсюдження на поверхні та фагоцитозу протягом 100 с після стимуляції. Незважаючи на те, що ці зміни форми клітини супроводжуються явним значним збільшенням площі клітинної поверхні, характер мембранного "резервуару" для додаткової площі незрозумілий.

Одна теорія полягає в тому, що топографія поверхні зморщених клітин (яка утворює мікрореші на поверхні нейтрофілів) забезпечує ресурс для нейтрофілів, щоб розширити свою доступну поверхню. Проте, протестувати це припущення в живих клітинах проблематично, оскільки ці поверхневі структури мікроскопічні.

Топографія поверхні клітин різко змінюється під час зміни форми нейтрофілів, як локально, так і глобально (рис. 3.2) і може спрацьовувати шляхом підйому цитозольного Ca^{2+} .

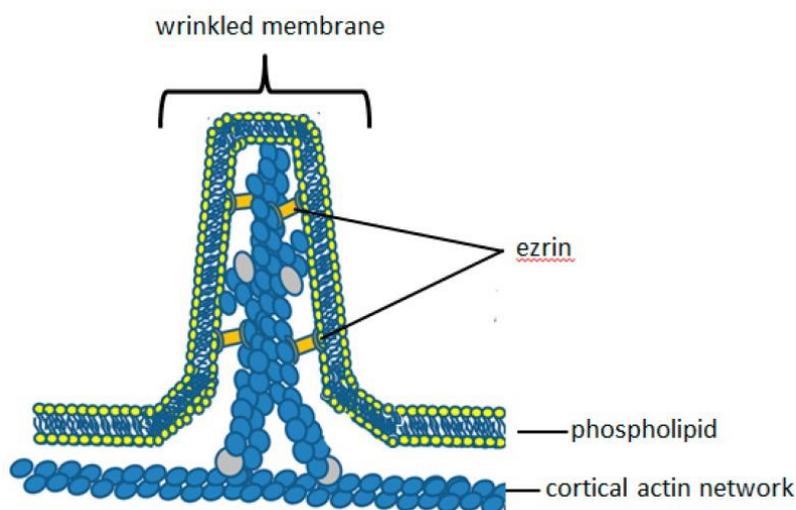


Рис. 3.2. Молекулярна анатомія зморшок на поверхні нейтрофіла.

Показано відносне розташування езрину (у складі зморшок) та коркової актинової мережі.

Як показано на рис. 3.2, езрін зшиває полімеризований актин з плазматичною мембраною і перешкоджає роботі броунівської храпової системи, яка запускає полімеризацію актину для виштовхування плазматичної мембрани. Отже, зморшки є стабільною структурою на клітинній поверхні, яка мало зазнає впливу броунівських ефектів.

Потужним підсилювачем активності нейтрофілів є опсонізація патогенів за участю класичних опсонінов IgG і C3b і нейтрофільних рецепторів FcγRs та лектинів С-типу (манозні рецептори, лектини, скавенджер-рецептори), у відсутності яких фагоцитоз виявляється неефективним. З іншого боку, надмірне тканинне накопичення є поштовхом для виникнення аутоімунної патології, опосередкованої пошкодженням власних тканин організму.

Добре відомо, що фагоцитарна здатність нейтрофілів не є «фіксованою» клітинної характеристикою. На фагоцитоз можуть впливати як зовнішні, наприклад, температура, лікарські засоби, травми, так і внутрішні чинники, наприклад, вік, сепсис, аутоімунне захворювання.

Крім того, маніпуляція *ex vivo* може змінити функцію одного зразка нейтрофілів відносно фагоцитозу.

Встановлено, що фагоцитарна активність нейтрофілів спортсменів залежить від профілю функціональної асиметрії мозку (ФАМ): нейтрофіли «лівшів» проявляли підвищену фагоцитарну активність в порівнянні з нейтрофілами «правшів». Ці відмінності стосувалися в основному дівчат, так як нейтрофіли юнаків - спортсменів з лівостороннім і правостороннім профілем ФАМ не відрізнялися за функціональними показниками.

Крім того, у дівчат «правшів» спостерігалася значна варіабельність показників, що характеризують роботу нейтрофільних оксидаз, і виявлялися чітко виражені тенденції до посилення як спонтанної, так і стимульованої активності останніх.

Виявлені відмінності у функціонуванні нейтрофілів між спортсменами різної статі можуть бути пов'язані з тим, що при фізичних навантаженнях важливу

роль в регуляції нейтрофільних функцій відіграють адренергічні рецептори, а β_2 -адренергічна регуляція функцій нейтрофілів має виражений статевий диморфізм.

Таким чином, встановлені відмінності у функціонуванні нейтрофілів спортсменів з різним профілем ФАМ тісно пов'язані зі статтю спортсменів: нейтрофіли юнаків - спортсменів з лівостороннім і правостороннім профілем ФАМ не відрізняються за функціональними показниками; нейтрофіли дівчат «правшів» мають більш низьку здатність до фагоцитозу опсонізованого зимозана в порівнянні з нейтрофілами дівчат «лівшів».

Визначення функціональної активності фагоцитуючих клітин в рідинах і тканинах організму пов'язано з рядом методичних складностей, які потребують модифікацій методів, що використовують для досліджень фагоцитуючих клітин крові, як по відношенню до техніки постановки реакції, так і по відношенню до оцінки отриманих результатів.

Особливості визначення поглинальної активності нейтрофілів методом фагоцитозу в тканинах і рідинах.

Лабораторна робота № 3

План заняття.

1. Ознайомитись з методами оцінки природної резистентності організму.
2. Приготувати необхідні реагенти.
3. Підготувати зразки для дослідження.
4. Освоїти методи оцінки фагоцитарної активності клітин жовчі.
5. Контроль якості.

Мета роботи: Ознайомитись з методами оцінки природної резистентності організму. Освоїти методи оцінки фагоцитарної активності клітин в тканинах і рідинах.

Практичні навички:

- Для виконання завдань необхідно використовувати теоретичні знання і практичні навички, отримані на попередніх заняттях.
- Вміння приготувати інкубаційне середовище.
- Вміння приготувати фосфатний буфер.
- Вміння приготувати завесь грибів *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* і латекса.
- Вміння приготувати фізіологічний розчин.
- Вміння виділити суспензії клітин (нейтрофіли).
- Вміння приготувати фарбник.
- Вміння користуватися аналітичними вагами.
- Знання основ і проведення контролю якості метода.
- Вміння правильно оформити результати аналізу.

Принцип методу оснований на здатності нейтрофілів поглинати корпускулярні частинки.

Матеріали і обладнання

Реактиви: добова тест-культура мікроорганізмів – *Saccharomyces cerevisiae* (або *C. albicans*), або латекс; фізіологічний розчин або NaCl (сухий); спирт (або суміш Нікіфорова), барвник нейтральний червоний (або Романовського-Гімзе), дистильована вода, стандарт мутності, 2% розчин цитрату натрію або 3 мМ етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА).

Обладнання: термостат, мікроскопи, імерсійне масло, лічильники клітин.

Лабораторний посуд: центрифужні пробірки, піпетки, предметні скельця, чашки Петрі, фільтрувальний папір.

Біологічний матеріал: сироватка крові, жовч, перитонеальний ексудат, дуоденальні виділення, раневий ексудат, гомогенат тканини.

Отримання і обробка рідин і тканин. Підготовка проб:

1. *Отримання жовчі, перитонеального ексудату, дуоденальних виділень:* жовч, перитонеальний ексудат, дуоденальні виділення у об'ємі 1 мл центрифугуємо

при 3000 об/хв протягом 15 хв.

2. *Отримання гомогенатів тканини:* видалену тканину відмиваємо від крові охолодженим до + 4 °С 0,9 % розчином NaCl, гомогенізуємо при + 4 °С з 0,9 % розчином NaCl (у співвідношенні 1:10), який містить 3 мМ ЕДТА.

Підготовка реагентів: 1) напередодні готуємо добову тест-культуру мікроорганізмів – *Saccharomyces cerevisiae* (або *S.albicans*), або латекс; 2) 2% розчин цитрату натрію або 3 мМ ЕДТА 3) барвник нейтральний червоний в концентрації 0,1% (або Романовського-Гімзе в розведенні 1:10).

Хід роботи

Визначення функціональної активності фагоцитуючих клітин жовчі

Нейтрофіли виділяємо з жовчі, з аспірованої порожнини кісти або протокової жовчі, отриманій з загальної жовчної протоки під час операції, або на 1-2, 5-7 добу після неї (у випадках зовнішнього дренивання холедоха). Жовч центрифугуємо при 1000 об/хв протягом 15 хв, надосад зливаємо. Осад ресуспендуємо в охолодженому фізіологічному розчині і двічі відмиваємо, центрифугуємо при 1000 об/хв протягом 10 хвилин. Із осаду готуємо суспензію, гомогенізуючи в 0,05 мл фізіологічного розчину, яку використовуємо для постановки реакції фагоцитозу.

Після постановки методики препарати висушуємо, фіксуємо спиртом і профарбовуємо нейтральним червоним протягом 3 хв.

Для контролю використовуємо препарати жовчі без макроскопічних ознак гнійного холангіту із загальної жовчної протоки у хворих з неускладненим калькульозним холециститом під час операції, а також на 1-2 і 5-7 добу після неї із зовнішнього дренажу жовчної протоки.

Всі реакції проводимо на предметних скельцях для запобігання втрати клітин.

Визначення показників місцевого імунітету у пацієнтів з виразками шлунка

Забір матеріалу для імунологічних досліджень проводимо під час гастроскопії чи операції, або на 1-у та 7-у добу після оперативного втручання.

Для вивчення локального імунітету досліджуємо шматочки тканини слизової оболонки шлунка (СОШ) по периметру виразки, отримані під час операції. Шматочки тканини зважуємо і додаємо до них фізіологічний розчин у концентрації 1 мл на 100 мг тканини.

Гомогенізовану суспензію тканини використовуємо для визначення фагоцитозу клітин тканини.

Постановка реакції фагоцитозу

На обезжирене предметне скло наносимо 0,02 мл суспензії клітин. Додаємо 0,02 мл середовища 199, перемішуємо. Потім добавляємо 0,02 мл суспензії *S.albicans* попередньо вбитої прогріванням на водяній бані протягом 1 год, або латексу в фізіологічному розчині в концентрації 1 млн мікробних тіл/мл. Обережно перемішуємо в межах краплі, багато разів розподіляючи по поверхні скла, стараючись добре прикріпити лейкоцити до поверхні. Інкубуємо 30 хв при 37° С у вологій камері.

Висушуємо товсту краплю на повітрі, установлюючи скло в вертикальному положенні. При цьому основна маса рідини стікає по склу. Фіксуємо сумішшю Нікіфорова протягом 10 хв. Фарбуємо 0,1% розчином нейтрального червоного протягом 3 хв. Обережно змиваємо дистильованою водою. Висушуємо на повітрі.

Облік результатів реакції (поглинальної здатності фагоцитів)
проводимо мікроскопічно в імерсійній системі (підраховуємо на 100 нейтрофільних гранулоцитів (НГ) в препараті, в кожному з них визначаємо: є чи ні внутрішньоклітинно розташовані бактерії; кількість убитих і зруйнованих бактерій; кількість живих бактерій). «Активний» нейтрофіл - нейтрофіл, що поглинув мікроби.

Фагоцитарну активність нейтрофілів оцінюємо за фагоцитарним індексом (ФІ) та фагоцитарним числом (ФЧ).

ФІ: % «активних» НГ із загального числа порахованих НГ.

$$\text{ФІ} = \text{M}/100,$$

де М середнє число фагоцитованих мікробів (М).

ФЧ: середнє число фагоцитованих мікробів на 1 НГ (загальна кількість «активних» НГ поділена на число «активних» НГ).

Розраховуємо індекс бактерицидності НГ, що відображає здатність фагоцита переварювати поглинутий мікроорганізм: $\text{ІБН} = \text{Ч}_1/\text{Ч}_2 \times 100$,

де Ч₁ – число убитих мікробів, Ч₂ – загальне число поглинутих мікробів.

Отримані дані заносимо в таблицю. Робимо висновки.

Питання для обговорення:

1. Охарактеризувати процеси фагоцитозу, які відбуваються в клітині в нормі і при патології.
2. Дати визначення процесу фагоцитозу. За яких умов виникає фагоцитоз в клітині?
3. Дати характеристику механізмам фагоцитозу в крові.
4. Дати характеристику механізмам фагоцитозу в тканинах.
5. Які речовини ініціюють фагоцитоз?
6. Як впливають різні консерванти крові на фагоцитоз?
7. Охарактеризувати різні модифікації методу фагоцитозу.
8. Фагоцитоз і визначення чутливості до імуномодуляторів.
9. Інтерпретація результатів визначення фагоцитозу в крові.
10. Інтерпретація результатів визначення фагоцитозу в тканині.
11. Охарактеризувати взаємозв'язок окислювального стресу і фагоцитозу.
12. Охарактеризувати взаємозв'язок апоптозу і фагоцитозу.

Використана література

1. Коротина О.Л., Генералов И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, функции // Иммунология, аллергология, инфектология. 2012. №4 С. 23–32.
2. Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2010; 191: 677–91
3. Пигаревский В.Е. Зернистые лейкоциты и их свойства. – М.: Медицина, 1978. 284 с.
Pigarevskij V.E. Granular leukocytes and their properties. – М.: Medicina, 1978. 284 s.
4. Abrams W.R., Diamond L.W., Kane A.B. A flow cytometric assay of neutrophil degranulation. *J.Histochem. Cytochem.* 1983; 31: 734–44.
5. Kawabata K., Hagio T., Matsuoka S. The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 451(1): 1–10.
6. Ярилин А. А. Иммунология: Учебник / А. А. Ярилин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 749 с.
7. Segal A.W. How neutrophils kill microbes / A.W.Segal // *Annu Rev Immunol.* - 2005. - № 23. – P. 197–223.
8. Nauseef W.M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view / W. M. Nauseef // *Immunol Rev.* – 2007. - Vol. 219. - P. 88–102.
9. Silva M. T. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system / M. T. Silva // *J Leukoc Biol.* – 2009. – Vol. 87, №1.- P. 93–106.
10. Долгушин И. И. Влияние местного лечения ронколейкином на течение гнойного раневого процесса и функциональную активность раневых фагоцитов у пациентов с одонтогенными флегмонами / И.И.Долгушин, Л.С. Латюшина // *Медицинская иммунология.* - 2009. - Т. 11, № 1. - С. 95-100.

11. Долгушин И.И. Нейтрофилы и гомеостаз / И.И.Долгушин, О.В. Бухарин. – Екатеринбург: Урал. отд-е РАН, 2001. – 278 с.
12. Martinod K., Wagner D.D. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood*. 2014; 123(18): 2768–76. doi:10.1182/blood-2013-10-463646.
13. Jumaа M.A.A. Topographical Interrogation of the living cell surface reveals its role in rapid cell shape changes during phagocytosis and spreading / M.A.A. Jumaа, S. Dewitt, M.B. Hallett // *Sci Rep*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 9790.
14. Savige J., Pollock W., Trevisin M. What do anti neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) tell us? *Best Practice & Res Clin Rheumatol*. 2005; 19: 263–76.
15. Stark M.A., Huo Y., Burcin T.L., Morris M.A., Olson T.S., Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*. 2005; 22: 285–94.
16. Neutrophil Functional Heterogeneity: Identification of Competitive Phagocytosis / P. Hellebrekers, F. Hietbrink, N. Vrisekoop et al. // *Front Immunol*. – 2017. – №8. – P. 498.
17. Тамбовцева А.А. Физиологические особенности факторов врожденного иммунитета у спортсменов с различным профилем функциональной асимметрии мозга Том: 1. – 2016. – С. 248-252.
18. Патент на винахід 6808 UA МПК G01N33/48, 33/53 Спосіб діагностики гнійного холангіту / О. О. Шалімов, В. П. Чернишов, А. А. Стасенко, М. Ю. Ничитайло, І. С. Беліченко, А. В. Скумс – № 94270991 ; заявл. 15.07.91 ; опубл. 29.12.94, Бюл. № 8-1.

ТЕМА 4. КЛІТИННІ І ГУМОРАЛЬНІ ФАКТОРИ ІМУНІТЕТУ ПЕЧІНКИ

МЕТОДИКА ВИГОТОВЛЕННЯ МАЗКА-ВІДБИТКА З ПЕЧІНКИ

Вступ

Печінка - це найбільший життєво важливий орган в організмі, і вона відіграє подвійну роль як головного місця складних обмінних процесів і детоксикації. Тому вона постійно піддається дії чужорідних антигенів, отриманих з поживних речовин і токсинів, які можуть викликати місцеві запальні реакції, які мають бути толерогенними. У той же час, вона піддається дії безлічі патогенів, що передаються через їжу та кров, які потребують активації швидкої вродженої та адаптивної імунної відповіді для запобігання поширення таких збудників. Суть імунологічної функції печінки - імунний нагляд і дотримання балансу між толерантністю та активізацією. В цьому розділі буде описано функції вроджених та адаптивних імунних клітин печінки, і роль імунітету у розвитку та прогресуванні хронічних захворювань печінки.

Синтетична функція печінки, клітинні і гуморальні фактори імунітету печінки

Печінка як складова травної системи має дуже широкий функціонально-метаболічний спектр. Її можна розглядати як орган, у якому поживні речовини перетворюються на сполуки з іншими хімічними і фізичними властивостями, які або використовуються організмом, або підлягають екскреції.

Враховуючи важливу роль печінки в метаболічних процесах організму, важко собі уявити, що вона не бере участі в неспецифічних і в специфічних реакціях імунної системи. На користь цього твердження свідчить наступне.

Печінка є найбільшим органом у тілі і становить близько 1/50 маси тіла дорослого. Не дивлячись на те, що печінка необхідна для підтримки метаболічного гомеостазу та детоксикації вона також призначена для оптимізації імунного нагляду.

Печінковий капіляр або синусоїд утворюється між двома клітинними пластинами, де кров тече з портальної тріади через синусоїди до центральної вени. У цих синусоїдах знаходиться найбільша популяція макрофагів і найвища щільність природних кілерних Т-клітин (NKT) і клітин природних кілерів (NK). У поєднанні з іншими імунними клітинами, ця мережа сторожових та ефекторних імунних клітин максимально виявляє та вловлює циркулюючі збудники.

Сприяючи здатності очищати циркулюючі патогени, печінка має подвійне кровопостачання з печінкової артерії (артеріальна кров) і ворітної вени (венозна кров). Печінкова артерія забезпечує приблизно 20–35% кровопостачання, тоді як решту доставляє портальна кров. Приблизно 30% від загального обсягу крові в організмі проходить через печінку щохвилини.

Печінка розташована в незвичайному місці злиття артеріального і венозного кровотоку, що дозволяє перевіряти кров на наявність як системних, так і кишкових патогенів. Ця унікальна суміш крові просочується через стільники синусоїдів печінки, заповнені клітинами вродженого і адаптивного імунітету, які виявляють, фагоцитують і вбивають патогени в кровотоці. Печінкові імунні клітини різноманітні, з резидентними макрофагами і вродженими лімфоцитами, такими як природні Т-кілери і природні кілерні клітини (рис. 4.1).

У печінці портальна кров, що надходить з кишечника через внутрішню циркуляцію, збагачується поживними речовинами і патогенними молекулами, такими як ліпополісахарид (LPS). Здатність печінки до імунологічного фільтру крові є глибокою. Зниження концентрації LPS у 100 разів можна спостерігати в печінці. В низькій кількості LPS (приблизно 2 нг/кг) в циркуляції може спричинити серйозні фізіологічні наслідки для людини, а більша кількість може призвести до сепсису та смерті людей, тому необхідно, щоб обов'язково ці молекули ефективно виводилися печінкою до того, як потраплять в периферичний кровообіг.

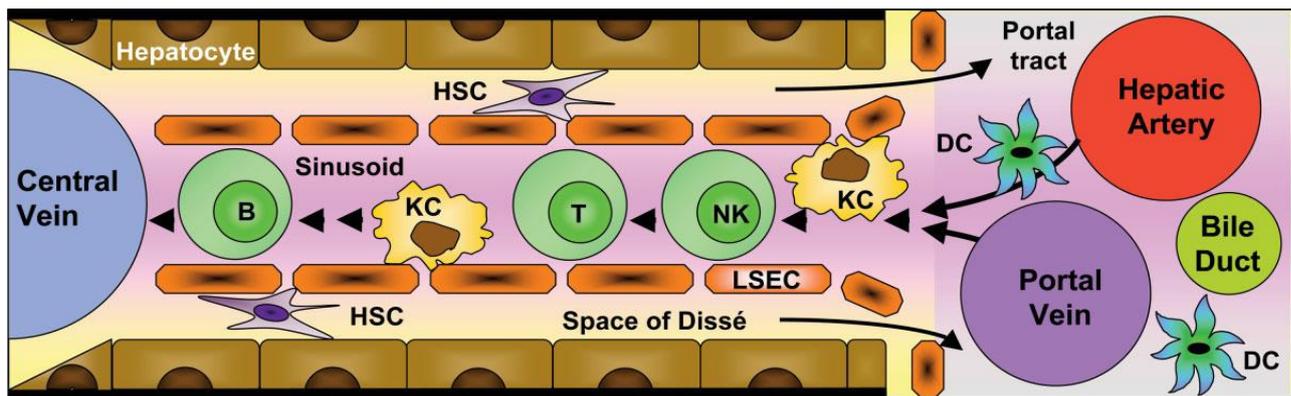


Рис. 4.1. Імунні клітини в здоровій печінці. Синусоїди печінки вистелені фенестрованим моношаром синусоїдальних ендотеліальних клітин (LSEC). Зауважте, що кожен лімфоцит, який проходить через синусоїди, тісно контактує з ендотеліальними клітинами, що фланкують синусоїди, через малий діаметр синусоїдів печінки (приблизно 6-15 мкм (μm)) і порівняно великий діаметр лімфоцитів (приблизно 7-12 мкм (μm)). Простір Діссе містить зірчасті клітини в пухкому позаклітинному матриксі. В, В-клітина; DC, дендритна клітина; HSC, печінкова зірчаста клітина; KC, клітина Купфера; NK, природна кілерна клітина; Т, Т-клітина.

В ембріональній печінці визначено попередники Т-клітин, у ній відбувається позатимусне диференціювання Т-клітин. Існує думка, що ембріональні гепатоцити можуть брати участь у встановленні толерантності організму до "своїх" антигенів.

Гепатоцити виконують більше ніж 500 функцій, що забезпечує підтримку метаболізму та гомеостаз організму. Кожний гепатоцит виробляє екзокринні й ендокринні речовини, які завдяки безпосередньому контакту печінкових клітин із жовчовивідними шляхами та кровоносними судинами надходять у жовч і кров. Паренхіматозні клітини першими контактують із речовинами, що надходять з кишечника по ворітній вені в печінку. Гепатоцити беруть активну участь в обміні білків, жирів, гормонів, вітамінів.

Крім того, різні популяції клітин печінки негематопоетичного походження, такі як гепатоцити, синусоїдальні клітини печінки, ендотеліальні клітини і зірчасті клітини печінки можуть також існувати як антигенпрезентуючі клітини в печінці.

Взаємодія між цими різними клітинами приводить до скоординованої імунологічної відповіді, яка дуже ефективна у видаленні патогенів, залученні лейкоцитів в печінку і презентації антигена лімфоцитам. В результаті печінка існує як центральний лімфоїдний захист органів і передова від вторгнення патогенів.

Печінка складається з паренхіматозних клітин або гепатоцитів, що представляють 70–80% і непаренхімних клітин (NPC), які представляють 20–30% клітин печінки (рис. 4.2). NPC мають унікальний склад імунних клітин, що складається з APC, вроджених та адаптивних лімфоцитів.

Клітини Купфера (КК)

КК - це печінкові макрофаги, що становлять 20% NPC. На відміну від моноцитарних клітин і популяції клітин макрофагів в інших тканинах, які активно переміщуються по тканинах в пошуках збудників хвороб, КК стаціонарні і розташовані безпосередньо в судинній мережі. Вони розташовані в синусоїдах печінки, в основному, навколо порталних трактів, де вони можуть очистити кров від ендотоксину.

КК експресують головний комплекс гістосумісності класу I (МНС-I), класу II (МНС-II), і костимулюючі молекули, такі як CD80 і CD86, і тому можуть представляти антигени та первинні наївні Т-клітини CD8. Отримані недавно дані свідчать про те, що КС неоднорідні і субпопуляції КК експресують різні маркери, що відображають відмінності в фагоцитарній здатності і виробництві цитокінів.

КК можуть бути або M1 (прозапальні) або M2 (протизапальні) макрофаги. Баланс між макрофагами M1 та M2 відіграє важливу роль під час пошкодження та відновлення печінки.

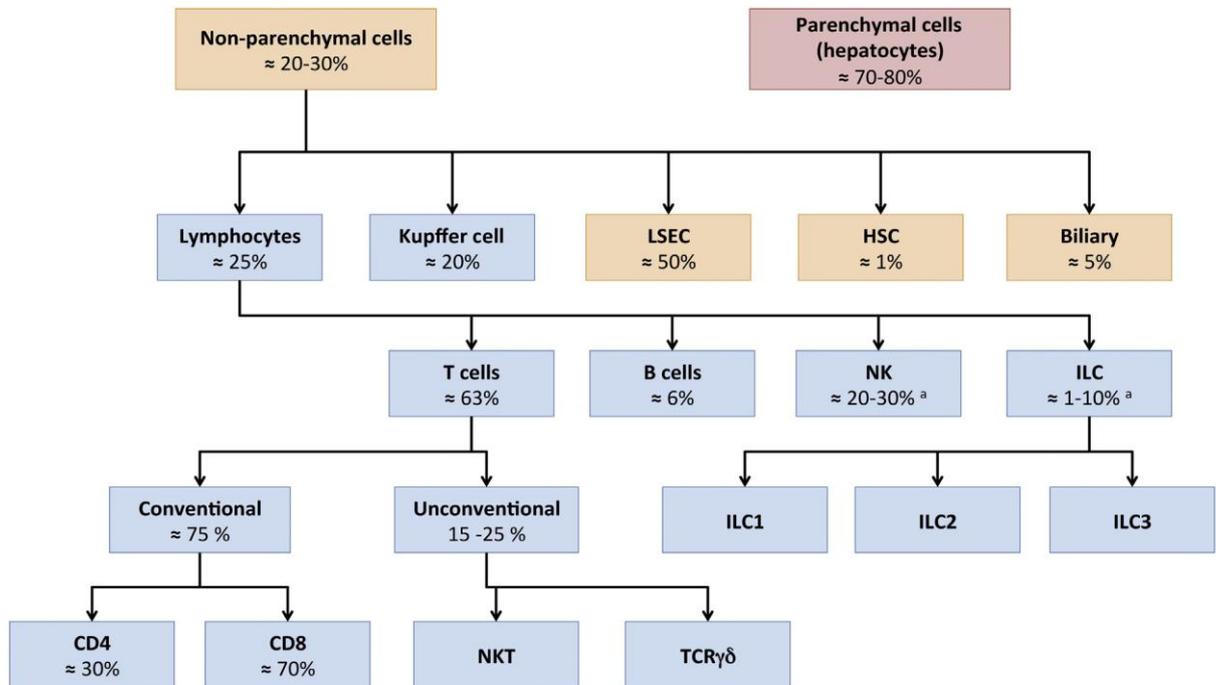


Рис.4.2. Клітинний склад печінки. Клітини паренхіми червоного кольору (гепатоцити) представляють переважну більшість клітин печінки. Непаренхімні клітини становлять до 30% від загальної кількості клітин печінки; вони складаються з імунних клітин (синій) та інших клітин, що мешкають у печінці (оранжевий). Лімфоцити печінки складаються з природних кілерних клітин (NK), природних Т-клітин-кілерів (NKT), вроджених лімфоїдних клітин (ILC), Т-клітин і В-клітин. Цифри представляють приблизні частоти кожної популяції щодо загальної кількості клітин. Зазначені відсотки - це відсотки батьківської популяції.

Рисунок адаптований з Раканеллі В., Реерманн Б., 2006. Печінка як імунологічний орган. Гепатологія 43, S54 – S62.

Встановлено, що клітини Купфера відіграють важливу роль в імунній регуляції. Вони секретують ІЛ-1, ФНП- α , простагландини E2 та D2, містять поверхневі рецептори до Fc-фрагмента імуноглобулінів та до комплекменту. КК також виробляють велику кількість ІЛ-10 і TGF- β , які сприяють толерогенності навколишнього середовища в печінці.

Природні кіллерні клітини

Природні кіллерні клітини (NK) знаходяться в більшій кількості в печінці (15–30%) порівняно з периферичною кров'ю (5–15%). Внутрішньопечінкові NK-клітини сприяють імунному нагляду, оскільки вони можуть вбити інфіковані або пре канцерогенні клітини. Вони також відіграють важливу роль під час пошкодження печінки та відновлення, оскільки вони можуть впливати на баланс між про- та протизапальними реакціями та безпосередньо пригнічують фіброз печінки знищуючи профіброгенно активовані HSC.

Попередні дослідження підраховали, що NK-клітини становлять 30% лімфоцитів печінки, однак нещодавня робота продемонструвала, що відсоток цих клітин - ІЛС типу I.

Природні кіллерні Т-клітини

Природні кіллерні Т-клітини (NKT) - це нетрадиційні Т-клітини, які включають класичні та некласичні підтипи. Класичні NKT cells (також відомі як тип I або незмінні клітини NKT) генеруються в тимусі та мають унікальний рецептор Т клітин $V\alpha 24$, $V\beta 11$ (TCR) у людей, який розпізнає ліпідні антигени, представлені CD1d, не поліморфними МНС I-подібними молекулами класу. На відміну від класичних, некласичні NKT можуть нести або $\alpha\beta$, або $\gamma\delta$ TCR.

NKT-клітини найбільш відомі своїми імунорегуляторними властивостями. NKT-клітини вважаються «вродженими лімфоцитами» з їх здатністю швидко секретувати широкий спектр цитокінів (включаючи IFN- γ та ІЛ-4), частково завдяки наявності захищених транскриптів для цих молекул.

Клітини NKT можуть також продукувати цитокіни з профілем Th1, Th2 або Th17 залежно від їхнього середовища і таким чином можуть впливати на запалення та захворювання печінки. Швидке виробництво різних цитокінів дозволяє NKT-клітинам керувати запальними або протизапальними реакціями після травм або інфекційних захворювань.

Дендритні клітини

Існує кілька популяцій дендритних клітин печінки (ДКП) (liver dendritic cells (LDCs)). На відміну від КК, ДКП рідко розподіляються по всій печінці. Імуногістохімічні дослідження дозволили виявити, що ДКП в основному знаходяться в порталній зоні, з деякими ДКП в синусоїдах, але дуже мало в паренхімі.

Резидентні дендритні клітини печінки (DC) - це переважно мієлоїдні DC (мДК) і незрілі, оскільки вони експресують низький рівень коstimулюючих молекул, таких як CD40, CD80 та CD86 і таким чином віддають перевагу толерантності, а не активації Т-клітин в нормальних умовах. Взаємодія між LSEC та резидентними, що проживають у печінці сприяє підтримці толерогенного стану ДК. DC можуть поглинати і переробляти антигени. Це дозволяє їм відчувати молекулярні структури, пов'язані з патогенами (PAMP) різними рецепторами розпізнавання образів патогенності (PRR). Після поглинання та зондування антигену ДК, що мешкають у печінці дозрівають, коли вони набувають здатності мігрувати до дренажних лімфатичних вузлів, куди вони можуть переносити антигени і сприяти Т клітинній відповіді. Печінка також містить плазмоцитоїдні DC (pDC), які є найбільш потужними клітинами, що продукують IFN в організмі та додатково залучаються до роботи при зараженні гепатотропними збудниками, де вони виділяють інтерферони типу I та типу III у відповідь на стимуляцію Toll-подібних рецепторів (TLR) -7 та / або TLR-9, які розпізнають одноланцюгову РНК та похідні мотиви бактерій CpG, відповідно. Отже, і mDC, і pDC відіграють ключову роль у підготовці антиген-специфічних реакцій та толерантності.

Вроджені лімфоїдні клітини

Вроджені лімфоїдні клітини (ВЛК)- це вроджені імунні клітини, у яких нема антигенної специфічності і які мають лімфоїдне походження. Вони представляють вроджені імунні аналоги адаптивних CD4-хелперних Т-клітин. Їх розподіляють за цитокиновим профілем в ILC1, ILC2 та ILC3 з Th1-, Th2- і

Th17-подібними профілями відповідно. Печінка в першу чергу збагачена популяцією ILC1, яку раніше плутали з НК-клітинами, оскільки обидві вони виділяють IFN- γ . Однак нещодавно дослідження генної експресії показали, що ILC1 печінки має інший транскриптомічний профіль порівняно з резидентними печінковими НК. Функції ВЛК за патогенних умов в печінці недостатньо вивчені.

Адаптивні Т-лімфоцити та В-лімфоцити

Кількість CD8⁺ Т-клітин у печінці зазвичай перевищує кількість CD4⁺ Т-клітин, що призводить до зворотного співвідношення CD4⁺/CD8⁺ Т-клітин порівняно з периферичною кров'ю. В печінці частота ефektorних клітин / клітини пам'яті вища, ніж у крові. Печінка також збагачена CD4⁺, CD8⁺ подвійно позитивними та подвійно негативними Т-клітинами та $\gamma\delta$ Т клітинами. Подібно до кишечника, печінка збагачена клітинами Th17 - підтипом CD4⁺ Т-клітин, що продукують запальні цитокіни з антимікробними властивостями, такі як IL-17 та IL-22, які також можуть мати прозапальну дію (IL-17) або гепатопротекторні властивості (IL-22). Печінка має низький вміст В-клітин (6%) порівняно з кров'ю.

Функцію печінкових клітин регулюють цитокіни, що відіграють важливу роль у регуляції імунологічних процесів: ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-9, а ІЛ-8 продукується гепатоцитами. Особливе місце посідає α -фетопроतेїн, який синтезується клітинами печінки та володіє імуносупресивними властивостями. У печінці містяться різні лімфоцити, зокрема ПК-клітини, здатні до лізису трансформованих та вірусінфікованих клітин внутрішніх органів. У синусоїдах печінки є так звані ріт-клітини, які зустрічаються і в інших органах. Вони мають добре розвинені псевдоподії та цитоплазматичні гранули. Ріт-клітини належать до великих зернистих лейкоцитів, володіють літичною активністю та здійснюють імунологічний нагляд у печінці.

У нормі печінка містить 1-2% Т-лімфоцитів, що експресують CD8⁺ - антиген (Т-лімфоцити-супресори), кількість яких збільшується на фоні вірусних

інфекцій, що залежить від типу вірусу. Ці клітини становлять основу портальних та перипортальних мононуклеарних клітинних інфільтратів.

Клітини нормальної печінки, які містять імуноглобуліни, визначаються в малій кількості в портальному тракті та синусоїдальних ділянках печінкових часточок.

Роль імунних факторів печінки при різних патологічних станах

Доказом участі печінки в імунологічних реакціях є феномен Зальцбергера-Чейса, при якому пероральна імунізація спричинює гальмування імунологічної відповіді на повторні внутрішньом'язові або підшкірні введення антигену. Феномен не спостерігають, якщо попередньо накласти анастомоз між ворітною та порожнистою венами. Таким чином, печінка впливає на індукцію толерантності. Однією з причин цього феномена може бути інактивація антигенів макрофагами печінки.

Печінка у хворих на цироз швидше за все не здатна руйнувати антигени, які стимулюють утворення антитіл.

Функція клітин Купфера може знижуватися за рахунок збільшення кількості циркулюючих ліпопротеїдів кишкового походження. Вони разом із продуктами некрозу гепатоцитів виконують функцію ад'ювантів та можуть модифікувати імунну відповідь у хворих із цирозом печінки.

Функція печінки змінюється за умови часткової гепатектомії. Видалення частини печінки не лише значно стимулює антигілогенез, а й прискорює його, скорочуючи терміни досягнення максимальних показників. Вважають, що це пов'язано з посиленням функції клітин-хелперів за рахунок зниження супресорної активності на початкових етапах після операції.

Походження та механізм дії супресорних факторів печінки вивчені мало. Встановлено, що тканина або суспензія клітин здорової печінки володіють антигенними властивостями та здатні сенсibiliзувати реципієнта. У той самий час печінкові екстракти спричинюють менш виражену сенсibiliзацію або не зумовлюють її зовсім. Було виявлено імуносупресивні властивості

безклітинних печінкових екстрактів. Можливо, що ця дія пов'язана з наявністю в екстрактах фактора (факторів) - активатора супресорних клітин.

Імуносупресивні властивості пов'язують із макропротеїнами, які під час електрофорезу мігрують з α -глобулінами. Доведено імуносупресивну активність макроглікофетопротеїну печінкового генезу, виділеного із сироватки крові здорових людей та хворих на рак.

У сироватці крові та амніотичній рідині вагітних виявлено фактор, що чинить імуносупресивну дію. Цей фактор отримав назву альфа-фетопротеїну (АФП). Він синтезується в печінці ембріона дорослого організму. Встановлено взаємозв'язок між збільшенням циркулюючого АФП у крові та захворюваннями печінки, зокрема пухлинними, при яких спостерігають імуносупресію.

У період вагітності АФП забезпечує механізм захисту плода від реакції відторгнення, що розвивається в організмі матері. Він стимулює розвиток в ембріональній печінці клітин-супресорів та формування в плода толерантності до власних антигенів. Зниження імунологічної реактивності в матері у період вагітності зумовлене циркуляцією АФП. Низкою досліджень було показано, що мікрооточення, багате на АФП, є сигналом для активації Т-лімфоцитів у напрямку формування в них супресорної функції. Стан імунологічної гіпореактивності, який спостерігають при різних гепатопатіях, може бути наслідком збільшення локального синтезу АФП.

В останні десятиріччя було виділено інші білки, що володіють вираженою імуносупресивною активністю *in vitro* та *in vivo*.

Такі структурні елементи печінки, як ендотеліальні клітини здатні продукувати медіатори запалення та імунітету (IL-1, IL-6). Гепатоцити під впливом зовнішніх стимулів синтезують і секретують деякі компоненти системи комплементу (С3, В-фактор), а також інтерлейкіни (IL-6, IL-8). Під впливом цитокінів гепатоцити продукують білки гострої фази запалення — гострофазові білки (ГФБ), які є факторами механізмів гомеостазу, спрямованих на захист організму від патогенних агентів та різних чужорідних компонентів.

У печінці міститься широкий спектр специфічних антигенів, що дозволяє їй брати участь в синтезі імуноглобулінів, компонентів комплементу, інактивації чужорідних антигенів. У свою чергу, зміни функціонального стану імунокомпетентних клітин істотно впливають на розвиток патологічних процесів у печінці.

З самого початку запальної реакції в зоні печінкового синусоїда формується складний ланцюг клітинних і гуморальних взаємодій. Запалення починається з праймування, або підготовки печінкових макрофагів і ендотелію. У цьому процесі беруть участь продукти розпаду клітин печінки, активні фракції комплементу, утворені під дією протеаз, імунні комплекси і лімфокіни. У міру розвитку гепатиту в печінці накопичуються не тільки медіатори, а й інгібітори запалення.

Серед широкого спектру біологічних і імунологічних маркерів запалення особливе значення надають білкам гострої фази, які синтезуються печінкою. Білки «гострої фази» представляють собою гетерогенну групу білків, які синтезуються в печінці у відповідь на запалення.

Оскільки запальний процес містить в собі досить значну імунологічну компоненту, що має на увазі участь не тільки клітинної, але і гуморальної ланки, то саме секрецію печінкою подібних білків можна віднести до однієї з основних її імунологічних функцій. Білки гострої фази досить різноманітні, і рівень їх секреції печінкою не завжди спрямований у бік збільшення. Розрізняють «позитивні» білки гострої фази, рівень яких наростає більш ніж на 25%, і «негативні» білки гострої фази, концентрація яких при аналогічних умовах знижується.

Першу групу складають: компонент С3 комплементу, α_1 кислий глікопротеїн (орозомукоид), церулоплазмін, фібриноген, гаптоглобін, сироватковий амілоїд Р, С-реактивний білок, тенасцин, ліпополісахарид-зв'язуючий білок, а також численні протеїнази і їх інгібітори.

До негативних білків гострої фази відноситься: альбумін, преальбумін, трансферин, слізний ліпокалін, фібронектин, ретинол-зв'язуючий білок, кініноген, прекалікреїн, ангіотензиноген і ін.

Ряд авторів додатково виділяють нейтральні білки гострої фази. До них зараховують антитіла або основні класи імуноглобулінів IgA, IgG, IgM і $\alpha 2$ -макроглобулін.

Більшість білків гострої фази, які синтезуються або депонуються в печінкових клітинах, можуть бути використані в якості лабораторних маркерів саме при патології печінки.

Вважається, що визначення вмісту $\alpha 1$ -антитрипсину та церулоплазміну доцільно для діагностики хронічних ушкоджень печінки. При цьому мається на увазі зниження вмісту цих білків в сироватці крові.

Однак слід врахувати, що $\alpha 1$ -антитрипсин і церулоплазмін відносяться до позитивних білків гострої фази, концентрація яких зростає при гострому запаленні самої різної локалізації. Разом з тим, відома прогностична роль $\alpha 1$ антитрипсину при гепатоцелюлярній карциномі, коли рівень цього білка знижувався, на відміну від гострого вірусного гепатиту В.

Суттєве значення для моніторингу і прогнозу перебігу гострого вірусного гепатиту має концентрація церулоплазміну в крові. Основною функцією церулоплазміну, крім антиоксидатної дії, є розподіл, транспорт і збереження гомеостазу міді. Недостатній синтез або повна відсутність церулоплазміну призводить до депонування міді в клітинах печінки (з подальшим розвитком цирозу), мозку, нирок.

Для С-реактивного білка характерні багато властивостей, притаманних антитілам (імуноглобулінам). Зокрема, нативний С-реактивний білок, вступаючи у взаємодію з Fc-рецептором, підсилює фагоцитарну активність лейкоцитів. Крім того, він бере участь в неспецифічній опсонізації бактерій, що сприяє їх знищенню. С-реактивний білок пов'язує мікроорганізми, токсини, а також частки пошкоджених тканин, завдяки чому активується система

комплементу за класичним шляхом. Разом з тим, як показують дослідження, С-реактивний білок людини пригнічує хемотаксис нейтрофілів у відповідь на дію ІЛ-8 (основного хемокіна) і бактеріального хемотаксичного пептиду. Синтез С-реактивного білка регулюється цитокінами, зокрема, ІЛ-6. ІЛ-6 є найбільш сильним медіатором, стимулюючим вироблення в печінці білків гострої фази.

Інша система білків, що володіють ферментативною активністю і утворених в печінці, комплемент - більше 30 окремих білків (компонентів, інгібіторів, рецепторів), що виконують важливу функцію в неспецифічній системі захисту, течії запалення і руйнування (лізис) мембран бактерій і різних чужорідних клітин.

Більшість білків системи комплементу синтезуються в печінці. При цьому С3 - центральний компонент системи комплементу, що відноситься до білків гострої фази запалення, становить близько 70% всіх білків системи комплементу. Він приймає участь як у класичному, так і в альтернативному шляхах активації системи комплементу. У класичному шляху його утворення активується ІgG і ІgM, в альтернативному - токсинами, включаючи ендотоксин, і ІgA. Активація С3 сприяє здійсненню ряду як неімунних, так і імунних реакцій: виділенню гістаміна з тучних клітин і тромбоцитів, стимуляції фагоцитоза, підсиленню проникності ендотеліоцитів, скороченню гладком'язевих клітин, хемотаксису лейкоцитів і реакції антиген-антитіло.

Рекрутинг нерезидентних лейкоцитів до печінки

У цьому заключному розділі ми коротко розглянемо, наскільки активація місцевого імунітету в печінці завершується рекрутингом нерезидентних лейкоцитів. Одна з найбільш вражаючих імунних здібностей печінки - це її здатність швидко залучати велику кількість лейкоцитів периферичної крові під час ураження печінки або інфекції (рис. 4.3). Дослідження показали, що нейтрофіли, тромбоцити, моноцити та лімфоцити швидко залучаються до захисту печінки під час бактеріальної та вірусної інфекції. Навіть

мікроскопічного стерильного пошкодження гепатоцитів достатньо для мобілізації нейтрофілів до місця пошкодження тканин.

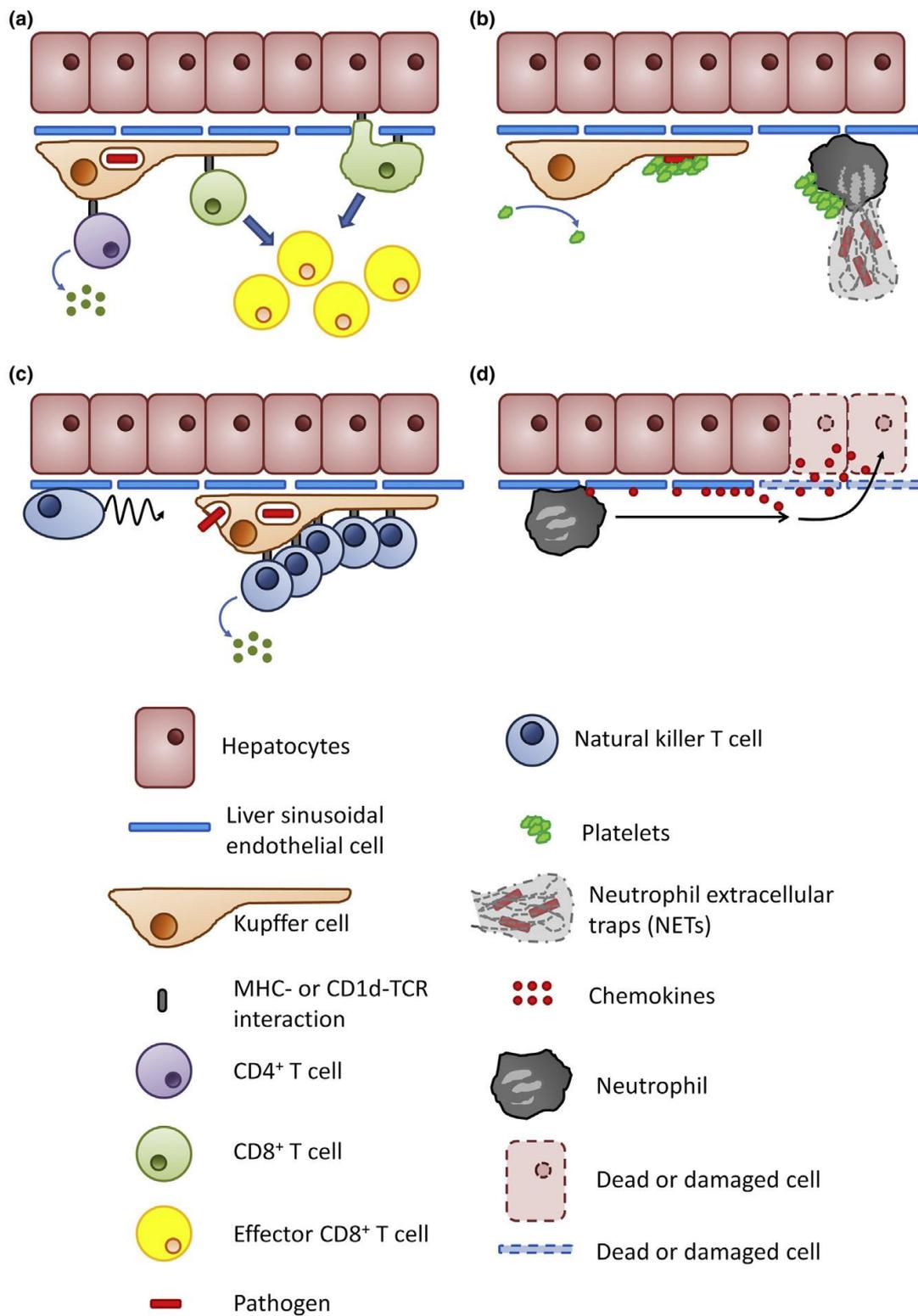


Рис. 4.3 Імунні реакції в печінці під час інфекції або пошкодження печінки.

(a) В базальних умовах гепатоцити, синусоїдальні ендотеліальні клітини печінки (LSECs) та антигенпрезентуючі клітини (APC) у печінці не мають експресії або мають низький вміст МНС і експресують інгібуючі молекули / цитокіни, що перешкоджає активації та дозріванню Т-клітин. Під час запалення або інфекції наявність додаткових лігандів Toll-подібних рецепторів (TLR) приводить до регуляції молекул МНС та костимулюючих молекул з пониженою регуляцією інгібуючих молекул. Це приводить до активації, проліферації Т-клітин, і диференціювання в ліцензовані ефektorні клітини.

(b) Тромбоцити проявляють фенотип «на дотик та рух» на клітинах Купфера - КК (Kupfer cells) в умовах спокою. Коли виявляються специфічні патогени, тромбоцити швидко змінюють свій фенотип і агрегуються навколо патогена, що призводить до обгортання патогена. Нейтрофіли також залучаються під час бактеріальної або вірусної інфекції. Агрегація тромбоцитів на нейтрофілах індукує вироблення нейтрофілами позаклітинних пасток (NET), які захоплюють, вбивають та запобігають розповсюдженню збудника.

(c) Печінкові природні кілерні Т клітини (NKT) патрулюють судинну систему у пошуках активуючих стимулів. Коли специфічні патогени захоплюють і вбивають КК, КК представляють специфічні ліпідні антигени на молекулах CD1d до NKT клітин, які їх активують. NKT клітини скупчуються навколо КК і згодом вивільняють величезну кількість запальних цитокінів, що сприяє очищенню від збудника.

(d) При неінфекційній травмі печінки мертві та пошкоджені клітини виділяють пов'язані з пошкодженням молекули, які активуються LSEC та КК. Ці клітини, у свою чергу, вивільняють хемокіни, які направляють нейтрофіли до межі пошкодження, де вони потім мігрують у зону пошкодження.

Під час рекрутменту нейтрофіли печінки прилипають по-різному порівняно з іншими тканинами. Селектини, які є молекулами необхідними для прокатки нейтрофілів у периферичній судинній сітці, дозволяють нейтрофілам

отримувати подані активуючі та мігруючі сигнали через ендотелій. На противагу, в печінці не спостерігається перекошування, натомість нейтрофіли прилипають безпосередньо до LSEC через молекули, такі як CD44 та гіалуронан під час інфекцій та через β 2-інтегрини при стерильних травмах.

Нейтрофіли - не єдині клітини, рекрутовані в печінку. За базових умов тромбоцити виявляють короткий ефект "дотику-і-віддачі" взаємодіючи з КК, що передуює рекрутингу нейтрофілів. Під час зараження бактерії швидко захоплюються за допомогою КК і тромбоцити агрегують і інкапсулюють збудника. Запобігання взаємодії КК та тромбоцитів призводить до збільшення смертності господаря. Самі нейтрофіли також індукують агрегацію тромбоцитів там, де взаємодія між ними та тромбоцитами приводить до утворення нейтрофілами позаклітинних пасток (NET). Ці мережі є деконденсованою ядерною ДНК, викладеною з цитотоксичними та антимікробними білками, які затримують патогени у крові та обмежують поширення. Оскільки нейтрофіли це роблять не експресуючи CR1g і не можуть безпосередньо ловити бактерії, мережі можуть бути переважним механізмом захоплення бактерій цими клітинами. Однак мережі можуть значно збільшити здатність печінки до захвату як бактерій, так і вірусів.

Заключення

Печінка - це вторинний імунний орган з унікальною структурою і імунною клітинною композицією, де відбувається обробка антигену, представлення та можливо праймування антиген-специфічних Т-клітин. Через відсутність належних коstimулюючих молекул, відсутність допомоги CD4 Т-клітинам та великої кількості імунних регуляторів цитокінів та молекул, толерантність переважно підтримується за нормальних умов. Це толерогенне середовище експлуатується декількома гепатотропними збудниками для встановлення стійкості всередині хазяїна. Поєднання факторів, пов'язаних з патогенами та господарями, є ймовірно тимфактором, що підводить баланс до активації проти толерантності при деяких, але не всіх інфекціях. Гостре

запалення викликає фіброгенні сигнали відновлення тканин, але стійке запалення приводить до різних патогенних форм захворювання печінки.

Раніше вважалося, що гостре запалення в печінці відбувається через загальне, неспецифічне захоплення лейкоцитів у межах печінкової судинної системи. Однак, запалення відбувається через дуже специфічний і обережно контрольований механізм імунного нагляду та внутрішньо судинну реакцію на пастку та знищення патогенних мікроорганізмів. Це нове розуміння запалення печінки надає великі можливості для розробки терапевтичних стратегій для контролю над місцевими та системними захворюваннями.

Питання для обговорення

1. Синтетична функція печінки.
2. Клітинний склад печінки.
3. Клітини Купфера.
4. Природні кіллерні клітини печінки.
5. Дендритні клітини печінки
6. Лімфоїдні клітини вродженого імунітету печінки.
7. Адаптивні Т-лімфоцити та В-лімфоцити.
8. Роль імунних факторів печінки при хронічних захворюваннях печінки.
9. Рекрутмент нерезидентних лейкоцитів до печінки.

Використана література

1. Драннік Г.М., Білоглазов В.О., Чоп'як В.В. та ін. Клінічна імунологія / Під редакцією Г. М. Дранніка. – Здоров'я, 2007. – 650 с.
2. Pei Xiong Liew and Paul Kubes Microanatomy and Immunity in the Liver in Encyclopedia of Immunology. – Editor in Chief Michael J.H. Ratcliffe – 2016. - Vol.5. – 523 p.
4. Vito Racanelli and Barbara Rehmann The Liver as an Immunological Organ // Hepatology. 2006. - Vol. 43, No. 2, Suppl. 1. – S.54-62.

Метод виготовлення мазка-відбитка печінки.

Лабораторна робота № 4

План заняття:

1. Ознайомитись з синтетичною функцією печінки, клітинними і гуморальними факторами імунітету печінки і принципом методики виготовлення мазка-відбитка.

2. Приготувати необхідні реагенти.

3. Декапітувати тварину хірургічними ножицями.

4. Розкрити черевну порожнину, виділити печінку.

3.Зробити мазок-відбиток.

4. Оцінка результатів.

Мета роботи: Ознайомитись з методами виготовлення мазка-відбитка.

Освоїти метод виготовлення мазка-відбитка печінки.

Практичні навички:

- Для виконання завдань необхідно використовувати теоретичні знання і практичні навички, отримані на попередніх заняттях.

- Вміння декапітувати тварину хірургічними ножицями.

- Вміння розкрити черевну порожнину, виділити печінку.

- Вміння зробити мазок-відбиток.

- Вміння приготувати фарбник.

- Вміння правильно оформити результати аналізу.

Принцип метода оснований на виготовленні мазка-відбитка.

Матеріали і обладнання

Реактиви: спирт (або суміш Нікіфорова), барвник нейтральний червоний (або Романовського-Гімзе).

Обладнання: хірургічні ножиці, лезо, пінцет, мікроскопи, імерсійне масло, лічильники клітин.

Лабораторний посуд: предметні скельця, чашки Петрі, фільтрувальний папір.

Біологічний матеріал: тварина.

Методика виготовлення мазка-відбитка з печінки:

1. тварину декапітувати хірургічними ножицями;
2. розкрити черевну порожнину, виділити печінку і помістити печінку в чашку Петрі;
3. печінку розсікти лезом і обережно осушити поверхню розрізу фільтрувальним папером;
4. знежирене скло злегка нагріти над полум'ям спиртівки і торкнутися поверхні розрізу;
5. мазок висушити на повітрі і пофарбувати будь-яким доступним барвником

Взяття матеріалу

Взяття матеріалу - це витяг клітин, а також шматочків тканин з біологічного об'єкта.

Вимоги, що пред'являються до взяття матеріалу:

проводитися гострим інструментом (запобігає травматизації тканини);
товщина зразка не повинна перевищувати 5 мм *;
необхідне маркування зразка (вказується орган, номер тварини, дата забору і ін.).

* Параметр обумовлений швидкістю дифузії фіксуючого розчину в тканину.

Фіксація

Фіксація - це процес швидкої консервації клітинних структур, при якому зупиняються всі фізіолого-біохімічні процеси, а водорозчинні речовини переходять в нерозчинний стан. Фіксація дозволяє зберегти внутрішньоклітинні структури в незмінному вигляді на тривалий час.

Існують фізичні (висока або низька температура) і хімічні (прості і складні з'єднання) методи фіксації.

Вимоги, що пред'являються до фіксатора:

висока швидкість дифузії в тканину;
максимальне збереження структур;

обсяг фіксатора повинен перевищувати обсяг фіксованої матеріалу не менше, ніж в 50 разів.

Одним з кращих фіксаторів є метиловий спирт, це обумовлено його високою швидкістю дифузії в тканину. Найбільш поширеним є 10% водний розчин формальдегіду.

Методика виготовлення мазка-відбитка

Розрізняють «сухі» і «вологі» мазки. Перші мають обмежене застосування і використовуються майже виключно при вивченні крові і паразитів крові. «Вологі» мазки застосовуються часто головним чином при вивченні паразитичних найпростіших, а також і в інших випадках.

Мазки виготовляються в такий спосіб (рис.4.4). Пінцетом беруть той орган, з якого передбачається зробити мазок, і «намазують» на покривне скло. Мазок повинен бути абсолютно рівномірним і однакової товщини на всьому покривному склі. Якщо цього досягти відразу не вдалося, то за допомогою препарувальної голки можна частково виправити мазок.

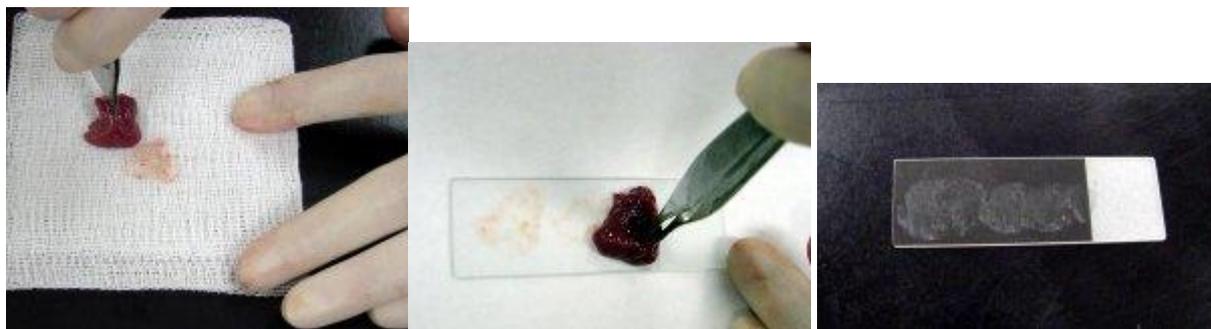


Рис.4.4. Виготовлення мазка-відбитка.

Не даючи підсохнути мазку, покривне скло опускають мазком вниз на теплий етиловий спирт, попередньо налитий в годинне скло або сільничку. Відбувається швидка коагуляція тканинних елементів, і мазок щільно пристає до скла. Подальша обробка мазка та ж, що і тотальних препаратів. Після фіксатора слідують промивання в 70 ° спирті, вторинна промивка в спирті,

перенесення в воду, забарвлення, відмивання в воді; спирти зростаючої концентрації, ксилол, бальзам (полістирол).

Методика фарбування мазка-відбитка:

1. накрити мазок фільтрувальної папером і нанести на нього барвник - гематоксилин Бемера (10 хвилин);
2. не зливаючи барвник, нанести дистильовану воду з розрахунку 1 частина барвника до 2 частин води ще на 10 хвилин;
3. прибрати фільтрувальний папір, мазок швидко промити в дистильованій воді, висушити фільтрувальним папером.

Результат: ядро клітини забарвлюється в інтенсивно синій колір, цитоплазма в блідо рожевий (рис. 4.5).

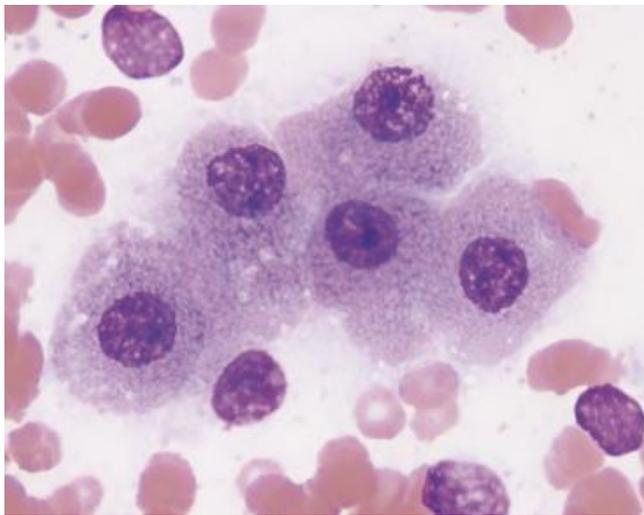


Рис.4.5. Гепатоцити на відбитку печінки. (Фарбування барвником Романовського-Райта, 1000 ×.)

**ТЕМА 5. КИСНЕВА МІКРОБІЦИДНІСТЬ СИСТЕМ
НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ. ОСОБЛИВОСТІ ВИЗНАЧЕННЯ
МЕТАБОЛІЧНОЇ АКТИВНОСТІ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ В
НСТ-ТЕСТІ В ТКАНИНАХ І РІДИНАХ. ВИЯВЛЕННЯ
НЕЙТРОФІЛЬНИХ ЗОВНІШНЬОКЛІТИННИХ ПАСТОК**

Нейтрофіл оснащений широким набором рецепторів, які дозволяють йому чуйно і диференційовано реагувати на найменші зміни оточуючого середовища. Підготовлений нейтрофіл може чинити свою дію на об'єкт, що викликавши його активацію, одним із двох способів: по-перше, фагоцитувати і знищувати його в фаголізосомах, по-друге, виділяти назвні бактерицидні речовини, які являють собою вміст гранул.

Центральне місце в оцінці антимікробної активності фагоцитуючих клітин займає кисневий або респіраторний «вибух», внаслідок чого генеруються активні форми кисню в системі НАДФ-оксидази. В оцінці кисневого «вибуху» найбільш широко використовується метод, в основі якого лежить реакція відновлення нітросинім тетразолієм іонів водню і супероксидних аніонів, при цьому в клітинах утворюються грубо-дисперсні темно-сині гранули діформаза, які оцінюються за допомогою світлової мікроскопії.

Нашими дослідженнями було встановлено, що на відміну від нейтрофілів крові, яким властиві три типи розподілу продукту реакції в НСТ-тесті (1 – дифузно, 2 – гранули, 3 – без формаза), лейкоцити жовчі у хворих на гнійний холангіт мали два типи (1 – дифузно, 2 – без формаза). Забарвлення цитоплазми продуктом реакції НСТ носить дифузно-крапковий характер, крапкові включення формаза рівномірно розміщені по всій клітині. Результати наших спостережень свідчать, що нейтрофіли жовчі набагато слабше забарвлюються нейтральним червоним.

В 2004 році вчені Інституту інфекційної біології імені Макса Планка (Берлін, Німеччина) під керівництвом Артуро Зихлінського, відкрили і розшифрували ще один механізм знищення патогенів – нейтрофільні зовнішньоклітинні пастки (НЗП) (Neutrophil Extracellular Traps, NETs).

Це сіткоподібні структури, в яких нейтрофіл захоплює і знищує бактеріальні клітини. Хімічний склад НЗП до кінця не вивчено, проведені біохімічні дослідження виявили в цих структурах: ДНК, білки-гістони, еластазу, гранулярні катіонні білки.

Провокують формування пасток прозапальні агенти, такі як інтерлейкін 8, ліпополісахарид (ЛПС) або форболмірісатацетат. З іншого боку, виявилось, що нейтрофіли цільної крові і її лейкоцитарної суспензії в нормі не утворюють спонтанних НЗП, незважаючи на періодичне збільшення концентрації активаторів в сироватці.

На думку ряду авторів, формування НЗП є механізмом захисту, чинним в тканинах і на поверхні слизових оболонок, причому особливо важливим в протиінфекційному захисті слизових.

Відкриття НЗП і встановлення їх антимікробної дії, як найважливішої ланки вродженого імунітету, є початком нового етапу в розумінні життєвого циклу і функцій НГ.

Формування НЗП може здійснюватися тільки активними НГ. Ефект антимікробних речовин, що входять до складу НЗП у зовнішньоклітинному просторі підсилюється.

На теперішній час механізм утворення НЗП на підставі наявних літературних даних може виглядати наступним чином.

Процес утворення НЗП починається з активації нейтрофіла. Відбувається запуск мембрано-зв'язаного мультимолекулярного ферментного комплексу NADPH-оксидази індукторами найрізноманітнішої природи. Паралельно активується протеїнкіназа C, що бере участь у внутрішньоклітинній передачі великого набору зовнішніх сигналів. Активуються процеси дихального вибуху.

Виникають активні форми кисню, які індукують набір ключових ферментів нейтрофілів (нейтрофільну еластазу і пептиди-аргінін-деїміназу-4 або PAD-4). Відбувається перетворення аргініну і залишків метиларгініну в цитрулін (реакція цитрулінації гістонів) в гістонових білках ядра. Наслідком цього є деконденсація хроматина і вивільнення ДНК.

В 2004 році було відкрито і розшифровано ще один механізм знищення патогенів, який використовують нейтрофіли. НГ при контакті з бактеріями можуть викидати мітохондріальну ДНК і ферменти в позаклітинний простір, зберігаючи при цьому життєздатність. Вони формують позаклітинну мережу, яка захоплює і знешкоджує бактерії (рис.5.1-3). Пастки здатні ефективніше, ніж жива клітина, уловлювати як частинки латексу, так і будь-які бактерії. Утворення нейтрофільних пасток є одним з основних механізмів участі нейтрофіла в протиінфекційному захисті слизових оболонок. При цьому клітини, що зберегли морфологію (клітини з сегментованими ядрами) мають більш виражену здатність до фагоцитозу. Проте, кількість мікроорганізмів, поглинутих нейтрофілом, значно поступається числу бактерій, що затримуються в пастках.

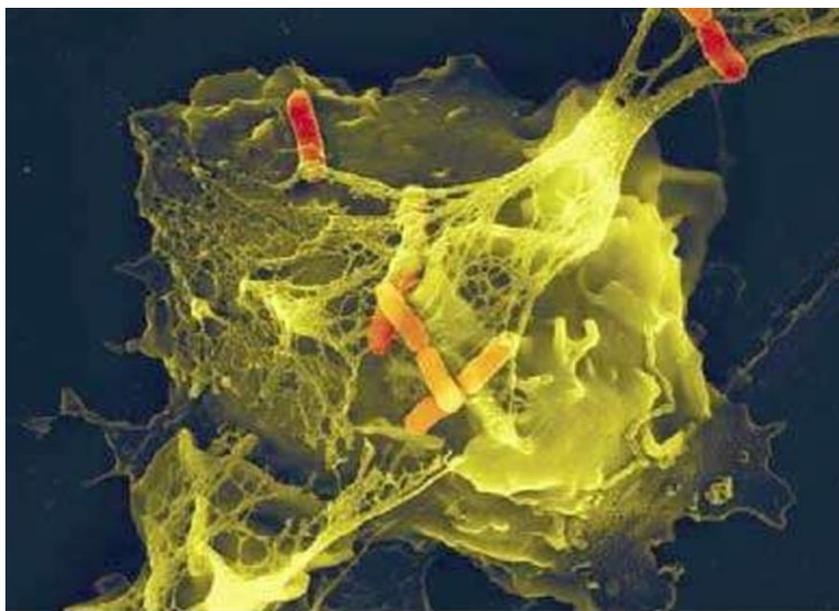


Рис. 5.1. Нейтрофільні зовнішньоклітинні пастки. Стимульований нейтрофіл з НЗП і декількома «захопленими» шигелами.

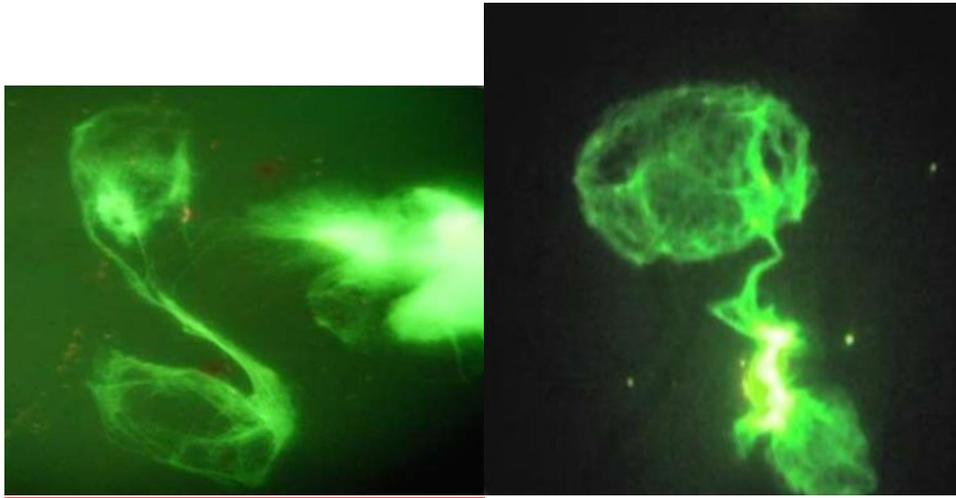


Рис. 5.2. Нейтрофільні зовнішньоклітинні пастки. Профарбовування люмінесцентною фарбою.

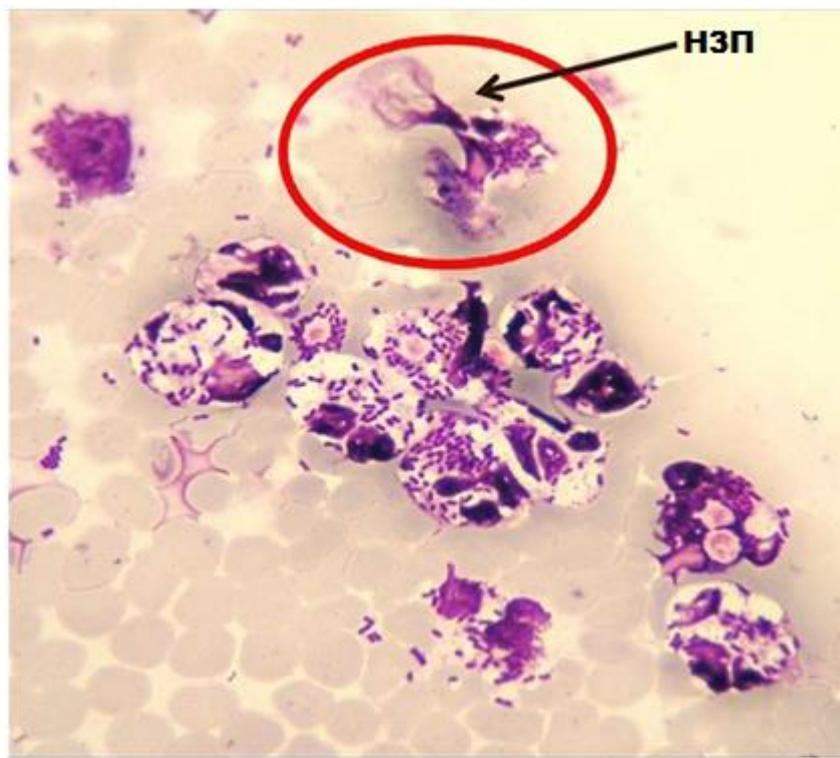


Рис. 5.3. Нейтрофільні зовнішньоклітинні пастки. Фарбування за Романовським-Гімзе.

В цілому в процесі формування пасток антимікробні компоненти нейтрофілів (мікробіцидні ферменти, антибактеріальні катіонні білки, нейтральні серинові протеази, металопротеїнази, кислі гідролази, продукти респіраторного вибуху - перекис водню, гідроксильний радикал, галогени,

атомарний кисень, оксид азоту, пероксинітрит і інші, в тому числі і мієлопероксидаза) зв'язуються внутрішньоклітинно з ДНК нейтрофіла, і секретуються в позаклітинний простір, утворюючи нейтрофільні позаклітинні пастки, обмежуючи пошкодження прилеглих тканин. Бактерії затримуються в цих структурах і руйнуються.

Залежно від природи збудливого агента, активований нейтрофіл вирішує ефекторні завдання або за допомогою фагоцитозу, або шляхом секреції біологічно активних речовин і ДНК з утворенням нейтрофільних зовнішніх пасток. При цьому позаклітинний механізм фіксації знищення мікроорганізмів є не тільки альтернативою фагоцитозу, але і в ряді випадків - більш ефективною функцією нейтрофілів.

Екстрацелюлярні пастки нейтрофілів активуються у відповідь на мікробні сигнали і сигнали ендогенної небезпеки і повинні строго регулюватися, щоб запобігти надмірному пошкодженню тканин під час гострого запалення або хронічного запального захворювання. Розмір мікроорганізмів, фактори мікробної вірулентності і цитокіни є регуляторами нетозу. Екстрацелюлярні пастки нейтрофілів мають кілька імуномодуючих функцій. Вони можуть праймувати інші імунні клітини, щоб викликати стерильне запалення або посилити автоімунітет, стимулюючи відповіді інтерферону завдяки асоційованій з екстрацелюлярними пастками нейтрофілів окисленій ДНК і антимікробним пептидам.

Після закінчення короткого періоду часу після стимуляції клітини ядра нейтрофілів починають втрачати свої сегменти, хоча ядерна оболонка ще залишається неушкодженою. У той же час простір між внутрішньою і зовнішньою ядерними мембранами розширюється. В результаті ядерна оболонка розпадається на безліч дрібних бульбашок і деконденсований хроматин. Ці бульбашки виникають з оболонки ядра. Далі гранули нейтрофіла розчиняються і внутрішньоклітинні компоненти розподіляються по всьому об'єму цитоплазми.

У процесі активації нейтрофілів індукується клітинна сигнальна система, що включає фосфатидил-інозитол-3-кіназу і серінтреонін-кіназу (СТК), яка відповідає за синтез білків, функцію мікротрубочок і аутофагію нейтрофіла. Ця система бере участь в дезінтеграції і розриві клітинної мембрани під час «нетоза». Після активації цитоскелета відбувається скорочення клітини до тих пір, поки не розірветься зовнішня мембрана. Високоактивна суміш, потрапивши в позаклітинний простір, формує своєрідну об'ємну мережу «пастку», в яку і потрапляють бактерії. Нейтрофіл при цьому гине. Ця клітинна загибель була названа терміном «NETosis».

Крім того, в пастках виявляються численні білки, що залучають до активації клітинне мікрооточення пасток. Наприклад, було виявлено, антимікробний пептид LL3 - продукт розпаду гранулярного білка кателіцидина. Цей пептид самостійно конвертує ДНК в активну форму, здатну стимулювати плазмоцитоїдні дендритні клітини з подальшим вивільненням цітокінів (ІФНа та ін.).

Для виявлення НЗП часто застосовують різні методи мікроскопії та способи фарбування препаратів. При цьому виявляють комплекси «ДНК-гістони», гранулярні білки пасток і т.д. Основою пасток є ДНК, її візуалізують високочутливими флуоресцентними барвниками, наприклад Sytox Green.

Розроблені методи дозволяють оцінити всі морфологічні форми нейтрофілів, ідентифікувати НЗП від слизу, яка присутня в мукозальних секретах, а також визначити не тільки кількість захоплених мікроорганізмів незміненими нейтрофілами і НЗП, а й ефективність їх кілінга.

Особливості визначення метаболічної активності активності нейтрофільних гранулоцитів в НСТ-тесті в тканинах і рідинах.

Виявлення нейтрофільних зовнішньоклітинних пасток.

Лабораторна робота № 5

План заняття:

1. Ознайомитись з принципом метода НСТ для оцінки метаболічної активності нейтрофілів.
2. Приготувати необхідні реагенти.
3. Приготування лейкозависі (виділення клітин).
3. Постановка методу НСТ-тесту.
4. Оцінка результатів, розрахунок показників. Підрахунок клітин в реакції НСТ-тесту.
5. Виявлення нейтрофільних зовнішньоклітинних пасток (НЗП).

Мета роботи: Ознайомитись з методами оцінки метаболічної активності клітин.

Практичні навички.

- Вміння приготувати інкубаційне середовище.
- Вміння приготувати фосфатний буфер.
- Вміння приготувати завись грибів *Saccharomyces cerevisiae* або *Candida albicans*.
- Вміння приготувати фізіологічний розчин.
- Вміння приготувати фарбник.
- Вміння користуватися аналітичними вагами.
- Вміння розрахувати індекс стимуляції.
- Вміння провести контроль якості.

Методичні вказівки до виконання заняття

НСТ-тест не тільки виявляє фагоцитуючі нейтрофіли, але й характеризує їх ферментні системи, так як інтенсивність відновлення НСТ відображає

енергетичні процеси, які забезпечують виробку біоокисників з бактерицидною дією.

Матеріали і обладнання

Реактиви: Нітротетразолієвий синій (тетранітросиній тетразолій), добова тест-культура мікроорганізмів – *Saccharomyces cerevisiae* (або *C.albicans*), або латексу; фізіологічний розчин або NaCl (сухий); спирт (або суміш Нікіфорова), барвник нейтральний червоний (або Романовського-Гімзе), дистильована вода, стандарт мутності. HCl (pH = 2,0); 3 мМ ЕДТА, імерсійне масло.

Обладнання: термостат, мікроскопи, лічильники клітин.

Лабораторний посуд: центрифужні пробірки, піпетки, предметні скельця, чашки Петрі, фільтрувальний папір.

Біологічний матеріал: жовч, перитонеальний ексудат, дуоденальні виділення, гомогенат тканини.

Отримання і обробка рідин і тканин. Підготовка проб: 1. Отримання жовчі, перитонеального ексудату, дуоденальних виділень: жовч, перитонеальний ексудат, дуоденальні виділення у об'ємі 1 мл центрифугуємо при 3000 об/хв протягом 15 хв.

2. Отримання гомогенатів тканини: видалену тканину відмиваємо від крові охолодженим до + 4 °С 0,9 % розчином NaCl, гомогенізуємо при + 4 °С з 0,9 % розчином NaCl (у співвідношенні 1:10), який містить 3 мМ ЕДТА.

Підготовка реагентів: 1) напередодні готуємо добову тест-культуру мікроорганізмів – *Saccharomyces cerevisiae* (або *C.albicans*), або латекс; 2) 2% розчин цитрату натрію або 3 мМ ЕДТА; 3) барвник нейтральний червоний в концентрації 0,1% або однопроцентний водний розчин метиленового зеленого.

Хід роботи. Постановка НСТ-тесту

Спонтанний НСТ-тест

На середину добре знежиреного скла поміщають 10 мкл зависі клітин, додають 10 мкл 0,1% водного розчину нітротетразолієвого синього (тетранітросинього тетразолія) і 10 мкл фізіологічного розчину, pH-7,0 і

перемішують обережно скляною паличкою. Інкубують препарати 30 хв в термостаті при 37 ° С. Надосад обережно видаляють, нахилом скла під кутом 45 °, і на предметному склі залишається мікролейкоконцентрат, обмежений гарно видимими контурами краплі. Лейкоцити внаслідок своїх адгезивних властивостей, прилипають до поверхні скла. Фіксують мазки в метанолі протягом 1 хвилини і дофарбовують ядра в 0,5% розчині нейтрального червоного на забуференому фізіологічному розчині рН-7,0 протягом 1 хвилини. Препарати промивають, висушують і проводять мікроскопію.

Результати реакції: формазан-позитивні гранули забарвлюються в темно-синій колір, ядра - в червоний. Підраховується відсоток формазан позитивних клітин і середній цитохімічний індекс (СЦІ) з використанням принципу Карлов (1955).

Стимульований НСТ-тест-навантажувальний тест in vitro

При постановці НСТ-тесту зі стимуляцією лабораторним штамом *Staph. aureus* (штам № 209), *Candida albicans* або латексом визначається резервний функціональний потенціал НГ. Для цього на середину добре знежиреного скла поміщають 10 мкл зависі клітин, додають 10 мкл *St.aureus* в розведенні 1 млрд. мікробних тіл в 1 мл фізіологічного розчину, і через 2 хвилини - 10 мкл тетранітросинього тетразолія. Інкубують препарат у волозій камері в термостаті при t 37° С протягом 30 хвилин. Надосад обережно видаляють нахилом скла під кутом 45°0, і на предметному склі залишається мікролейкоконцентрат, обмежений добре видимими контурами краплі. Фіксують препарати в метанолі протягом 1 хвилини, дофарбовують ядра в 0,5% розчині нейтрального червоного на забуференому фізіологічному розчині рН-7,0 протягом 1 хвилини. Мазки промивають, висушують, проводять мікроскопію.

Оцінка результатів реакції аналогічна такій в НСТ-спонтанному тесті: підраховують відсоток НСТ-позитивних клітин і середній цитохімічний індекс (СЦІ) з використанням принципу Карлов (1955). Крім того, виводиться коефіцієнт мобілізації (КМ) по відношенню

% формазан-позитивних НГ в стимульованому НСТ-тесті,

% формазан-позитивних НГ в спонтанному НСТ-тесті.

Показник функціонального резерву клітин (ПР) визначають як різницю між числом (інтенсивністю) індукованих НСТ-позитивних клітин і числом (інтенсивністю) спонтанних НСТ-позитивних клітин.

Візуальна оцінка цитохімічних реакцій з використанням принципу Kaplow:

0 ступінь - забарвлене тільки ядро, цитоплазма не пофарбована, не видно контурів гранул;

1-й ступінь - вся цитоплазма дифузно забарвлена або забарвлено не більше 1/4 цитоплазми;

2-й ступінь - в цитоплазмі добре видно забарвлені гранули, пофарбовано більше 1/4 цитоплазми;

3-й ступінь - всю цитоплазму займають гранули, але ядро вільне, пофарбовано 3/4 і більше цитоплазми;

4-я ступінь - гранули займають всю цитоплазму і нашаровуються на ядро.

Виведення середнього цитохімічного індексу (СЦІ).

Після підрахування 100 нейтрофілів виводиться середній цитохімічний індекс (СЦІ):

$СЦІ = (0a + 1b + 2c + 3d + 4e):100$, де a, b, c, d, e – кількість клітин відповідно 0, 1, 2, 3, 4-го ступеню.

Виявлення нейтрофільних зовнішньоклітинних пасток (НЗП)

Відкриття нового імунологічного феномена НЗП сприяло пошуку способів його виявлення. Brinkmann V. і співавт. для візуалізації пасток використовували скануючи електронну мікроскопію. Однак в загальній практиці цей метод важко доступний, так як вимагає наявності спеціального обладнання і реагентів.

Для виявлення нейтрофільних зовнішньоклітинних пасток часто застосовують різні методи мікроскопії та способи фарбування препаратів. При

цьому виявляють комплекси «ДНК гістони», гранулярні білки пасток і т.д. Основою пасток є ДНК, її візуалізують високочутливими флуоресцентними барвниками, наприклад Sytox Green.

Розроблені методи дозволяють оцінити всі морфологічні форми нейтрофілів, ідентифікувати НЗП від слизу, який присутній в мукозальних секретах, а також визначити не тільки кількість захоплених мікроорганізмів незміненими нейтрофілами і НЗП, а й ефективність їх кілінга.

Методичні вказівки до виконання заняття

Визначення нейтрофільних зовнішньоклітинних пасток при світловій мікроскопії з використанням ДНК-селективних барвників.

Матеріали і обладнання

Матеріал для дослідження - нейтрофіли, виділені з мукозальних секретів.

Реактиви: фізіологічний розчин, інактивована культура *Staphylococcus aureus*, спирт (або суміш Нікіфорова), барвник метиловий зелений, оцтова кислота, дистильована вода, імерсійне масло.

Обладнання: термостат, мікроскопи, лічильники клітин.

Лабораторний посуд: центрифужні пробірки, піпетки, предметні скельця, чашки Петрі, фільтрувальний папір.

Біологічний матеріал: слина, жовч, перитонеальний ексудат, дуоденальні виділення.

Підготовка реагентів: 1) напередодні готуємо добову тест-культуру мікроорганізмів – *Staphylococcus aureus*; 2) барвник 5-процентний розчин метиленового зеленого, приготований на 1% розчині оцтової кислоти.

Хід роботи

Проводять оцінку здатності виділених нейтрофілів утворювати нейтрофільні позаклітинні пастки в спонтанному (інкубація 180 хвилин з фізіологічним розчином) і стимульованому (інкубація 180 хвилин з *Staphylococcus aureus*) варіантах з мікроскопічною оцінкою результатів. До 0,1 мл суспензії клітин в концентрації 5×10^6 клітин / мл додають 10 мкл мікробної

суспензії *Staphylococcus aureus* в концентрації 1×10^8 бактеріальних клітин в 1 мл. Проводять інкубацію суміші протягом 180 хв при температурі 37°C.

Проби для визначення базального рівня НЗП інкубують за тих же умов, але без мікроорганізмів. Через 180 хв інкубації з реакційної суміші забирають 20 мкл вмісту і готують мазки. Після висушування мазки фіксують одним зі стандартних фіксаторів (96% етанолом або сумішшю Нікіфорова). Профарбовують їх 5% розчином метилового зеленого, приготованого на 1% розчині оцтової кислоти. Експозиція становить 5 хв. Барвники відмивають дистильованою водою, висушують препарати.

Облік результатів проводять за допомогою світлового мікроскопа з використанням імерсійного об'єктива 100 / 1,25; окуляра 10/22. Проводять підрахунок 100 морфологічних одиниць і визначають процентний вміст НЗП. Ядра нейтрофілів, нейтрофільні позаклітинні пастки, представлені тонкими нитками, які займають простір, в 2-3 рази перевершує діаметр незмінного нейтрофіла, профарбовуються в зелений колір (метиловий зелений). Цитоплазма гранулоцитів не фарбується.

Питання для обговорення:

1. Охарактеризувати процеси метаболізму, які відбуваються в клітині в нормі і при патології.
2. Дати визначення процесу метаболізму. За яких умов виникає окислювальний процес в клітині?
3. Дати характеристику механізмам окислювального стресу в крові.
4. Дати характеристику механізмам окислювального стресу в тканинах.
5. Які речовини ініціюють окислювальний стрес?
6. Чи впливають різні консерванти крові на окислювальний стрес?
7. Охарактеризувати різні модифікації НСТ-тесту.
8. НСТ-тест і визначення чутливості до імуномодуляторів.
9. Інтерпретація результатів визначення НСТ-тесту в крові.
10. Інтерпретація результатів визначення НСТ-тесту в тканинах і рідинах.

11. Спонтанний і стимульований варіанти НСТ-тесту.
12. Охарактеризувати середній цитохімічний індекс НСТ-тесту з використанням принципу Карлов .
13. Методи виявлення нейтрофільних зовнішньоклітинних пасток.

Використана література

1. Долгушин И.И. Нейтрофилы и гомеостаз / И.И.Долгушин, О.В.Бухарин. – Екатеринбург: Урал. отд-е РАН, 2001. – 283 с.
2. Стасенко А. А. Гуморальні і клітинні фактори регіонарного і системного імунітету у хворих на гнійний холангіт: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 14.03.15 “імунологія і алергологія” / А. А. Стасенко. – Київ, 1996. – 20 с.
3. Савочкина А.Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, методы обнаружения, биологическая роль: автореферат дис. ... доктора медицинских наук / А.Ю. Савочкина– 2012. – 42 с.
4. Маянский А.Н. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: Методические рекомендации / А.Н. Маянский, М. К. Виксман. – Казань, 1979. – 11 с.
5. Коротина О.Л. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, функции / О. Л. Коротина, И. И. Генералов // Иммунопатология, алергологія, інфектологія. – 2012. - №4. – С. 23-32.
6. Palmer L. J. Neutrophil extracellular traps in periodontitis. A thesis submitted to The University of Birmingham for the degree of doctor of philosophy / L.J.Palmer.- 2010. – P. 307.
7. Neeli I. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils / I. Neeli, S.N.Khan, M.Radic // The Journal of Immunology. – 2008. - № 180. – P. 1895-1902.
8. Lee W. L. The tangled webs that neutrophils weave / W. L.Lee, S. Grinstein // Science. – 2004. – Vol. 303, №5663. - P. 1477-1478.

9. Steinberg B. E. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death / B. E. Steinberg, S. Grinstein // *SciSTKE*. – 2007. - № 379. – P. 11.
10. Netting neutrophils in autoimmune small vessel vasculitis / K.Kessenbrock, M.Krumbholz, U. Schonermarck et al. // *Nature Medicine*. – 2009. – Vol. 15, № 6. – P. 623-625.
11. Plasmacytoid dendritic cells sense self DNA coupled with antimicrobial peptide / R.Lande, J.Gregorio, V.Facchinetti et al. // *Nature*. - 2007. – Vol. 449, №162. – P. 564-569.
12. Novel cells death program leads to neutrophil extracellular traps / T.A.Fuchs, U.Abed, C.Goosmann et al. // *J. Cell Biol.*- 2007. –Vol.176, № 2. – P. 231-241.
13. Mayadas T. N. Mechanisms of Immune Complex Mediated Neutrophil Recruitment and Tissue Injury /T. N. Mayadas, G. C. Tsokos, N.Tsuboi // *Circulation*. – 2009. – Vol. 120, № 20. – P. 2012-2024.
- 14.Leonard S. Kaplow A Histochemical Procedure for Localizing and Evaluating Leukocyte Alkaline Phosphatase Activity in Smears of Blood and Marrow / Leonard S. Kaplow// *Blood*.- 1955. - № 10. – P. 1023-1029.
- 15.Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann, U. Reichard. C. Goosmann [et al.] // *Science*. – 2004. - № 303. – P. 1532-1535.
16. Нейтрофильные ловушки: методы определения, биологическая роль / И.И. Долгушин, Ю.С. Андреева, А.Ю. Савочкина [и др.] // *Медицинская наука и образование Урала*. – 2009. – Т. 10, № 3. – С. 10-11.
17. Долгушин И. И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки / И. И. Долгушин, Ю. С. Андреева, А. И. Рыжкова // *Вестник новых медицинских технологий*. – 2009. – Т. XVI, № 2. – С. 14-16.
18. Novel cells death program leads to neutrophil extracellular traps / T.A.Fuchs, U. Abed, C. Goosmann et al. // *J. Cell Biol.* - 2007. – Vol.176, № 2. – P. 231-241.
19. Долгушин И.И. Нейтрофилы и гомеостаз / И. И. Долгушин, О. В. Бухарин. – Екатеринбург: Урал. отд-е РАН, 2001. – 283 с.

20. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. // Nat Rev Immunol. – 2018. - Feb;18 (2):134-147.

21. Возможности люминесцентной и световой микроскопии при определении внеклеточных нейтрофильных ловушек /О.В.Дядичкина, О.Л.Коротина, Л.Е.Радецкая, И.И. Генералов//ВЕСТНИК ВГМУ. - 2014, ТОМ 13, №5. – С. 81-86.

ТЕМА 6. ТРЕФОЇЛОВІ ФАКТОРИ – МАРКЕРИ МУКОЗАЛЬНОГО БАР'ЄРУ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ

Сімейство треоїлових факторів є групою пептидів, які синтезуються і виділяються епітелієм слизових оболонок. Загальною їхньою характеристикою є наявність структурного домену в формі листа конюшини, який сприяє стійкості треоїлових чинників до протеолітичної деградації. Найбільша кількість треоїлових чинників виявляється на слизовій шлунково-кишкового тракту, але вони також експресуються в слинних залозах, жовчному міхурі, дихальній системі, молочній залозі, матці, передміхуровій залозі, кон'юнктиві, щитовидній залозі, в нервовій системі.

У людини визначені 3 різновиди треоїлових факторів: TFF-1 (або PS2), TFF-2 (або спазмолітичний поліпептид SP) і TFF-3 (або кишковий поліпептид ITF). TFF-1 визначається, головним чином, в поверхневих клітинах слизового шару шлунка, переважно антрального відділу, в той час як TFF-2 знаходиться в слизу, який виробляється як клітинами слизової шлунка, так і залозами дванадцятипалої кишки - клітинами Бруннера. переважна локалізація TFF-3 - тонкий і товстий кишечник, де цей треоїловий фактор виробляється келихоподібними клітинами (табл. 6.1).

Таблиця 6.1

Номенклатура і локалізація треоїлових факторів

Назва	Синоніми	Локалізація
TFF1	PS2	Шлунок
TFF2	Спазмолітичний поліпептид SP Spasmolytic polypeptide SP	Шлунок, 12-пала кишка Stomach, duodenum
TFF3	Кишечний поліпептид ITF Intestinal trefoil factor ITF	Тонкий і товстий кишечник Small and large intestine

Ефекти треоїлових факторів багатогранні (рис. 6.1).

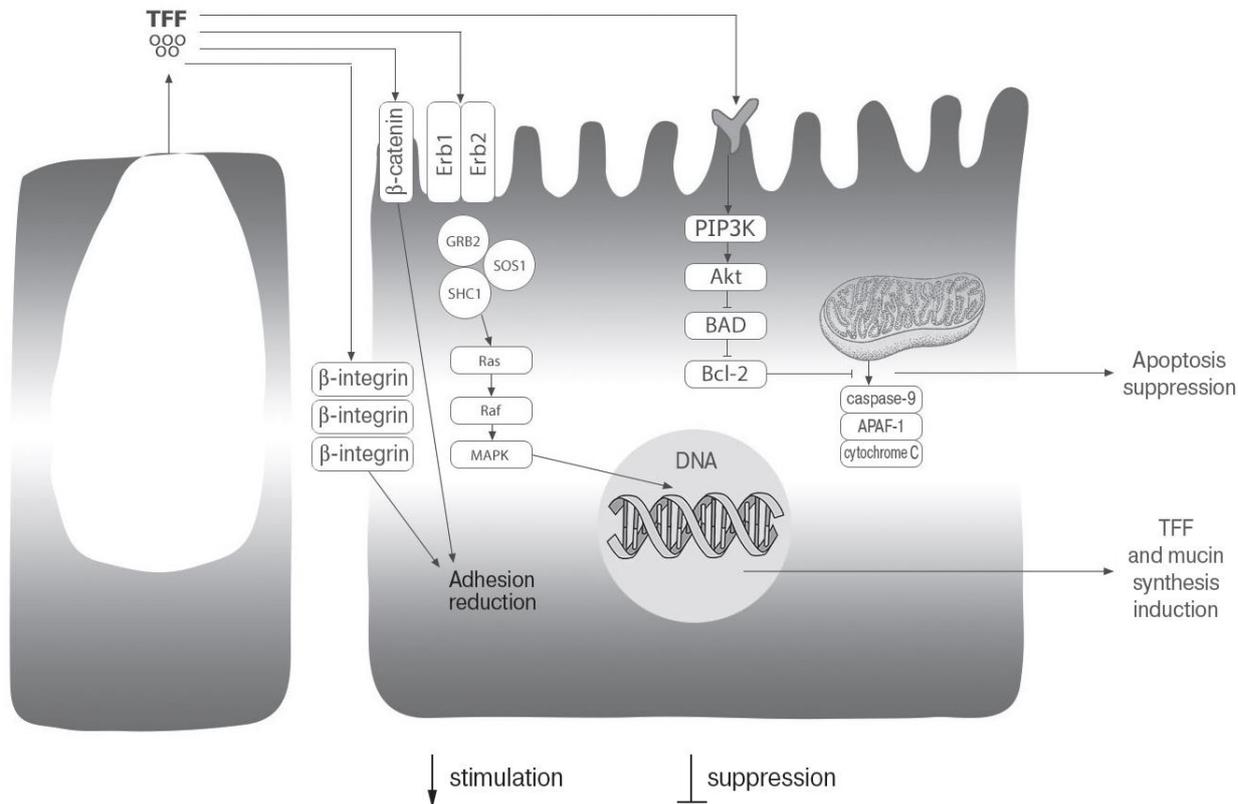


Рис.6.1. Вплив треоїлових факторів на епітеліальні клітини кишечника. Ефекти, опосередковані взаємодією з треоїлових факторів з β -катенінами, інтегринами, призводять до зменшення клітинної адгезії. Одночасно відбувається пригнічення апоптозу через фосфатидил-інозитол-3-кіназний шлях і посилення експресії захисних муцинів і самих треоїлових факторів

Всі 3 типи треоїлових чинників посилюють міграцію епітеліальних клітин, тим самим активно беручи участь в механізмі реституції. Даний ефект TFF-пептидів заснований на стимуляції утворення комплексів E-кадгерін / β -катенин в міжклітинній речовині. Формування міжклітинних контактів в епітеліальному шарі опосередковується E-кадгеріном, взаємодія якого з β -катеніном призводить до дестабілізації міжклітинних зв'язків і можливості міграції клітин.

Однак індукція міграції клітин під впливом TFF3 опосередковується також через MAP-кіназу (MAPK) незалежно від активності епітеліального

ростового фактора (EGF-R), тоді як антиапоптотичні властивості TFF3 залежать саме від активації EGF-R. Слід зауважити і той факт, що асоціація E-кадгеринів з α -катеніном, яка стимулюється TFF3-пептидом (який пов'язує E-кадгерин з актином цитоскелета) призводить до інвазії раку товстого кишечника через серозну оболонку в черевну порожнину. Крім того, TFF3 підсилює експресію матрикс-металопротеїнази-9, підвищуючи інвазивність непухлинних фібробластів.

Таким чином, конститутивна активність гена TFF1 надає клітинам інвазивний фенотип, і гіперекспресія TFF1, наприклад, в виразка-асоційованих клітинних лініях (UACL) або в ситуації пухлинної прогресії може мати патофізіологічне значення, сприяючи міграції і аутокринній стимуляції інвазивних властивостей епітеліальних клітин.

Зв'язок із захворюваннями

Останнім часом знайдено взаємозв'язок між рівнем експресії треоїлових чинників і наявністю захворювань шлунково-кишкового тракту (табл. 62).

Таблиця 6.2.

Зв'язок треоїлових чинників із запальними захворюваннями

Треоїловий чинник	Захворювання	Характер змін
TFF1	Запальні захворювання кишечника Ерозивні гастродуоденіти Виразкова хвороба	підвищення
TFF2	Ерозивні гастродуоденіти Виразкова хвороба	підвищення
TFF3	Запальні захворювання кишечника	зниження
	Виразкова хвороба	підвищення

Зокрема, показано зниження рівня сироваткового TFF1 у дітей з поверхневим гастродуоденітом, але підвищення вмісту TFF1 і TFF2 у дітей з ерозивним гастродуоденітом. Експресія TFF1 збільшується в клітинах слизової шлунка

при інфікуванні *H. pylori*. Показана дисрегуляція в експресії TFF при запальних захворюваннях кишечника, а сироватковий рівень TFF-3 корелює з процесом загоєння виразок при виразковому коліті з мінімальною активністю, але не при лікуванні антитілами проти TNF α .

Зміна експресії треоїлових чинників грає важливу роль в онкогенезі (табл. 6.3).

Таблиця 6.3.

Зв'язок треоїлових чинників з онкологічними захворюваннями

Треоїловий чинник	Захворювання	Характер змін
TFF1	Рак шлунка	зниження
	Колоректальна карцинома	підвищення
	Карцинома молочної залози	підвищення
TFF3	Рак шлунка	підвищення
	Карцинома щитовидної залози	підвищення
	Карцинома ендометрія	підвищення

Так, експресія TFF1 в тканинах пухлин шлунка знижена в порівнянні з не пухлинною тканиною. Разом з тим, експресія TFF1 підвищена в тканинах колоректальної карциноми в порівнянні зі слизовою товстої кишки, а рівень TFF1 в сироватці хворих колоректальною карциномою значно вищий, ніж у здорових осіб. Ряд авторів дійшли висновку, що рівень TFF3 є чутливим біомаркером стадії раку, наявності метастазів, а також показником чутливості до хіміотерапії за гастроінтестинального раку. Встановлено, що TFF1 може бути раннім маркером діагностики і характеру течії карциноми грудей, а TFF3 - карциноми щитовидної залози. Показано посилення впливу експресії треоїлових факторів на клітини ретинобластоми.

Також показано участь TFF в патогенезі захворювань легенів, гінекологічних захворювань, хвороби Альцгеймера.

Заклучення

Обсяг експериментальних і клінічних даних свідчить про те, що треоїлові фактори, виконуючи муцистабілізуючі, регенераторні, імуномодулюючі функції, широко представлені в організмі, залучені в патогенез захворювань і можуть розглядатися як перспективні маркери захворювань шлунково-кишкового тракту, онкологічних захворювань.

Питання для обговорення:

1. Загальна характеристика треоїлових факторів.
2. Ефекти треоїлових факторів.
3. Зв'язок треоїлових факторів із захворюваннями.

Використана література

1. Трефоилловые факторы – новые маркеры мукозального барьера желудочно-кишечного тракта /А.В. Шестопалов, А.С. Дворников, О.В. Борисенко, А.В. Тутельян// Инфекция и иммунитет. - 2019, Т. 9, № 1. – С. 39–46.
2. Aihara E., Engevik K.A., Montrose M.H. Trefoil factor peptides and gastrointestinal function. *Ann. Rev. Phys.*, 2017, vol. 79, pp. 357–380. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105447.
3. Barrera G.J., Tortolero G.S. Trefoil factor 3 (TFF3) from human breast milk activates PAR-2 receptors, of the intestinal epithelial cells HT-29, regulating cytokines and defensins. *Bratislavské Lekárske Listy*, 2016, vol. 117, no. 6, pp. 332–339.
4. Eder P., Stawczyk-Eder K., Korybalska K., Czepulis N., Luczak J., Lykowska-Szuber L., Krela-Kazmierczak I., Linke K., Witowski J. Trefoil factor-3 is not a useful marker of mucosal healing in Crohn's disease treated with anti-TNF- α antibodies. *World J. Gastroenterol.*, 2017, vol. 23, no. 1, pp. 135–140. doi: 10.3748/wjg.v23.i1.135.
5. Esposito R., Morello S., Vllahu M., Eletto D., Porta A., Tosco A. Gastric TFF1 expression from acute to chronic Helicobacter infection. *Front Cell Infect. Microbiol.*, 2017, vol. 7, pp. 434. doi: 10.3389/fcimb.2017.00434.

6. Henze D., Doecke W.D., Hornung D., Aqueusop I., von Ahsen O., Machens K., Schmitz A.A., Gashaw I. Endometriosis leads to an increased trefoil factor 3 concentration in the peritoneal cavity but does not alter systemic levels. *Reprod. Sci.*, 2017, vol. 24,no. 2, pp. 258–267. doi: 10.1177/1933719116653676.
7. Li Q., Wang K., Su C., Fang J. Serum trefoil factor 3 as a protein biomarker for diagnosis of colorectal cancer. *Technol.Cancer Res.Treat.*, 2017, vol. 16, no. 4, pp. 440–445. doi: 10.1177/1533034616674323.

ТЕМА 7. $\gamma\delta$ T-ЛІМФОЦИТИ

Вступ

$\gamma\delta$ T-лімфоцити є маловивченою гетерогенною популяцією T-лімфоцитів, яка домінує в слизових оболонках і поєднує в собі властивості клітин як вродженого, так і набутого імунітету. Відсутність процесингу і MHC-рестрикції обумовлює здатність $\gamma\delta$ T-клітин ідентифікувати широкий спектр антигенів, природа яких, як і механізм розпізнавання, до кінця не встановлені. Різноманіття біологічних функцій, основними з яких є цитоліз, імунорегуляція, презентація антигену і репарація пошкоджених тканин, визначають унікальну роль даної популяції при інфекційних, пухлинних і аутоімунних захворюваннях.

Загальна характеристика $\gamma\delta$ T-лімфоцитів

$\gamma\delta$ T-лімфоцити вперше були описані в середині 1980-х Saito et al. (1984) і Brenner et al. (1986) як гетерогенна субпопуляція T-клітин з T-клітинним рецептором, що складається з γ - і δ -ланцюгів ($\gamma\delta$ TCR). У людини варіабельні домени $\gamma\delta$ TCR кодуються 3 основними V δ -генами і не менше ніж 6 V γ -генами, що визначає високий поліморфізм $\gamma\delta$ TCR, більший потенціал до формування різноманітних ліганд-зв'язуючих ділянок в порівнянні з антигенними рецепторами $\alpha\beta$ T- і B-лімфоцитів і пояснює високу гетерогенність даної популяції.

Для $\gamma\delta$ T-лімфоцитів характерно тимічний і нетимічний онтогенетичний розвиток. В тимусі дозріває невелика популяція $\gamma\delta$ T-клітин, яка згодом дисемінує в інші органи і тканини. Поряд з тимусзалежним способом розвитку джерелом $\gamma\delta$ T-клітин можуть бути слизові оболонки, кістковий мозок і ембріональна печінка.

В організмі $\gamma\delta$ T-лімфоцити є мінорною субпопуляцією T-клітин в місцях типової локалізації лімфоцитів (селезінка та лімфатичні вузли), однак можуть бути присутніми у великих кількостях в інших тканинах (епітелій, печінка).

Характерною відмінністю Т-клітин з $\gamma\delta$ TCR є відсутність МНС-рестрикції і здатність до розпізнавання непептидних антигенів. Це обумовлює специфічні функції даної популяції, які включають як ефektorні реакції, опосередковані механізмами цитотоксичності, так і регуляцію імунної відповіді, репарацію тканини і підтримання антигенного гомеостазу.

Класифікація

Виділяють циркулюючі і резидентні $\gamma\delta$ Т-лімфоцити.

Циркулюючі $\gamma\delta$ Т-лімфоцити складають в середньому 1-10% від мононуклеарів периферичної крові (МПК) і експресують CD3 + V γ 9V δ 2 + TCR. Частота V γ 9V δ 2 + Т-клітин під час їх постнатальної експансії і селекції визначається факторами навколишнього середовища, головним чином інфекційними агентами. Для циркулюючих $\gamma\delta$ Т-лімфоцитів більш характерний тимусзалежний спосіб розвитку. Основною біологічною функцією V γ 9V δ 2 + Т-клітин є елімінація патогенів.

Резидентні $\gamma\delta$ Т-лімфоцити мають CD3+ V δ 1+ або CD3+ V δ 3+ TCR і домінують в слизових оболонках шлунково-кишкового, респіраторного і уrogenітального трактів. Більшість резидентних $\gamma\delta$ Т-клітин розвиваються тимуснезалежним способом. Крім виконання ефektorної цитотоксичної функції, резидентні $\gamma\delta$ Т-лімфоцити відіграють велику роль в імунорегуляції і імунологічному нагляді організму.

Hayday і Chen показали, що резидентні внутрішньоepітеліальні Т-клітини з $\gamma\delta$ TCR ($\gamma\delta$ IEL) знаходяться в диференційованому, але в спокійному стані («Activated-yet-resting T-cells») і беруть участь в реалізації механізмів природженого імунітету.

Ці малі за розміром лімфоцити характеризуються високим рівнем експресії генів, кодують ефektorні молекули (гранзими А та В), апоптоз-індукуючий FasL, СС-хемокін RANTES, ранній активаційний антиген CD69, і мають потенціал для подальшої активації.

У мишей також існує кореляція експресії $\gamma\delta$ TCR з певними анатомічними областями, після реанжировки V γ -сегментів $\gamma\delta$ T-лімфоцити виходять з тимусу в певний період фетального або неонатального розвитку і заселяють різні тканини організму. Так, серед $\gamma\delta$ T-лімфоцитів периферичної крові, селезінки і лімфатичних вузлів домінують субпопуляції V γ 1 + і V γ 4 + T-клітин; в легенях, матці і язиці переважно локалізовані V γ 6+ T-лімфоцити. Генерація деяких субпопуляцій, переважно кишкових IEL, які несуть V γ 7+ TCR, відбувається екстратимічно. Поряд з іншими субпопуляціями $\gamma\delta$ T-лімфоцитів у мишей присутні також дендритні епідермальні V γ 5 + T-клітини (DETC), аналогів яких у людини не спостерігається. Ці резидентні клітини, імовірно, мають тимічне походження і відіграють роль в розпізнаванні антигенів в епідермісі.

Активатори $\gamma\delta$ T-лімфоцитів

На відміну від $\alpha\beta$ T-клітин $\gamma\delta$ T-лімфоцити не активуються пептидними антигенами, що презентуються молекулами MHC I і II класу, але здатні відповідати на небілкові антигени, як власної, так і чужорідної природи. Антиген-презентуючі молекули, які їх представляють, на сьогоднішній день не ідентифіковано.

Антигени, які розпізнаються $\gamma\delta$ T-лімфоцитами, можна розділити на фосфоантигени і індукібельні антигени. Фосфоантигени -низькомолекулярні не пептидні речовини, містять фосфатну або пірофосфатну групи, які постійно експресуються в бактеріальних, рослинних і тваринних клітинах.

Крім фосфоантигенів $\gamma\delta$ T-лімфоцити можуть розпізнавати антигени, які індукібельно експресуються в певних типах клітин, наприклад, в епітелії в результаті трансформації, запалення або стресу (ультрафіолет, нагрівання, токсичність, оксидативний і осмотичний стрес). Клас індукібельних антигенів представлений неklasичними антиген-презентуючими молекулами. До цього часу не встановлене, чи розпізнають $\gamma\delta$ T-лімфоцити ці антигени безпосередньо, або вони ідентифікують інші антигенні структури, які презентують в складі даних молекул.

Біологічні функції $\gamma\delta$ T-лімфоцитів

Сучасні концепції, що відображають всі аспекти складної поведінки $\gamma\delta$ T-лімфоцитів, розглядають цю популяцію як «клітини першої лінії захисту», «регуляторні клітини», або «клітини-посередники між вродженою і набутою імунною відповіддю». У зв'язку з тим, що ця популяція комбінує в собі властивості клітин як вродженої, так і набутої імунної відповіді, з точністю не можна віднести $\gamma\delta$ T-лімфоцити до тієї чи іншої категорії клітин. В силу своєї гетерогенності популяція $\gamma\delta$ T-лімфоцитів має різноманітні біологічні функції, які визначаються багатьма факторами: структурою антигенних рецепторів, розподілом клітин в тканинах, локальним мікрооточенням, способом активації клітин і стадією імунної відповіді, на якій відбувається їх активація та ін.

Програмування в процесі розвитку накладає епігенетичний стан на $\gamma\delta$ T-клітини, що асоціюється з кількома фенотиповими ознаками, включаючи здатність швидко реагувати та безпосередні вроджені подразники (наприклад, цитокіни / ліганди NKG2D), які одночасно асоційовані із ослабленою та / або зміненою реакцією залучення і TCR. Попереднє програмування також впливає на анатомічну локалізацію $\gamma\delta$ -клітин. Таким чином, дозрілі попередники DETC (Dendritic epidermal T cells) - дендритних епідермальних T-клітин підвищують регуляцію gpr15 (orphan G protein-linked chemoattractant receptor) рецептора хемоаттрактанта, зв'язаного з білком G, CCR10 і CCR4, що полегшує локалізацію в епідерміс, багатий спорідненими хемокінами. Таким чином, дискретні функціональні потенціали асоціюються з дискретними анатомічними місцями (рис. 7.1). Наприклад, ні активований DETC, ні кишкові TCR $\gamma\delta$ IELs зазвичай не експресують IL-17, тоді як IL-17 є первинним продуктом субепітеліальних $\gamma\delta$ -клітин шкіри та кишечника, тобто ті, що знаходяться в дермі та власній пластинці відповідно. Дійсно, IL-17 продукується $\gamma\delta$ T-клітинами в епідермісі при псоріазі або при супутніх псоріазу патологіях.

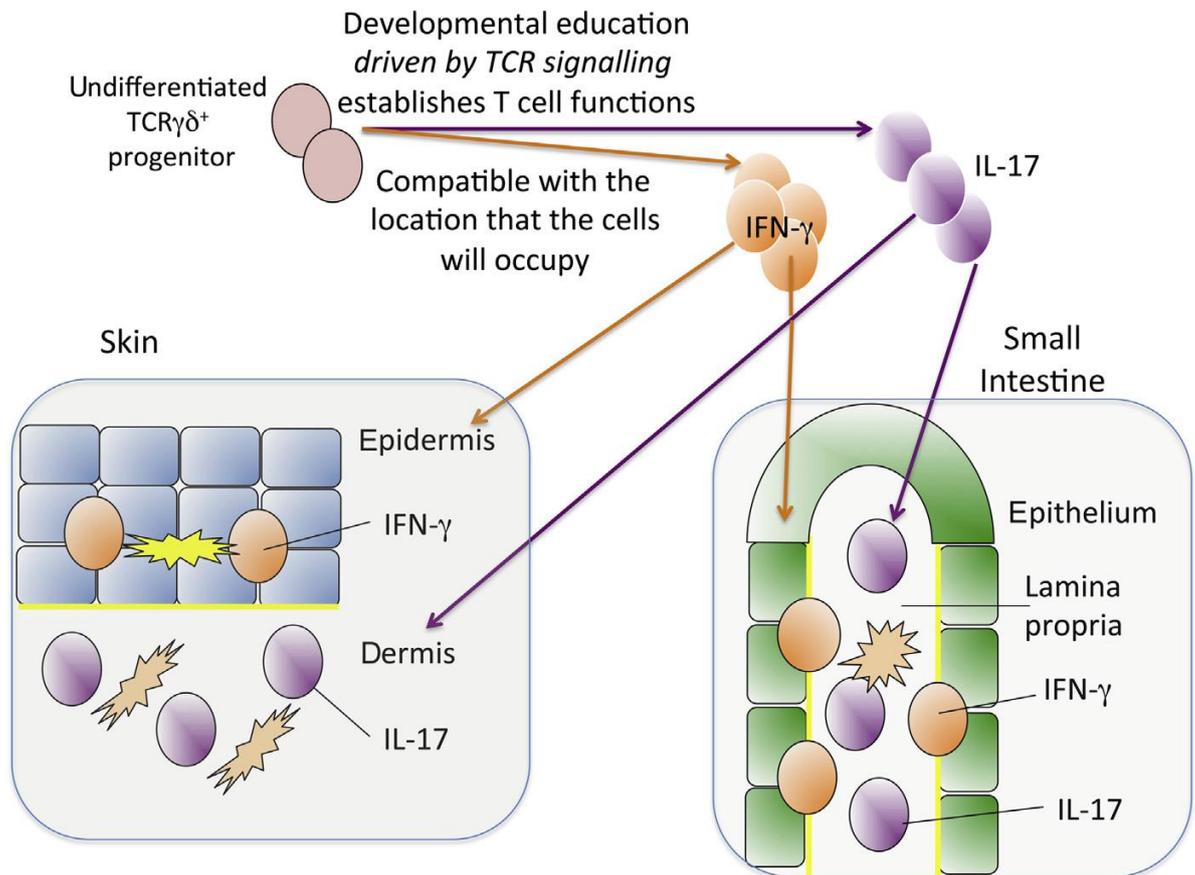


Рис.7.1. Функції суттєвої фракції (хоча і не всіх) $\gamma\delta$ -Т-клітин встановлюються шляхом попереднього програмування розвитку, полегшуючи швидку реакцію клітин відповідно до мікроанатомічних місць, які вони займають.

Серед основних біологічних ефектів Т-клітин з $\gamma\delta$ TCR виділяють цитотоксичність, імунорегуляцію, презентацію антигенів і репарацію пошкоджених тканин і органів.

Цитотоксична функція. $\gamma\delta$ Т-лімфоцити здатні виявляти цитотоксичність щодо інфікованих, пухлинних і аутореактивних клітин організму. Ефекторні функції активованих $\gamma\delta$ Т-лімфоцитів у багатьох аспектах схожі з такими $\alpha\beta$ Т-клітин: $\gamma\delta$ Т-лімфоцити продукують велику кількість запальних цитокінів (TNF α і IFN γ) і проявляють цитотоксичність щодо широкого спектра клітин-мішеней.

Активовані $\gamma\delta$ T-лімфоцити синтезують перфторин, гранзими, гранулізин, сергліцин, катепсин С і серпіни. Крім основних гранзимів, А і В, $\gamma\delta$ T-лімфоцити також експресують високий рівень гранзимів в поєднанні з низьким рівнем гранзимів D, E, F, G. Поряд з перфторин-гранзимовим шляхом лізис клітин-мішеней $\gamma\delta$ T-лімфоцитами може опосередковуватись за рахунок експресії Fas / FasL, TRAIL і NKG2D. Широкий спектр цитотоксичної активності і здатність цієї популяції активуватися TCR-незалежним способом ставить $\gamma\delta$ T-лімфоцити на рівень вище серед кілерних клітин щодо специфічних мішеней.

Імунорегуляторна функція. Поряд з CD + CD25+, CD4 + CD45RB +, CD8+, NT / NKT, CTLA4 +, Tr1 і Th3, $\gamma\delta$ T-лімфоцити відносять до популяції T-регуляторних клітин, які відіграють важливу роль у формуванні та підтримці імунологічної толерантності. $\gamma\delta$ T-лімфоцити залучаються до імунорегуляції дендритних клітин (DCs), макрофагів, $\alpha\beta$ T-клітин, гранулоцитів і NK-клітин. $\gamma\delta$ T-лімфоцити здатні модулювати активність імунокомпетентних клітин безпосередньо або опосередковано, за рахунок цитокінової продукції (про- чи протизапального характеру), а також активації клітин вродженого імунітету.

Участь в дозріванні дендритних клітин. Людські $V\gamma 9V\delta 2+$ T-лімфоцити здатні індукувати дозрівання DCs за допомогою TCR-CD1, а також FasL-Fas взаємодії. Активація незрілих DCs відбувається в 2 етапи. на початковому етапі сигнали від TCRs і NKRs індукують експресію молекул, що належать до сімейства TNF / TNFR (CD40L, FasL, TNF α). Дозрівання незрілих DCs за участю $V\delta 2+$ T-лімфоцитів відбувається за рахунок сигналу від CD40L / CD40 молекул, в той час як FasL / Fas взаємодія опосередковує активацію незрілих DCs, індуковану $V\delta 1+$ T-лімфоцитами. Перераховані вище молекули, а також TNF α підвищують експресію коstimуляторних молекул (CD80, CD83, CD86) і молекул MHC I і II класу на незрілих DCs. На заключному етапі відбувається повне дозрівання DCs в IL-12-продукуючі клітини за рахунок сигналів від TLRs і IFN γ T-клітинного походження. У свою чергу DCs

індукують проліферацію $\gamma\delta$ Т-лімфоцитів і сприяють збільшенню синтезу цитокінів Th1-типу (TNF α і IFN γ). Це приводить до посилення власної активації $\gamma\delta$ Т-клітин, опосередковує їх цитолітичний ефект і подальше праймування прозапальної адаптивної імунної відповіді.

Регуляція $\alpha\beta$ Т-лімфоцитів. $\gamma\delta$ Т-клітини беруть участь в широкому спектрі прозапальних функцій. Проте, накопичуються докази того, що $\gamma\delta$ Т-клітини також мають регуляторні функції.

Механізми, за допомогою яких $\gamma\delta$ Т-лімфоцити регулюють функціональний потенціал $\alpha\beta$ Т-лімфоцитів *in vivo*, мало вивчені і до кінця не з'ясовані. Експериментальні дослідження показали, що $\gamma\delta$ Т-лімфоцити мають цитолітичну активність щодо $\alpha\beta$ Т-клітин. Fas-залежна здатність $\gamma\delta$ Т-лімфоцитів регулювати $\alpha\beta$ Т-клітинну запальну відповідь на філогенетично різноманітні мікроби була показана як у мишей, так і у людини. Доведено кілерну активність $\gamma\delta$ Т-лімфоцитів щодо CD4⁺ Th2-лімфоцитів і макрофагів. Крім цитолізу $\gamma\delta$ Т-клітини залучаються в імунорегуляцію за допомогою продукції цитокінів, хемокінів і костимулюючих молекул.

Активовані $\gamma\delta$ Т-лімфоцити є потужним продуцентом IFN γ . Мишачі і людські $\gamma\delta$ Т-клітини відповідають на активацію $\alpha\beta$ Т-клітин, експресуючи IL-21R, ліганд для якого IL-21 продукується активованими CD4 + Т-клітинами. IL-21, як і IL-15, є регулятором активності $\gamma\delta$ Т-лімфоцитів, сприяє проліферації і підсилює перфоринзалежну цитолітичну функцію.

При певних умовах $\gamma\delta$ Т-клітини також мають здатність до синтезу Th2-цитокінів (IL-4, IL-10, TGF β). Резидентні Т-клітини з $\gamma\delta$ TCR синтезують мало відомі цитокіни: IL-16, який регулює відповідь Th2-лімфоцитів і дозрівання DCs, а також IL-17B, який опосередковує підвищення синтезу IL-6 і IL-8 (CXCL8 у людини).

$\gamma\delta$ Т-лімфоцити активно експресують хемокіни MIP-1 α (CCL3, macrophage inflammatory protein-1 α), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5, regulated on activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted) і MMIF (macrophage

migration inhibitory factor). Активовані DETC $\gamma\delta$ Т-лімфоцити, експресуючи CCL1, сприяють міграції регуляторних Т-клітин в шкіру і тим самим залучаються до регуляції запальної відповіді.

Для $\gamma\delta$ Т-клітин описано безліч різних імуносупресивних механізмів, найбільш важливі з яких представлені на цьому рисунку (рис. 7.2).

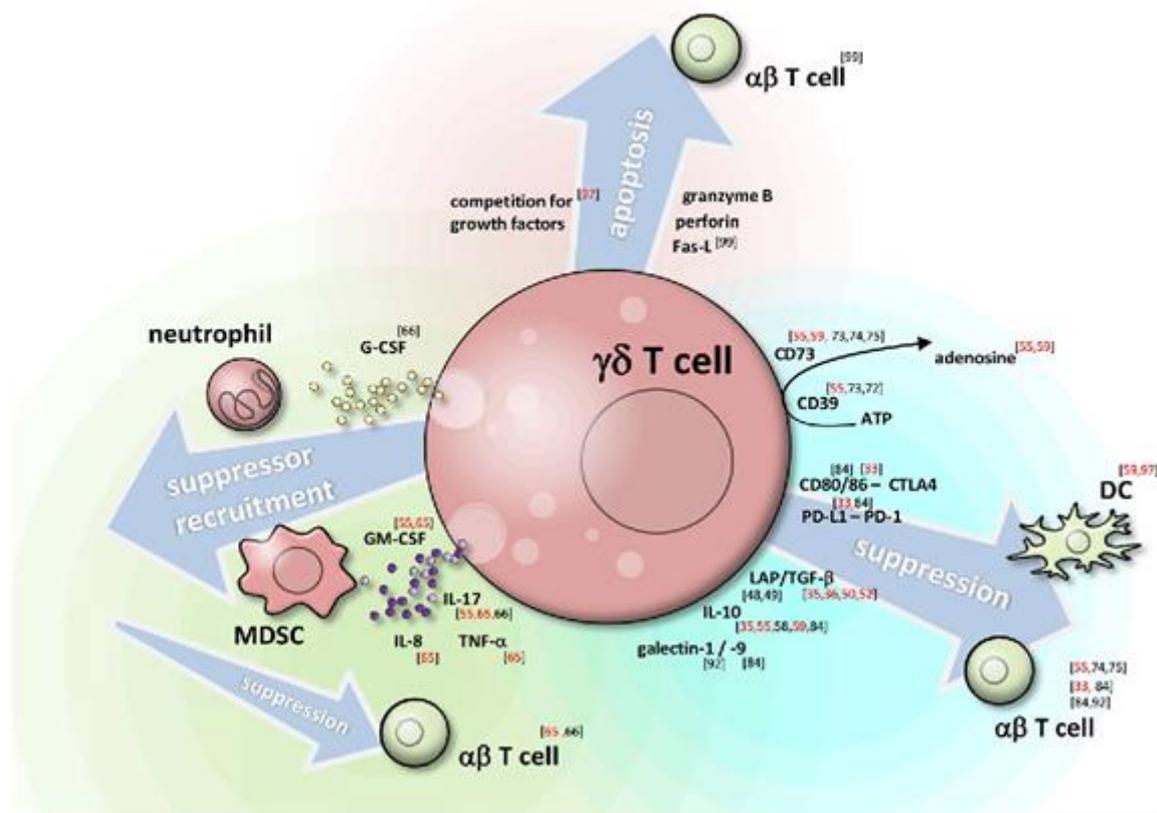


Рис. 7.2. Імуносупресивні механізми $\gamma\delta$ Т-клітин.

(С. Peters, D. Kabelitz, D. Wesch, 2018)

$\gamma\delta$ IELs і DETC, подібно регуляторним CD4+ CD25 + Т-клітинам, постійно експресують GИTR (glucocorticoid induced TNF receptor) і мають антипроліферативний ефект по відношенню до Т-лімфоцитів. Різні субпопуляції $\gamma\delta$ Т-клітин експресують TNFR-подібні молекули (CD27 і 4-1BB), які беруть участь в імунорегуляції за рахунок залучення активованих В-клітин, моноцитів і DCs шляхом взаємодії з CD70 і 4-1BBL відповідно.

Участь $V\gamma 9V\delta 2$ + Т-лімфоцитів в гуморальному імунітеті. Міграція $V\gamma 9V\delta 2$ + Т-лімфоцитів в лімфовузли підтверджується присутністю цих клітин в гермінальних центрах В-клітинних фолікулів. Їх наявність може припускати прямий вплив на В-клітинну імунну відповідь. Активовані $V\gamma 9V\delta 2$ + Т-лімфоцити експресують основні костимулюючі молекули-ліганди для В-лімфоцитів CD154 (CD40L), CD134 (OX40), CD70 (CD27L), CD278 (ICOS). Характерно, що активовані тонзиллярні $V\gamma 9V\delta 2$ + Т-лімфоцити мають цитокіновий і хемокіновий рецепторний профіль, аналогічний TFH (T follicular helper- Т-хелпери з потенційною В-хелперною активністю). Подібно TFH $V\gamma 9V\delta 2$ + Т-лімфоцити виконують *in vitro* хелперну функцію щодо В-клітин, впливають на продукцію антитіл, в тому числі на перемикання класів імуноглобулінів та формування аутоантитіл. Підвищена активність $\gamma\delta$ Т-клітин у людини асоціюється з високим титром аутореактивних антитіл.

Антиген-презентуюча функція $\gamma\delta$ Т-лімфоцитів. У 2005 р в Moser et al. показали, що $\gamma\delta$ Т-лімфоцити можуть виступати в якості професійних APCs і ініціювати антиген-специфічну відповідь у наївних $\alpha\beta$ Т-лімфоцитів. Більшість циркулюючих $V\gamma 9V\delta 2$ + Т-клітин, на відміну від $\alpha\beta$ Т-лімфоцитів, які не експресують CCR7, що перешкоджає їх міграції в лімфатичні вузли, де більшість Т-лімфоцитів зустрічаються з антигеном, презентуючим DCs. Однак під час короткочасної антигенної стимуляції $V\gamma 9V\delta 2$ + Т-лімфоцити можуть набувати фенотипу професійних APCs. На противагу DCs, $\gamma\delta$ Т-лімфоцити повинні бути попередньо активовані перш ніж вони почнуть захоплювати антиген. Активація $V\gamma 9V\delta 2$ + Т-клітин відбувається при зустрічі з фосфоантигенами в області запалення або інфекції, куди вони мігрують за рахунок експресії рецепторів до запальних хемокінів для здійснення кілінга інфікованих клітин. Після активації $\gamma\delta$ Т-лімфоцити починають тимчасово експресувати хоумінговий рецептор CCR7, який сприяє їх міграції в дренажні лімфатичні вузли. Більш того, на $V\gamma 9V\delta 2$ + Т-клітинах підвищується експресія МНС II класу і костимулюючих молекул (CD40, CD80, CD86) до рівня,

порівнянню з таким у DCs. В такому стані $\gamma\delta$ T-лімфоцити можуть індукувати первинну відповідь $\alpha\beta$ CD4⁺ T-лімфоцитів як на антигени, які презентують в складі MHC II і не потребують процесингу (наприклад, toxic shock syndrome toxin TSST-1), так і на антигени, що вимагають процесингу (наприклад, tetanus toxoid і PPD). Активовані $\gamma\delta$ T-лімфоцити здатні також стимулювати проліферацію і диференціювання CD8⁺ $\alpha\beta$ T-клітин в цитотоксичні T-лімфоцити.

Репарація пошкоджених тканин. $\gamma\delta$ T-клітини здатні синтезувати різні типи ростових факторів (фактор росту кератиноцитів KGF, фактор росту сполучної тканини CTGF, фактор росту фібробластів FGF-9, матрілізін MMP-7), які впливають на епітеліальні клітини і регулюють загоєння рани, фібріногенез. Jameson and Navran показали унікальну роль $\gamma\delta$ IELs в підтримці тканинного гомеостазу в шкірі мишей. Людські V γ 9V δ 2⁺T-клітини, стимульовані антигеном, також забезпечують інтегративність епітелію під час інфекційного процесу, що відіграє важливу роль в механізмах завершення запального процесу. Здатність $\gamma\delta$ T-клітин регулювати відновлення і зростання епітеліальних шарів може супресувати запальні інфільтрати шляхом посилення резистентності тканини.

Різноманіття біологічних функцій $\gamma\delta$ T-лімфоцитів передбачає їх участь в імунологічному контролі інфекційних процесів, пухлинного росту і аутореактивних клонів лімфоцитів в організмі як за допомогою розчинних молекул, так і за рахунок клітинного контакту.

Заключення

$\gamma\delta$ T-клітини є мінорною MHC-нерестриктованою популяцією T-лімфоцитів, якій притаманні властивості і функції як клітин вродженого, так і набутого імунітету. Використання $\gamma\delta$ T-лімфоцитами як TCRs, так і NKRs для розпізнавання своїх лігандів, виділення серед них функціонально спеціалізованих клітинних популяцій, корелюючих з експресією варіабельних генів або протеїнів TCRs, взаємодія з клітинами вродженого імунітету на різних

рівнях, різноманітність ефektorних функцій, імунорегуляція і їх здатність до презентації антигенів свідчать про унікальну біологічну роль $\gamma\delta$ T-лімфоцитів в імунітеті.

Питання для обговорення:

1. Загальна характеристика $\gamma\delta$ T-лімфоцитів.
2. Класифікація $\gamma\delta$ T-лімфоцитів.
3. Активатори $\gamma\delta$ T-лімфоцитів.
4. Біологічні функції $\gamma\delta$ T-лімфоцитів.

Використана література

1. Нижегородова Д.Б., Зафранская М.М. $\gamma\delta$ T-лимфоциты: Общая характеристика, субпопуляционный состав, биологическая роль и функциональные особенности Медицинская Иммунология. - 2009, Т. 11, № 2-3, стр. 115-130.
2. C. Peters, D. Kabelitz, D. Wesch Regulatory functions of $\gamma\delta$ T cells //Cellular and Molecular Life Sciences. - 2018;75(12):2125-2135.

ТЕМА 8. Мікрофлора кишечника і механізми імунорегуляції

Шлунково-кишковий тракт (ШКТ) макроорганізму це відкрита біологічна система, яка знаходиться в постійному контакті з мікросвітом. У різних відділах травного тракту людини мешкає приблизно від 500 до 1000 видів бактерій загальною чисельністю 10^{13} – 10^{14} клітин, що в 100 разів перевищує загальну кількість клітин організму. Основний принцип дії протективних механізмів, які здійснюють контроль за колонізацією ШКТ полягає в здатності відрізнити непатогенні елементи (бактерії-комменсали, їжа) від ентеропатогенних. У нормі існує регуляція і вибірковість механізмів захисту, які в кінцевому підсумку визначають імунологічну толерантність щодо індигенної мікрофлори або імунну відповідь на патогени. Втрата "оральної" толерантності до комменсалів нормальної мікрофлори може привести до алергії, розвитку аутоімунних розладів і запальних захворювань кишечника.

Аналіз результатів великої кількості досліджень проведених в останнє десятиліття дозволяє вважати, що ШКТ це частина імунної системи людини. У реалізації імунних механізмів на рівні інтестинального тракту беруть участь три ключових і одночасно взаємозалежних компонента: I - нормальна мікрофлора, II - лімфоїдна тканина, асоційована зі слизовою оболонкою кишечника, III- цитокіни як фактори міжклітинної взаємодії, продукти секреції імунокомпетентних і фагоцитарних клітин.

Нормальна мікрофлора кишечника і імунорегуляція

Нормальна мікрофлора кишечника підрозділяється на облігатну і факультативну. До облігатної відносяться мікроорганізми, що постійно входять до складу нормофлори і які відіграють важливу роль в метаболізмі організму-господаря і його захисту від збудників інфекційних захворювань. Представники факультативної частини мікрофлори досить часто зустрічаються у здорових людей, але вони не постійні і час від часу змінюються.

Нормальна мікрофлора на 90-95% складається з строго анаеробних видів, а всі факультативні анаероби і аероби складають 1-5%. Якісні (видові) і кількісні співвідношення між різними групами мікроорганізмів характеризуються певною стабільністю, що важливо для реалізації різноманітних функцій нормальної мікрофлори, таких як підтримка колонізаційної резистентності, участь в процесах травлення, синтезу вітамінів і бактеріоцинів. Поряд з цим, нормальна мікрофлора втягується в імунні механізми: сприяє становленню імунної системи шлунково-кишкового тракту, виконує імуномодулюючі функції, проявляє активність ад'юванта. В цьому плані привертає увагу період ранньої мікробної колонізації кишечника.

Відомо, що імунний статус дітей раннього віку розглядають як функціональний імунодефіцит. Становлення власного імунітету, починаючи з "імунодефіциту новонароджених" і до розвитку імунологічної компетенції, відбувається на тлі мікробної колонізації кишечника. Саме нормальній мікрофлорі належить істотна роль у цьому процесі.

Мікрофлора кишечника в якості ад'юванта і імуномодулятора

Для мікрофлори кишечника здорових дітей першого року життя характерний високий популяційний рівень біфідобактерій. У цей період біфідобактерії можуть становити до 95% всього біоценозу товстої кишки. Поряд з підтримкою балансу мікробної екології та попередженням бактеріальної транслокації, бактерії цього роду виявляють ад'ювантну активність. Так, було показано, що при додаванні штаму *Bifidobacterium breve* в клітинну культуру пейєрових бляшок разом з різними антигенами (rotavirus, poliovirus або influenzavirus) продукція антиген-специфічних IgA була вищою, ніж при введенні тільки антигену; у дітей, які отримували цей препарат, були високими титри анти-ротавірусних IgA-антитіл і знижена частота виділення вірусу; поряд з цим була відзначена додаткова продукція анти-influenza IgG антитіл.

Як і біфідобактерії, лактобактерії відносяться до облігатної мікрофлори кишечника людини. Однак частота їх виявлення у дітей на ранніх етапах фізіологічної адаптації поступається цим показникам для біфідобактерій, крім того, кількісний рівень цієї групи бактерій, менш стабільний ніж рівень біфідобактерій і схильний до значних коливань. Було показано, що у здорових дітей тільки до 8 місяців життя частота лактобактерій досягає 100%. У зв'язку з цим необхідно відзначити, що в роботах останніх років частота виявлення лактобактерій, їх кількісний рівень, а також видове різноманіття все частіше ставиться в залежність від вживаних в їжу кисломолочних та інших продуктів, які їх містять. Крім того, якісний і кількісний рівні інтестинальних лактобактерій, можливо, більшою мірою залежать від контролю з боку імунної системи організму людини в порівнянні з рівнями, характерними для менш імуногенних біфідобактерій. Нещодавно було показано, що бактерії роду *Lactobacillus* здатні активувати клітинний імунітет і пригнічувати IgE продукцію. Так, штам *Lactobacillus casei* Shirota, мав властивість змінювати фенотип Т-хелперів (Th) від неонатально домінованих Th2, що беруть участь в реакціях гуморального імунітету, на Th1, що беруть участь в клітинному імунітеті.

Отримані результати по частоті виявлення бактероїдів в мікрофлорі кишечника дітей раннього віку, підтверджують припущення про те, що запізнення контамінації товстої кишки грамнегативними неспороутворюючими облігатно-анаеробними бактеріями може бути пов'язане з їх високою чутливістю до токсичної дії кисню повітря, що перешкоджає їх швидкій передачі від дорослого оточення до дитини, а також необхідності попереднього зниження окисно-відновного потенціалу в товстій кишці дитини, яке досягається в результаті первинної контамінації кишечника бактеріями, що відносяться до аеробної флори.

В останні кілька років рядом дослідників був виявлений тісний зв'язок між інтестинальною колонізацією бактероїдами і дозріванням місцевої імунної

системи слизової ШКТ. Було показано, що бактероїди виду *B. fragilis* здатні індукувати розвиток гуморальної імунної відповіді. Зокрема встановлено, що колонізація бактероїдами супроводжувалася підвищенням рівня IgA- і IgM-секретуючих клітин в периферійній крові дітей раннього віку.

Нещодавно було показано, що соматична гіпермутація кластера генів імуноглобулінів в В-лімфоцитах солітарних лімфоїдних фолікулів слизової кишки і перемикання класу антитіл на sIgA індукуються колонізацією кишки бактероїдами і іншими облигатними анаеробними бактеріями і в цілому грають критичну роль в регуляції кишкової мікрофлори.

Крім зазначених груп бактерій, які складають аутохтонну частину кишкової мікрофлори здорових дітей, в ранні періоди фізіологічної адаптації в кишку в великих кількостях виявляються бактерії, які відносяться до умовно-патогенних алохтонних груп. Такими групами бактерій є коагулазопозитивні стафілококи, цитрат-асиміляційні ентеробактерії і ешерихії з низькою біохімічною активністю, а також зі здатністю до продукції гемолізинів. Однак для цих груп бактерій характерна негативна динаміка якісного і кількісного складу з прогресуючою частковою або повною елімінацією до кінця першого року життя, що відображає динаміку становлення як імунних так і інших механізмів, які контролюють мікробну колонізацію.

Лімфоїдна тканина, асоційована зі слизовою оболонкою шлунково-кишкового тракту

Гістологічно в травній трубці виділяють слизову оболонку (*tunica mucosa*), підслизову оболонку (*tunica submucosa*), м'язову оболонку (*tunica muscularis*) і поверхневу серозну оболонку (*tunica serosa*). У складі слизової оболонки виділяють епітелій, власну пластинку слизової оболонки (*lamina propria*, lp) та м'язову пластинку слизової (*lamina muscularis*). Верхні відділи травного тракту від ротової порожнини до кардіального сфінктера шлунка, а також дистальні відділи прямої кишки вистелені багат шаровим плоским епітелієм. Похідні середньої і задньої кишки до яких відносяться шлунок, тонка

і товста кишка вистелені одношаровим призматичним епітелієм. Власна пластинка розташована під епітелієм і відділена від нього базальною мембраною. Лімфоїдна тканина кишечника (GALT, gut-associated lymphoid tissue), представлена різними клітинами і скупченнями клітин, розташованими як в епітелії, власній пластинці слизової, так і в підслизовій основі. Імунокомпетентні клітини, що володіють різною функціональною активністю, розташовуються або дифузно в товщі слизової або у вигляді скупчень - солітарних лімфоїдних фолікулів. Присутність лімфоїдних фолікулів об'єднаних у великі кластери (пейєрові бляшки), є характерною ознакою GALT тонкої кишки. Лімфоїдні утворення товстої кишки переважно представлені солітарними фолікулами.

Імунологічно в лімфоїдній тканині кишечника виділяють індуктивну і ефекторну зони. Для індуктивної зони характерні такі етапи імунної відповіді як антиген (Аг) - презентація, розпізнавання Аг і формування Аг - специфічних клонів лімфоїдних клітин. Для ефекторних зони характерні - синтез імуноглобулінів В-клітинами, прояв клітинної цитотоксичності Т-кілерами, продукція цитокінів Т-лімфоцитами, макрофагами і НК-клітинами.

В індуктивній зоні кишечника знаходяться пейєрові бляшки, солітарні фолікули, фолікулярні утворення червоподібного відростка. У різних зонах фолікулів містяться зрілі лімфоцити на різних етапах диференціювання, макрофаги, дендритні клітини. Т - клітини мають в основному CD4 + фенотип з функцією посилення IgA-синтезу і в меншій мірі CD8+ фенотип, що опосередковують цитотоксичність. В В-клітинних зонах фолікулів присутні як попередники продуцентів IgA, так і зрілі клітини з маркерами CD19+, CD20+, CD21+, а також sIgM і sIgD. Функція пейєрових бляшок спрямована на "праймування" наївних Т - і В - лімфоцитів, під час їх активації, проліферацію і визначення напрямку диференціювання, наприклад, в бік синтезу IgA в разі В лімфоцитів. Необхідний в процесі праймування контакт з антигеном здійснюється за участю епітелію. На моделях *in vitro* було показано, що на рівні

ШКТ можливе селективне розпізнавання сигналів, що виходять від різних видів бактерій. Так, при обробці ентероцитів людини лінії HT-29 грам-негативними бактеріями відзначали синтез прозапальних цитокінів TNF α , IL-8, MCP-1, GM-CSF і ця індукція посилювалася при комбінації *Escherichia coli* з IFN γ , з іншого боку кисломолочні бактерії подібний ефект не викликали. В іншому дослідженні при вивченні взаємодії лакто-і біфідобактерій з лейкоцитами крові людини за допомогою проточної цитометрії було встановлено, що штам *Lactobacillus johnsonii* La1, високо адгезивний до ІЕС, стимулював імунокомпетентні клітини як в напрямку проліферації, так і продукції цитокінів IL-12 і IFN γ ; цей ефект не спостерігали при використанні штаму *E.coli*. Нарешті, було показано, що при спільному культивуванні клітин лінії CaCo2 з мононуклеарами і стимуляції штамами *E.coli* K-12 і *Lactobacillus kasei* 681 була індуквана продукція прозапальних цитокінів TNF α , IL-8 і MCP-1. Інший вид лактобацил (*L.johnsonii*), не стимулював продукцію цих цитокінів, але посилював синтез мРНК TGF β .

Таким чином, інша концепція, що дозволяє пояснити механізм оральної імунологічної толерантності є прояв активності супресуючого фактора TGF β (трансформуючий фактор росту- β). Вважають що його функція пов'язана з супресією прозапальних стимулів індукованих умовно-патогенною або патогенною мікрофлорою. Клітинами продуцентами TGF β служать CD4 $^{+}$ Т клітини і макрофаги. Причому, вважається що цей цитокін є продуктом клону Th3 клітин за стимулюючої дії IL-4, IL-5 і IL-10, синтезованих Th2 клітинами. Ці фактори і клітини продукуються в пейєрових бляшках.

При вивченні постнатальної адаптації імунної системи новонароджених було виявлено переважання прозапальних цитокінів на тлі зниження потенціалу протизапальних факторів. Вважають, що розвитку системної запальної реакції у здорових дітей в ранній постнатальний період на тлі масивної стимуляції харчовими антигенами і антигенами мікробного походження, мабуть,

перешкоджає збільшення синтезу лімфоцитами протизапальних цитокінів IL-4 і TGF β і механізми зворотного зв'язку, що запускаються ними.

Відносно недавно була запропонована нова концепція, яка пояснює механізм обмеження або попередження імунної / запальної відповіді на інтестинальну мікрофлору. Центральна роль в цьому процесі належить клітинам епітелію кишечника, які здатні регулювати синтез ефektorних молекул запалення за різних прозапальних стимулів. Показано, що експресія цитокінів епітеліоцитами відбувається за участю фактора транскрипції NF-kB, що є компонентом еволюційно стародавнього регуляторного сигнал-трансдуктивного шляху. NF-kB будучи ДНК-зв'язувальним білком і ефектором транскрипції активується безліччю прозапальних стимулів і бере участь в синтезі *de novo* прозапальних цитокінів, хемокінів, білків адгезії, необхідних для реалізації імунозапальної функції. Прозапальні стимули активують NF-kB через регульоване фосфорилування, убіквітинацію і протеоліз його інгібітора (IkB). У спокої NF-kB пов'язаний зі своїм інгібітором (IkB), так що його сигнальна амінокислотна послідовність, що відповідає за транспорт в ядро, маскується і NF-kB залишається в цитоплазмі. Фосфорилування IkB за допомогою IkB кіназ (IkKa і IkKb) приводить його до деградації, що дозволяє NF-kB транслокуватися в ядро, зв'язуватися з енансерними послідовностями і активувати транскрипцію генів - мішеней, що кодують синтез медіаторів запалення, наприклад IL-1, IL -8, TNF α . Було встановлено, що цілий ряд патоген-асоційованих молекулярних патернів (LPS, пептидоглікани, флажеліну, одноланцюгові молекули ДНК, бактеріальні та грибові ліпопротеїди) запускають TLR опосередковану активацію NF-kB.

Дана гіпотеза дозволила відповісти на питання: 1) якщо прозапальні ентеропатогени активують NF-kB, то відповідно непатогенні мікроорганізми здатні селективно атенювати цей шлях і індукувати імунологічну толерантність? Позитивну відповідь було отримано в дослідях *in vitro*, при взаємодії авірулентного штаму *Salmonella sp* з експериментальною моделлю

епітелію людини, що не приводило до індукції синтезу ефекторних молекул запалення; 2) як співіснують "дружні" мікроби з макроорганізмом? Автори представляють слизовий епітелій кишечника як імунологічний і анатомічний бар'єр, клітини якого експресують на поверхні молекули сімейств TLR і МНС I і II класів, що дозволяє їм брати участь в процесі розпізнавання і презентації антигенів мікробів.

Зв'язок між мікробіотою ШКТ і психічним здоров'ям людини

Взаємини між мозком і мікрофлорою кишечника (мікробіотою) є одним із прикладів кооперації нервової та імунної систем, значення яких для організму в нормі і при патології важко переоцінити. За даними літератури маса мікробіоти ШКТ у дорослої людини досягає 2,5-3,0 кг, чисельність кишкових мікроорганізмів за даними різних дослідників становить 10^{12} - 10^{14} клітин. На початку ХХ століття І.І. Мечников порівнював мікробіоту кишечника з функцією печінки і пропонував розглядати її в якості окремого органа.

Мікробіота впливає на розвиток когнітивних функцій і гіпоталамо-гіпофізарної відповіді на стрес. Кишкові бактерії продукують серотонін, мелатонін, гама-аміномасляну кислоту, катехоламіни, гістамін і ацетилхолін, - частина з них є найважливішими нейромедіаторами і можуть діяти не тільки на кишкову нервову систему, але в першу чергу - на центральну. Мозок і комменсали кишечника взаємопов'язані один з одним і ця кооперація є частиною гомеостазу, який підтримує не тільки стабільність мікробіоти, але також модулює функції мозку і поведінку.

Інфекція і запалення призводять до змін настрою і когнітивної дисфункції. Зокрема, мозок здатний дізнаватися про впровадження патогенних мікробів в ШКТ і відповідати почуттям тривоги і занепокоєння. За даними літератури це спостерігалось при пероральному введенні патогенних бактерій мишам (*Campylobacter jejuni* або *Citrobacter rodentium*). Дози, що використовували, викликали класичні симптоми інфекції - слабкість, зниження апетиту, порушень в соціумі.

В даний час не викликає сумнівів, що депресія супроводжується активацією системи запалення і що прозапальні цитокіни і ЛПС можуть індукувати депресивні симптоми. Рівень IGM і IGA антитіл проти ЛПС ентеробактерій (*Hafnia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Pseudomonas*) був значно вище у пацієнтів з депресією, ніж у волонтерів. Порушення проникності слизової ШКТ приводило до підвищеної транслокації бактерій і ЛПС, визначаючи найважливішу роль в патофізіології депресії. Психічні відхилення виявлялися у 60% пацієнтів із захворюваннями ШКТ за даними літератури.

Таким чином, мікробіота ШКТ впливає на моторні та імунні функції кишечника, а також впливає на вищу нервову систему.

Питання для обговорення:

1. Нормальна мікрофлора кишечника і імунорегуляція.
2. Мікрофлора кишечника в якості ад'юванта і імуномодулятора.
3. Лімфоїдна тканина, асоційована зі слизовою оболонкою шлунково-кишкового тракту.
4. Зв'язок між мікробіотою ШКТ і психічним здоров'ям людини.

Використана література

1. Микрофлора кишечника и механизмы иммунорегуляции. / С.С.Хромова, А.Н.Шкопоров, Б.А.Ефимов и др. // Вопр. Детской диетологии. – 2005. – Т. 3(1). – С. 92-96.
2. Связь между микробиотой ЖКТ и психическим здоровьем человека / Козлов А.Е., Казанцев А.В., Вязовченко В.А., Сизов С.В., Абросимова Ю.С. // Bulletin of Medical Internet Conferences (ISSN 2224-6150) 2015. Volume 5. Issue 12. – P.1692.

ТЕМА 9. Шкіра як периферичний лімфоїдний орган

Шкіра - один з найбільших органів людського тіла. Оскільки шкіра є основним інтерфейсом із зовнішнім світом, високотехнологічні фізична та імунологічна системи еволюціонували для боротьби із зовнішніми патогенами. Шкіра має два основних відділи: епідерміс і дерму (рис. 9.1). Зважаючи на свою захисну роль, шкіра ссавців складається з двох частин - фізичних бар'єрів та імунологічних бар'єрів. Роговий шар (stratum corneum-SC) і щільні з'єднання (tight junctions -TJ) працюють на епідермальному рівні в якості першої та другої ліній "фізичних" бар'єрів. Навіть якщо зовнішній зловмисник подолає ці сильні бар'єри, інтегровані вроджені та набуті механізми імунної системи скоординовано активізуються як в епідермісі, так і в дермі, щоб нейтралізувати зловмисника як третя лінія «імунологічного» бар'єру.

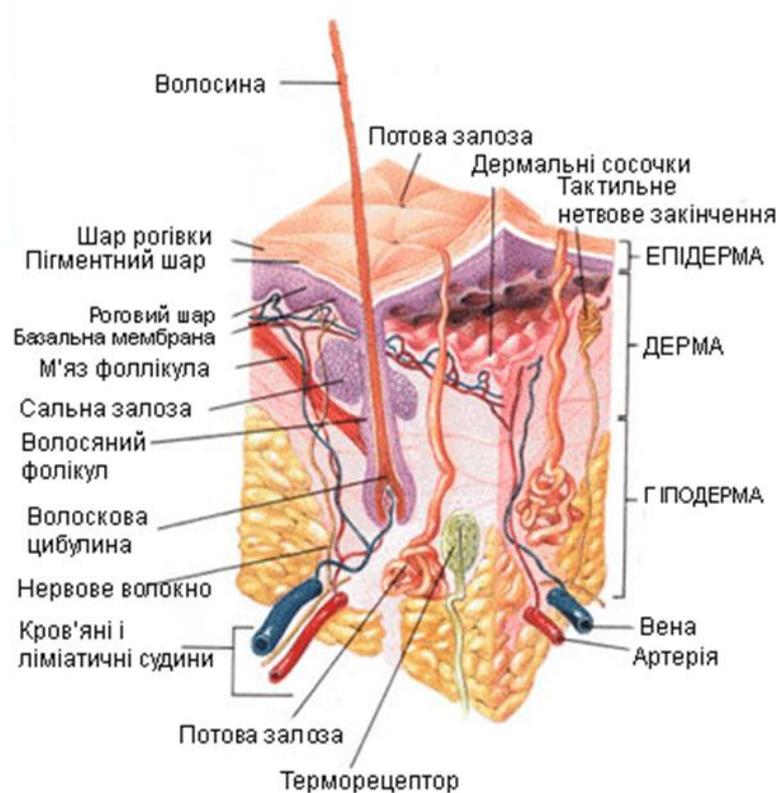


Рис. 9.1.Схематичний розріз шкіри.

Щоб зрозуміти складну імунну систему шкіри, ми спочатку обговоримо фізичні бар'єри в епідермісі. Потім ми розглянемо імунологічний бар'єр в епідермісі та дермі. В останньому параграфі ми описуємо традиційне поняття лімфоїдна тканина асоційована зі шкірою (skin-associated lymphoid tissue - SALT) та нещодавно запропоновану концепцію індуктивної SALT (iSALT), що нагадує нам, що шкіра - це більше, ніж просто периферія вогнища запалення, вона є важливим компонентом лімфатичної системи.

Епідермальні фізичні бар'єри

Епідерміс людини складається з чотирьох шарів кератиноцитів: 10–30 шарів мозолистих клітин (роговий шар: stratum corneum - SC), три шари зернистих клітин (stratum granulosum - SG), 5–10 шарів остистих клітин та один шар базальних клітин (рис. 9.2).

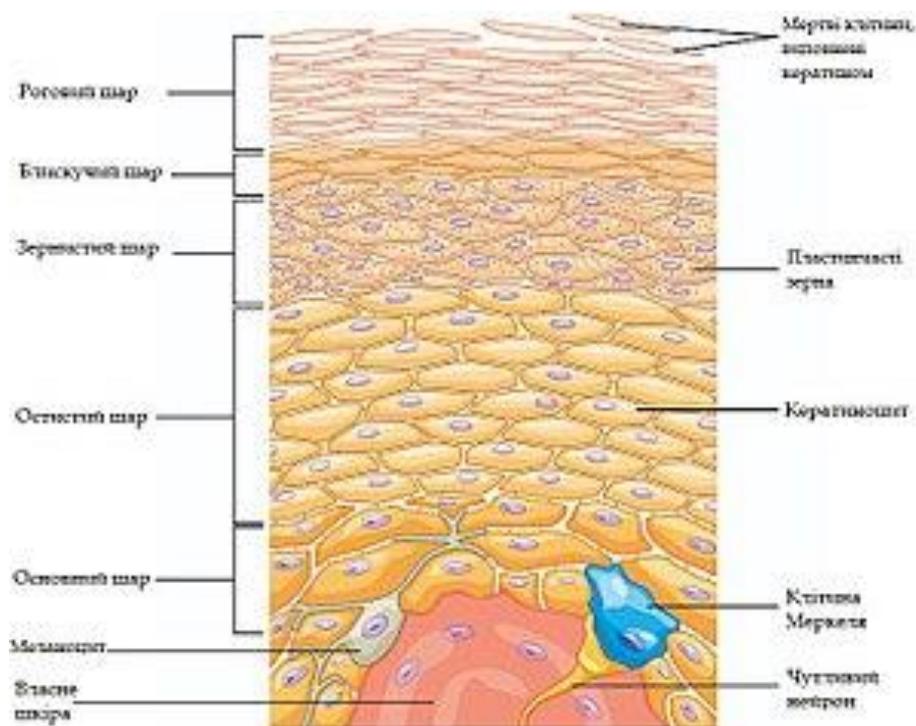


Рис. 9.2.Шари надшкір'я

В гомеостатичному стані епідерміс зазнає повного оновлення кожні 28 днів в результаті розмноження та десквамації клітин.

Існує два різних типи епідермісу: інтерфолікулярний епідерміс і епідерміс волосяного фолікула. Основна різниця між ними - існування рогового шару (SC). Так як більшість білкових антигенів (Ags) не здатні пронизувати роговий шар в нормальній умовах, вони намагаються проникнути через волосяний фолікул епідермісу. Однак під роговим шаром (SC) та у фолікулах волосся щільні з'єднання (TJ) регулюють проникнення макромолекул. Таким чином, ці два послідовні фізичні бар'єри, та щільні з'єднання, захищають нас на рівні епідермісу.

Роговий шар

Роговий шар є кінцевим продуктом неживих кератиноцитів, він розташований у зовнішній більшій частині інтерфолікулярного епідермісу. Він складається з корнеоцитів, міжклітинних ліпідів та кількох інших секретованих ферментативних та структурних білків. Оскільки роговий шар служить як інтер'єрний бар'єр повітря – рідина та захищає живі клітини від дегідратації, порушення його функцій безпосередньо пов'язані із сухістю шкіри (ксероз). У свою чергу, ксероз може привести до дисфункції та розладів рогового шару, таких як атопічний дерматит (АД). Виявлено кілька важливих причин ксерозу (табл. 9.1).

Таблиця 9.1

Причини сухості шкіри

Зниження ліпідів рогового шару	Зменшення керамідів, холестерину або незамінних жирних кислот
Зміна рН рогового шару	Порушення вивільнення амінокислот, уроканової кислоти, або молочної кислоти рогового шару. Зниження потовиділення
Надмірне вираження протеази в роговому шарі	Надмірна експресія калікреїну або хімаз
Дефект білка рогового шару	Дефект білка філагрін або матрин

Міжклітинні ліпіди складаються з керамідів, холестерину і незамінних жирних кислот в еквімолярному співвідношенні. Вони заповнюють проміжки між корнеоцитами і утворюють пластинчасті структури. Структурний зв'язок між корнеоцитами і міжклітинними ліпідами часто порівнювали з «Системою цегли та розчину». Міжклітинні ліпіди необхідні для гідратації, оскільки їх дефіцит може привести до аномалій бар'єру, що характеризуються збільшенням транс-епідермальної втрати води та змінами в структурах рогового шару. Було показано, що підвищена регуляція рН калікреїн-пов'язаної пептидази (Kallikrein-related Peptidase - KLK5) безпосередньо активує рецептор активований протеїназою і індукує надмірну експресію тимічного стромального лімфопоетину (TSLP), опосередковану ядерним фактором карраВ (NF-kB), який загострює запалення шкіри при синдромі Нетертона.

Філагрін є одним з найважливіших білків, що секретуються зернистим шаром епідермісу. Філагрін-похідні міжклітинні природні зволожуючі фактори необхідні для підтримки зволоження шкіри та низького рН в роговому шарі. А знахідка у варіанті мутацій з втратою функції у гені, що кодує ген FLG, була визначена причиною моногенного захворювання іхтіозу вульгарного, який характеризується сухою шкірою, що злущується. Було показано, що ці варіанти також пов'язані з АД. Крім того, ген *Tmem / Matt*, який кодує інший важливий білок в роговому шарі матрин, також нещодавно був визначений як ген схильності до АД. Ці спостереження слугують прямим доказом гіпотези про те, що аномалія бар'єру в роговому шарі - це не просто епіфеномен, але також ініціатор його патогенезу.

Щільні з'єднання

Щільні з'єднання (ТЗ) складаються з декількох важливих білків, таких як клаудини та оклюдини. Як друга лінія бар'єру під роговим шаром або як бар'єр першої лінії у волоссі фолікул, щільні з'єднання закривають верхівкові міжклітинні простори кератиноцитів на другому зернистому шарі (рис. 9.1). Таким чином, вони регулюють парацелюлярний обіг іонів та розчинних

макромолекул. Виходячи з неможливості малих молекул-слідів в 557 Да пройти через щільні з'єднання, вважається, що вони інгібують проникнення активатора сигнальних білків антигенів, молекулярна маса якого зазвичай перевищує декілька 1000 Да.

Показано значення щільних з'єднань в бар'єрній функції на тваринних та людських моделях. Нокаут-дослідження клаудину-1 як TJ-специфічного інтегрального мембранного білка продемонстрували, що щільні з'єднання функціонують як парацелюлярні дифузійні бар'єри епідермісу і мають вирішальне значення для гомеостазу рідини у мишей. Синдром іхтіоз-склерозуючого холангіту у новонароджених (NISCH) викликаний мутацією гена CLDN1, який характеризується властивостями, спільними з АД, наприклад, сухим злущенням шкіри. Нещодавнє повідомлення вказало на те, що експресія клаудину-1 значно знижується в шкірі при АД. Крім того, аналіз одонуклеотидного поліморфізму також виявив, що ген CLDN1 є новим геном сприйнятливості до АД.

Епідермальні імунологічні бар'єри

Епідерміс людини складається з двох основних популяцій: кератиноцитів (КЦ) та клітин Лангерганса (КЛ). Миші мають додаткову популяцію $\gamma\delta$ Т-клітин. Тут ми зупинимося на імунологічних аспектах КЦ та КЛ.

Кератиноцити як імунні сторожові та імунні посередники

Останнім часом було встановлено важливість КЦ як імунних сторожових /посередників, в більшій мірі ніж структурних компонентів. Не тільки тому, що вони відчують патогени та сторонні небезпечні агенти, а й тому, що вони негайно реалізують вроджені та пристосувальні імунні реакції шляхом секреції численних цитокінів, хемокінів та антимікробних пептидів.

Кератиноцити експресують декілька Toll-подібних рецепторів (TLR): TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 та TLR6 на клітинних поверхнях, і TLR3, TLR7 та TLR9 в ендосомах. Патоген-асоційовані молекулярні структури (PAMP) мікробного походження, такі як ліпополісахарид (LPS), пептидоглікан,

флагелін та нуклеїнові кислоти, сприймаються деякими з цих TLR. Сигнали від цих рецепторів полегшують секрецію численних цитокінів, включаючи сімейство інтерлейкінів (IL) -1 (IL-1a, IL-1b та IL-33), IL-6 та фактор некрозу пухлин (TNF). Імунні відповіді, викликані різними TLR, є різними, а численні хемокини секретуються для залучення Т-клітин, нейтрофілів, дендритних клітин (ДК), або еозинофілів, залежно від типу запалення. Активовані КЦ також здатні обумовлювати КЛ чи ДК до переважання Т-хелперної (Th) типу 1-, Th2- або Th17 імунної відповіді за допомогою сигналів TLR або секрецією різних типів цитокінів.

Кератиноцити також відчувають ендogenous, пов'язані з пошкодженнями молекулярні патерни (DAMP), які вивільнюються від некротичних або стресових клітин господаря в результаті екзогенних сигналів небезпеки, таких як подразники і токсини. Клас білків, які кодуються нуклеотид-зв'язуючим доменом, збагаченим повторними нуклеотидами лейцину (NLR) сімейства генів дозволяє КЦ розпізнавати не тільки ці DAMPs, але також гаптени, ультрафіолетове світло та ендogenous PAMPs. Ці ендogenous сигнали активують інфламасомний комплекс, що приводить до активації каспази-1 і подальшої активації прозапальних цитокінів, таких як IL-1b та IL-18.

Крім того, КЦ секретують протимікробні пептиди, а саме: β -дефенсини та кателіцидини. Секреція цих пептидів збільшується в залежності від цитокінів Th17-клітин, зокрема IL-17A та IL-22. Ці пептиди прямо захищають від інфекційних мікробів шляхом знищення патогенних мікроорганізмів, залученням імунних клітин господаря, та модуляцією вироблення цитокінів. Вони мають важливе значення для захисту хазяїна, оскільки зменшення антимікробних пептидів пов'язано з підвищеною сприйнятливістю до інфекції у хворих на АД.

Клітини Лангерганса

Клітини Лангерганса - це спеціалізовані імунні сторожові, які здатні до захоплення антигенів над щільними з'єднаннями.

Клітини Лангерганса є вузькоспеціалізованими антигенпрезентаційними клітинами, що складають приблизно 2–4% від загальної популяції клітин епідерми як у мишей, так і у людей. Вони характеризуються як інтраепітеліальна субпопуляція ДК, які мають відмінні функції від дермальних ДК. Останні відкриття на клітинному онтогенезі просунули концепцію, що ДК можна класифікувати як макрофаги на основі їх зародкового походження.

Архітектурно КЛ утворюють щільні мережі в базальному та надбазальному шарі епідермісу (рис. 9.3 (a)).

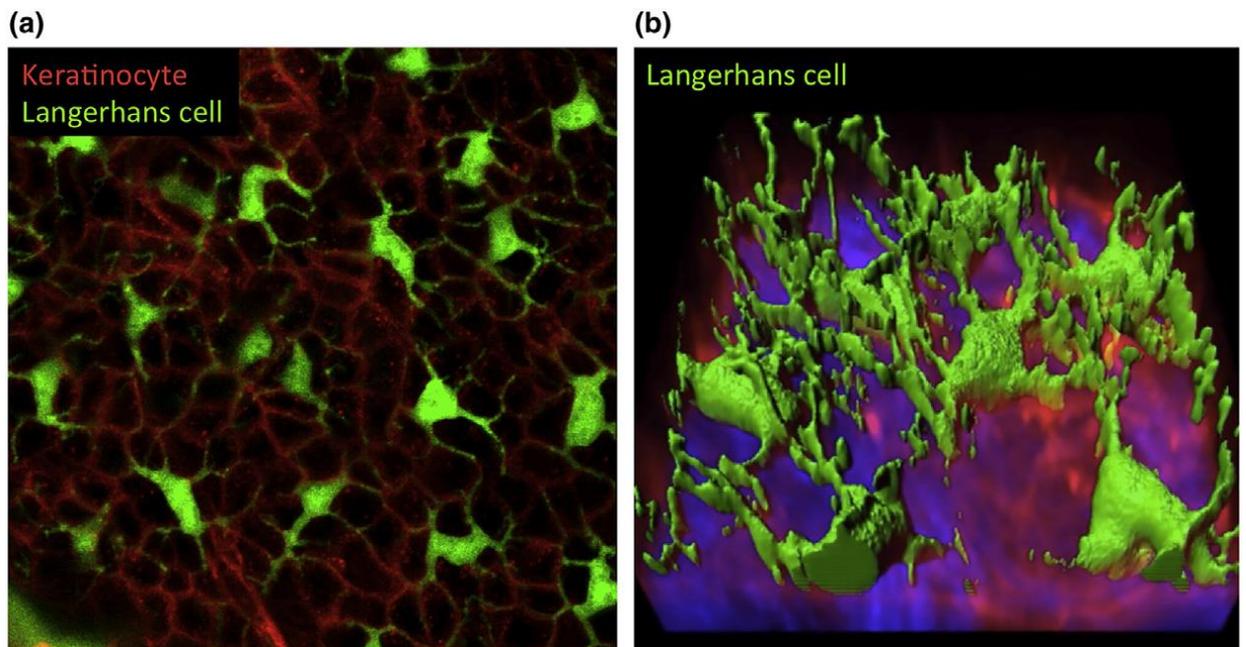


Рис. 9.3. (a) Шкіра вуха миші Langerin-GFP. Клітини Лангерганса маркують за допомогою зеленого флуоресцентного протеїна (green fluorescent protein- GFP) (зелений). Кератиноцити мітять за допомогою ізолектину В4 (червоний). (b) Клітини Лангерганса подовжують свої дендрити вгору в епідермісі.

Масштабна шкала 25 мкм.

Різні поверхневі маркери характеризують КЛ як людей, так і мишей (табл.9. 2).

Поверхневі маркери клітин Лангерганса та дермальних дендритних клітин

	Заселення	Маркери (миші)	Маркери (люди)
Клітини Лангерганса	2–4% від епідермальних клітин	MHC class II, CD11b, CD11c, CD45, CD205, Лангерин/CD207, E-кадерин, ЕpCAM, гранули Бірбека, F4/80	MHC class II, CD1a, CD11c, CD45, E-кадерин, ЕpCAM, Лангерин/CD207, гранули Бірбека
Лангерин ⁻ дендритні клітини	70% пулу дермальних дендритних клітин	MHC class II, CD11b, CD11c, CD45, CD205, F4/80	MHC class II, CD1a, CD1d, CD11b, CD11c, CD45
Лангерин ⁺ дендритні клітини	10–20% пулу дермальних дендритних клітин	MHC class II, CD11c, CD45, CD103, Лангерин/CD207	

Лангерин (Langerin) / CD207 - це рецептор лектину, який зв'язує манозу та споріднені з нею цукри, що містяться в різних мікроорганізмах. Молекули адгезії E-кадгерин і молекула адгезії клітин епітелію (ЕpCAM) прикріплюють КЛ до ДК. CD205 є необхідною молекулою для захоплення та обробки антигену. Вважається, що їх специфічні цитоплазматичні гранули Бірбека відіграють ключову роль в опосередкованих рецепторами ендцитозі і переміщенні. Людські КЛ також високо експресують CD1a, який здатний представляти мікробний ліпідний антиген Т-клітинам.

Після сприйняття запальних сигналів в КЛ відбуваються наступні зміни: збільшення розміру та розширення дендритного нагляду і втягуючий циклічний звичний рух (dSEARCH) дендритних процесів. Важливо відмітити нещодавнє повідомлення, яке продемонструвало, що КЛ подовжують дендрити до проникнення через щільні з'єднання для захоплення зовнішніх антигенів (рис.

9.3 (b)), які мають порушений бар'єр рогового шару шкіри. Після захоплення антигена, КЛ піддаються дозріванню з регуляцією поверхневих молекул: МНС класу I та класу II; костимулюючих молекул, таких як CD40, CD80 і C86; і хемокінових рецепторів, таких як c – c хемокіновий рецептор (CCR) 7. Потім КЛ мігрують з епідермісу до дренаючих лімфатичних вузлів (dLN) і в них презентують антиген Т-клітинам, що забезпечує шкіряну сенсibilізацію білка антигена.

Важливість КЛ у сенсibilізації білкового антигена була виявлена на мишиній моделі АД, індукованого овальбуміном, в якій дефіцит КЛ призвів до зменшення клінічних симптомів та вироблення антиген-специфічного IgE. На відміну від цього, останні дані з використанням мишей з дефіцитом КЛ виявили регулятивну, а не стимулюючу роль КЛ у фазі сенсibilізації проти гаптенів. Цей КЛ-супресивний ефект, здається, вимагає прямої спорідненої взаємодії з CD4+Т-клітинами та ІL-10, отриманим від КЛ. Тим не менше, функція КЛ в сенсibilізації гаптену залишається суперечливою і потребує подальших роз'яснень.

Імунологічні бар'єри шкіри

У стійкому стані в дермі знаходиться безліч імунних клітин, включаючи тканинні резидентні макрофаги, ДК, тучні клітини, і Т-клітини пам'яті. На додаток до цих мешканців, нейтрофіли, запальні моноцити та ефекторні Т-клітини залучаються в шкіру з циркуляції відповідно до типів запалення. Структурні клітинні компоненти дерми, такі як кровоносні судини, перицити та лімфатичні судини також активуються та координуються для встановлення запалення.

Макрофаги

Макрофаги - це унікальні клітини, які виконують фагоцитарну функцію для видалення непотрібних відходів, таких як апоптотичні клітини, клітинного сміття та патогенів. Подібно до КЛ в епідермісі шкірні макрофаги щільно розташовані розподіляючись в дермі серед сіток судинних русел (рис. 9.3 (a)).

На додаток до очищення відходів, вони полегшують індукцію запалення шляхом розпізнавання антигену через широкий спектр рецепторів напружуючи вроджений та набутий імунітет та через продукцію запальних цитокінів та хемокінів. Більше того, вони виробляють фактори росту, щоб стимулювати ріст капілярів, синтез колагену та фіброз, пов'язані з відновленням тканин. Таким чином, вони грають фундаментальну роль передової лінії захисту тканин і організатора тканинного гомеостазу.

Макрофаги функціонально згруповані в два класи: M1 (класично активовані) та M2 (альтернативно активовані), відповідно до їх ролі і цитокінів, необхідних для їх активації (табл. 9.3).

Резидентні тканинні макрофаги класифікуються як M2-подібні загалом. Під час запалення надходить великий приплив моноцитів з циркуляції і приймає на себе фенотип макрофагів. Вважається, що ці запальні моноцити діють як макрофаги M1. Хоча диференціальні ролі тканинних макрофагів та макрофагів, отриманих із запальних моноцитів, ще не було точно визначено, вважається, що кожний підтип діє скоординованим способом як в фазу запалення, так і при відновленні тканин.

Таблиця 9.3

Підтипи макрофагів

	Цитокіни для активації макрофагів	Роль макрофагів
M1	IFN γ , TLR сигналінг	Активация прозапальних цитокінів Імунний захист проти мікробів та пухлин
M2	IL-4, IL-13, TSLP, TGF- β , глюкокортикоїди	Пригнічення імунітету Загоєння ран Відновлення гомеостазу тканини

У шкірі функція макрофагів при відновленні ран була одним з основних напрямків дослідження, оскільки виснаження макрофагів призводить до ослабленого відновлення рани. Цілком ймовірно, що макрофаги M1 чистять сміття та вбивають збудників хвороб, які вторглися в ранню фазу поранення, і що макрофаги M2 виявляють протизапальну дію і виробляють фактори росту, які необхідні для відновлення тканин, включаючи васкуляризовану грануляцію формування тканини та повторну епітелізацію в пізній фазі.

Видалення апоптотичних клітин та клітинного сміття також може бути важливим для підтримки гомеостазу шкіри.

Варто зазначити, що в нещодавньому повідомленні основна увага приділялась недавно визначеній специфічній функції макрофагів шкіри, розташованих у периваскулярній площі. Робота продемонструвала важливість периваскулярних макрофагів при залученні нейтрофілів до шкіри: екстравазація нейтрофілів сталася в запальних шкірних судинах сусідніх з периваскулярними макрофагами та нейтрофільною інфільтрацією, які було пригнічено в місці, де ці макрофаги зникли внаслідок секреції α -гемолізину при стафілококовій інфекції.

Інфільтруючі шкіру Т-клітини

Шкіра є резервуаром приблизно 20 мільярдів Т-клітин, що майже вдвічі більше присутніх у всьому об'ємі крові. Спочатку сприйняття імунного нагляду за шкірою було на основі Т-клітин, які мігрують між дренажними шкіру лімфатичними вузлами та периферичними тканинами. Локальна дефектна міграція специфічних Т-клітин, а не системне зниження опосередкованого Т-клітинного імунітету відповідає за слабші реакції ДТН (delayed type hypersensitivity) - гіперчутливості уповільненого типу до бактеріальних, грибкових та вірусних антигенів. Дослідження показують, що зниження ФНП-секреції макрофагами інгібує активацію ендотеліальних клітин шляхом пригнічення Е-селектину, васкулярної молекули клітинної адгезії 1, і експресією ICAM, таким чином, трансміграцією Т-клітин в шкіру. Однак

резидентні швидше чим рекрутовані Т-клітини створюють імунний гомеостаз шкіри. Властивості зворотного шляху Т-клітин шкіри отримують після імпринтингу - процесу, заснованому на контакті з ДК шкіри та мезенхімальних клітин. Деяка значна роль у цьому процесі відводиться вітаміну D. Встановлено, що вітамін D інгібує ефекторну реактивність Т-клітин і індукує регуляторні Т-клітини та їх хомінг до місць запалення на основі його вирішальної ролі у виробництві AMP (Antimicrobial peptides) - антимікробних пептидів. Епідермальні CD8+ $\alpha\beta$ Т-клітини мають фенотип пам'яті і живуть серед кератиноцитів з переважною локалізацією поблизу КЛ. Однакова кількість CD4+ і CD8+ Т-клітин обмежені капілярами та епідермально-шкірним з'єднанням характерним для дерми. Більшість із них - клітини пам'яті, що експресують пов'язаний з лімфоцитами шкіри антиген. Т-клітини пам'яті шкіри займають стратегічне положення і створюють першу лінію захисту від патогенів.

У цьому розділі ми зупинимося на двох основних ефекторних лініях $\alpha\beta$ – Т-клітин з різним розташуванням у шкірі: CD4+ Т-клітини, які займають периваскулярну область шкіри і CD8+ Т-клітини, що знаходяться у епідермісі.

Інфільтруючі шкіру CD4+ Т-клітини складаються з Th1, Th2, Th17, Th22, Th9 та регуляторних Т (Treg) клітинних підтипів. Істотна роль Th1 клітин призначена для захисту від внутрішньоклітинних патогенів та вірусів шляхом секреції інтерферону (ІФН) - γ . Вони домінують у шкірі під час ранньої фази контактного дерматиту. Клітини Th2 відіграють центральну роль при atopічних розладах, таких як АД, регулюючи як гостру, так і пізню фазу алергічних реакцій, опосередкованих імуноглобуліном Е та еозинофілами, відповідно. Вони функціонують через секрецію ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-13, ІЛ-24, ІЛ-25 та ІЛ-31. Досягається повна активація клітин Th2 шляхом вироблення цитокінів КЦ, таких як ІЛ-33 та TSLP, та подальша активація вроджених лімфоїдних клітин 2 групи, які виробляють ІЛ-5, ІЛ-9 та ІЛ-13. Th17 клітини шкіри захищають від бактерій та грибків, таких як *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* та

Candida albicans контролюючи нейтрофіли на слизово-шкірних поверхнях. Клітини Th17 і Th22 добре відомі своїм значенням при псоріазі, який є основним запальним захворюванням шкіри, що характеризується надлишковим розповсюдженням КЦ і лускатих еритематозних бляшок. При псоріазі IL-1 β , IL-6, TNF, що продукують КЦ та IFN α , який продукують плазмоцитоїдні ДК призводить до Th17 клітинно-опосередкованого запалення. У свою чергу, клітини Th17 секретують IL-17A, IL-17F та IL-22, які стимулюють проліферацію КЦ.

CD8+ Т-клітини є головними ефекторними клітинами, які розпізнають антигени на молекулах МНС класу I. Вони володіють прямою властивістю видаляти антиген-презентуючі клітини, такі як вірус-інфіковані клітини, пухлинні клітини та прищеплені алогенні клітини. У стійкому стані, CD8+ Т-клітини шкіри є, по суті, резидентними Т-клітинами пам'яті, які знаходяться в епідермісі. Ці CD8+Т-клітини опосередковують негайну реакцію на антиген при повторному впливі. CD8+Т-клітини вважаються залученими у різні захворювання шкіри, включаючи контактний дерматит, псоріаз, трансплантат проти хвороби господаря, вітіліго, алопеція ареата та реакції на ліки.

Дендритні клітини шкіри.

Сторонні антигени, такі як гаптени, досить малі, щоб проникнути в дерму через щільні з'єднання (ТJ). Коли бар'єри рогового шару (SC) та ТJ порушуються через запалення шкіри або рубцювання, більші молекули здатні безпосередньо потрапляти в дерму. ДК шкірні можуть ефективно захоплювати та представляти ці антигени для ініціювання набутого імунітету.

Крім мігруючих КЛ в дермі на шляху до лімфатичних вузлів, існує принаймні дві популяції дермальних ДК (dDC) у мишей: лангерин (Langerin)/ CD207-позитивні ДК та лангерин негативні ДК. Вони також виражають кілька різних поверхневих маркерів (табл. 9.2). Їх чіткі ролі для екзогенної презентації антигену були досліджені на мишачих моделях контактної гіперчутливості (contact hypersensitivity - CHS).

Серія досліджень із використанням нового умовного виснаження систем КЛ та лангерин+ ДК виявили, що лангерин+ ДК, але не КЛ, можуть грати вирішальну роль під час сенсibiliзації проти екзогенних гаптенів, незважаючи на їх незначну кількість. Лангерин- ДК також мають стимулюючий ефект функції сенсibiliзації гаптenu, оскільки видалення КЛ та лангерин+ ДК до сенсibiliзації погіршували CHS відповідь, але не могли повністю її скасувати.

Вважається, що напрямок, в якому відповідь Т-клітин (тип Th1-, Th2- та / або Th17) буде спрямовано в лімфовузлах, залежить від місцевих умов шкіри, активованих дермальних ДК. Наприклад, при АД TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) масово експресується з епідермісу за наявності механічних пошкоджень. TSLP рецепторна передача сигналів через КЛ і ДК постійно активізується і регулюється OX40L на них, що призводить до подальшого переважання Th2 типу відповіді. Подібним чином IL-33 є одним із членів сімейства IL-1, що походить від КЦ, який також опосередковує Th2 тип запальної відповіді. Псоріаз визначено як запалення типу Th1- і Th17. Вважається, що IL-1 β , IL-6, а також TNF, отримані з КЦ, та ІФН- α похідних плазмоцитоїдних ДК, активують локальні дермальні ДК. Вважається, що ці активовані дермальні ДК (dDC), що секретують IL-23, праймують первинні наївні Т-клітини в Th1 та / або Th17 напрямки в мігруючих лімфовузлах дерми.

Кровоносні судини

Шкірні кровоносні судини складаються з вертикальних капілярних петель в папілярній дермі і сітчастої мережі судин в сітчастій дермі. У процесі запалення активація ендотеліальних клітин (ЕК) судин крові сприяє судинному витоку і рекрутменту лейкоцитів. Активація ЕК має дві фази: швидкі відповіді, які не залежать від експресії нового гена, та повільніші відповіді, які залежать від експресії нового гена.

Швидкі реакції опосередковуються лігандами, які зв'язуються з G-білковими рецепторами (GPCR), такими як гістамінові H1R -рецептори. Сигналізація GPCR приводить до зростання внутрішньоклітинної концентрації

кальцію та активації гомологів RAS в ЕК, що триває 10–20 хв. Посилення регуляції експресії Р-селектину та відкриття прогалин, які виникають між сусідніми ЕК, приводить до рекрутменту лейкоцитів.

Згодом, відбувається більш стійка форма активації ЕС. Ця більш повільна реакція опосередковується TNF і IL-1, отриманими з активованих КЦ або лейкоцитів. Сигнали індукують транскрипцію гена Е-селектину, молекулу міжклітинної адгезії-1 (ICAM-1), молекулу адгезії судинних клітин-1 (VCAM-1), хемокінів, що рекрутують лейкоцити, та реорганізацію актину та цитоскелету тубуліну в ЕК, що сприяє стійкому крововитоку судин. Недавнє дослідження показало важливість внутрішньоендотеліального складу хемокінів, включаючи хемокіни (С – Cmotif) ліганд 2 (CCL2) для опосередкування трансміграції активованих лімфоцитів до шкіри.

Серед кровоносних судин посткапілярні венули є унікальними місцями для запалення. Повідомлялося, що посткапілярні венули експресують гістамінові рецептори і найменш поширені в ТЛ. Крім того, на місці посткапілярних вен, покриття серицитом стає низьким. Більше того, ламінін А5 в судинній базальній мембрані, який вважається має пригнічуючий ефект на екстравазацію лейкоцитів, показує неоднорідний розподіл. Враховуючи це, посткапілярні венули вважаються специфічними частинами витоку судин та рекрутування лейкоцитів при запаленні. Оцінка судинної проникності під дією викиду гістаміну за допомогою двофотонної мікроскопії чітко візуалізувало дермальні посткапілярні венули як місце витоку судин та динамічну зміну обмеження їх розміру. Крім того, нещодавно визначено дермальні посткапілярні венули як конкретне місце збору клітин, що важливо для презентації антигену в шкірі.

Перицити

Перицити - довгі стіночні клітини (довжиною 70 нм), що оточують ЕК малих кровоносних судин, включаючи артеріоли, капіляри, посткапілярні венули та збірні венули. Перицити тісно пов'язані з ЕК і їх щільність варіює

між різними судинними руслами. Вони є не лише структурним компонентом, але відіграють вирішальну роль у підтримці цілісності стінок судин та у збірці базальної мембрани.

Було повідомлено значення перицитів у розвитку та регулюванні гематоенцефалічного бар'єру при нейрозапальному процесі, однак роль шкірних перицитів значною мірою невизначена. Перицити можна розділити на дві підгрупи: нейронно / гліальний антиген 2 (NG2)- α SMA+ перицити вздовж венул і пост капілярів венули та NG2+ α SMA+ перицити вздовж артеріол та капілярів. Цікаво, що останні повідомлення пролили світло на важливу роль обох типів перицитів при запаленні та при переносі лейкоцитів в шкіру.

Перицити посткапілярних венул NG2 регулюють рух нейтрофілів на останньому етапі трансміграції лейкоцитів в інтерстицій після міграції ендотеліальних клітин (EC). Нейтрофіли повзуть уздовж відростків перицитів до проміжків між ними.

Що стосується артеріолярних та капілярних перицитів NG2+, то нещодавно було виявлено, що вони утворюють "шосе" для швидкої міграції екстравазованих нейтрофілів у шкірі. Вони безпосередньо відчують DAMPs і перетворюються на запальний стан, що характеризується підвищеною експресією ICAM-1 та підвищеною секрецією фактора хемоатрактанта інгібітора міграції макрофагів. Зміни фенотипу перицитів як структурний орієнтир підтримують ефективну інтерстиціальну міграцію нейтрофілів у запальну шкіру.

Лімфатичні судини

Лімфатичні судини шкіри утворюють верхні і нижні сплетення. Поверхневі сплетення складаються з лімфатичних судин без клапанів. Гілки стікають вертикально з поверхневого сплетення у більші лімфатичні судини в нижню дерму і поверхневу зону підшкірної тканини. Ці глибокі колективні лімфатичні судини містять численні клапани (рис. 9.4 а і b).

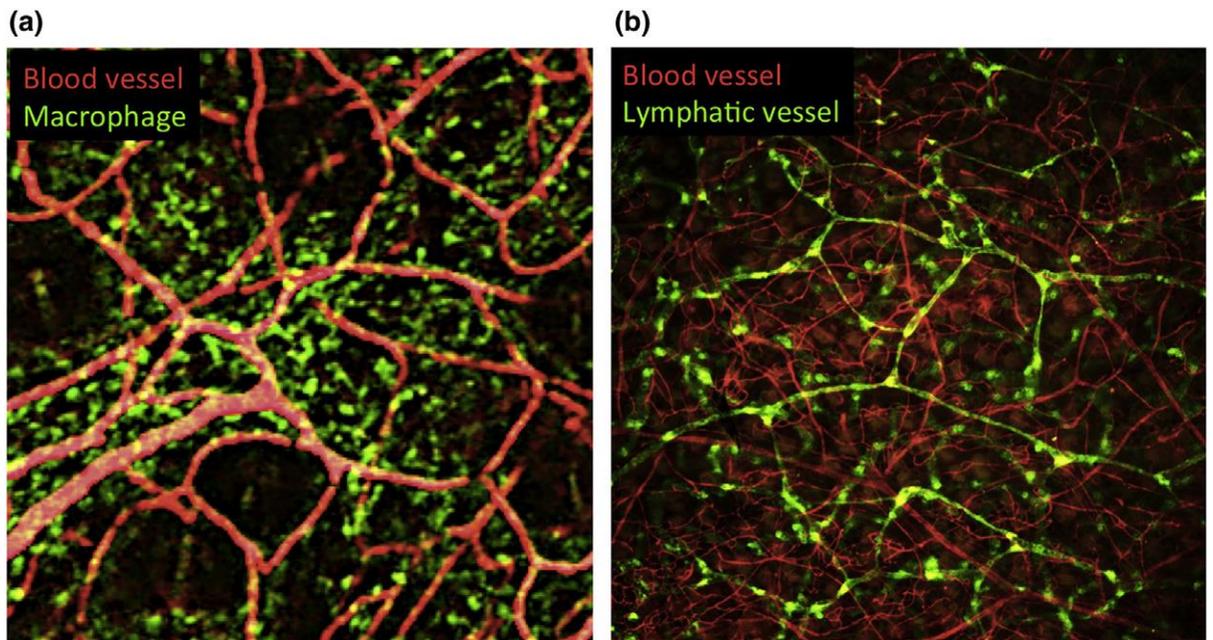


Рис. 9.4.(a) Зображення макрофагів шкіри та кровоносних судин шкіри вуха миші у стабільному стані. Макрофаги позначені зеленим через 24 год після ін'єкція 20 кДа FITC-декстрану. Кровоносні судини зображені відразу після ін'єкції TRITC-декстрану 150 кДа (червоний). (b) Кровоносні судини марковані за допомогою внутрішньовенної ін'єкції ізолектину В4 (червоного кольору). Лімфатичні судини марковані за допомогою підшкірної ін'єкції антитіл Lyve-1 (зеленого кольору). Шкала 100 мкм.

Основна функція лімфатичних судин шкіри- сприяти розвитку руху інтерстиціальної рідини та білкових молекул назад до циркуляції. Тим самим вони підтримують нормальний тиск у тканинах. Крім того, лімфатичні судини шкіри також важливі для транспортування імунних клітин, таких як дермальні ДК від периферії до лімфатичних вузлів. CCL21 / CCR7 сигналізація вважається необхідною для цього обігу лейкоцитів. Більше того, дермальні лімфатичні судини орієнтовані на резидентні ДК, що живуть у LN, і лімфатичні ендотеліальні клітини (LEC) для захоплення антигенів і участі в імунній відповіді, дренуючи антигени безпосередньо з дерми.

Лімфатична недостатність шкіри може призвести до ряду захворювань, які характеризуються набряками, порушенням імунітету та фіброзом. Активація лімфатичних судин обмежує гостре запалення шкіри шляхом просування відтоку лімфи зі шкіри та зменшення формування набряків. Отже, лімфатичні судини шкіри, ймовірно, грають складну роль в модулюванні загального імунітету.

Перегляд концепції лімфоїдної тканини, асоційованої зі шкірою

У 1980-х роках імунологи, які вивчали шкіру ввели термін “SALT” на основі численних досліджень, які виявили існування Т-клітин і ДК в шкірі при запальних станах. Передбачалося, що презентація антигену наївним Т-клітинам може виникати в шкірі. Однак, на відміну від інших лімфоїдно-асоційованих тканин, таких як асоційована зі слизовою оболонкою лімфоїдна тканина (MALT), індуцибельна бронхо-асоційована лімфоїдна тканина (BALM) та інші спричинені запаленням лімфоїдні тканини (а саме третинні лімфоїдні органи), SALT не складається ні з багатих на Т-клітини ділянок з венулами з високим ендотелієм, ні В-клітинних фолікулів. Презентація антигену до наївних Т-клітин здається малоімовірною для шкіри, на відміну від MALT або пов'язаною з кишечником лімфоїдною тканиною (GALT), які обладнані місцями для забезпечення цього. Натомість SALT, здається, надає місце для активації ефекторних Т-клітин та Т-клітин пам'яті, які мігрували.

Кластеризацію ДК з Т-клітинами пам'яті та периваскулярними макрофагами навколо посткапілярних венул було нещодавно виявлено у реакції CHS (contact hypersensitivity) (Natsuaki et al., 2014; рис.9.5 (a) та 9.5 (b)). У кластеризації DC контактують з ефекторними Т-клітинами, що приводить до їх активації. Вважають, що як КК, так і периваскулярні макрофаги грають важливу роль у кластеризації ДК, оскільки кластеризація та активація ефекторних Т-клітин були скасовані за відсутності передачі сигналів ІЛ-1 від КК і мишей, у яких макрофаги виснажені. Крім того, CXCL2 був основний

хемокін, що експресувався макрофагами під час стимуляції з ІЛ-1. Блокування CXCR2, рецептора CXCL2, гальмували кластеризацію ДК.

Отже, індукована структура, утворена макрофагами шкіри, дермальними DC та ефektorними Т-клітинами, як представляється, накопичується послідовно. Оскільки формування цієї структури мало важливе значення для ефектної активації ефektorних Т-клітин, ці індукцйбельні кластери лейкоцитів можуть функціонувати як SALT, які можна назвати індукцйбельними SALT (iSALT).

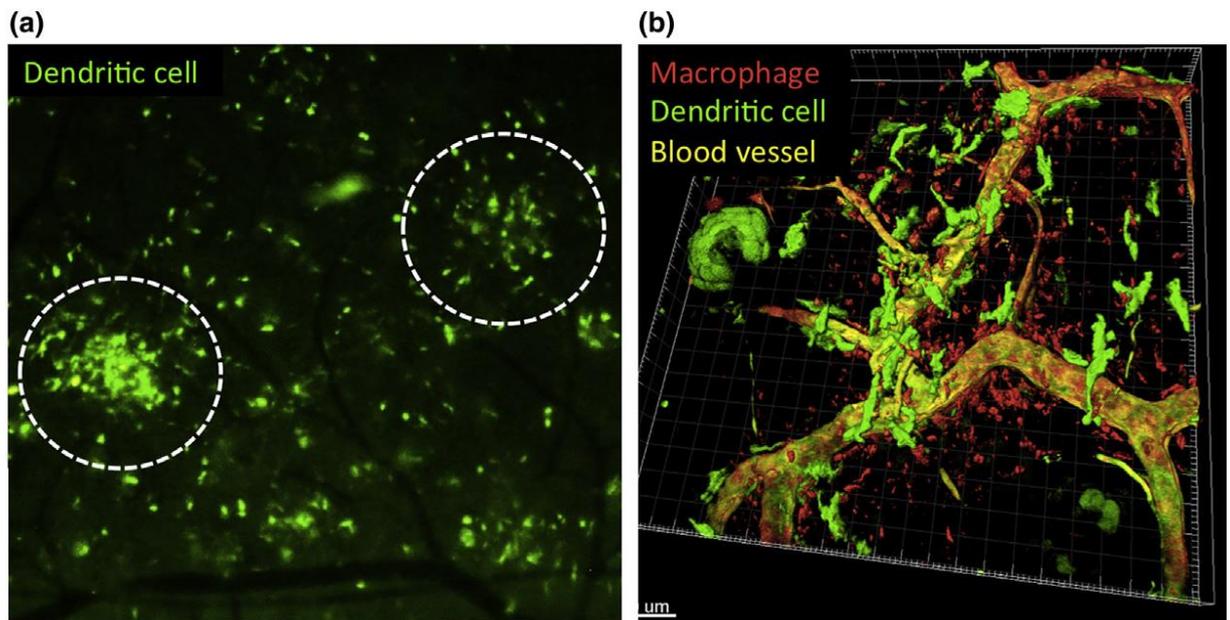


Рис. 9.5. iSALT. (a) Утворення дендритних клітинних кластерів шкіри візуалізовано в шкірі вуха мишей CD11c YFP у фазі виділення контактної гіперчутливості CHS. (b) Скупчені дендритні клітини шкіри (зелені) та периваскулярні макрофаги (червоні) поблизу кровоносних судин (жовті) візуалізовані в фазі виявлення CHS. Шкала 100 мкм.

Висновок

Основна концепція SALT полягає в тому, що шкіра - це не просто фізичний бар'єр, але також компонент лімфатичної системи. Наше розуміння патологічної ролі кожного клітинного підтипу шкіри та їх взаємодії прогресувало неухильно. Однак ще багато чого слід прояснити в імунітеті

шкіри. Дослідження природи iSALT щойно розпочалось. Подальше дослідження механізмів імунітету шкіри з огляду на його мікроанатомію та міжклітинну взаємодію є суттєвим.

Питання для обговорення:

1. Фізичні бар'єри в епідермісі.
2. Значення щільних з'єднань в бар'єрній функції шкіри.
3. Макрофаги шкіри.
4. Інфільтруючі шкіру Т-клітини.
5. Дендритні клітини шкіри.
6. Кровоносні судини шкіри.
7. Перицити.
8. Основі функції лімфатичних судин шкіри.
9. Перегляд концепції лімфоїдної тканини асоційованої зі шкірою.

Використана література

1. Sachiko Ono and Kenji Kabashima Skin Immune System: Microanatomy. Encyclopedia of Immunology. – Editor in Chief Michael J.H. Ratcliffe - 2016 Vol.3. – P. 443-452.
2. Peter J. Murray* and Thomas A. Wynn Protective and pathogenic functions of macrophage subsets // Nat Rev Immunol. 2011 Oct 14; 11(11): 723–737.
3. Egawa G and Kabashima K Skin as a Peripheral Lymphoid Organ Revisiting the Concept of Skin-Associated Lymphoid Tissues // Journal of Investigative Dermatology (2011) 131, 2178–2185.
4. Agata Matejuk Skin Immunity // Arch. Immunol. Ther. Exp. (2018) 66:45–54
5. Valquiria Bueno Immunology of the Skin. 2014
<https://www.researchgate.net/publication/258730506>
6. The IL-23/T17 pathogenic axis in psoriasis is amplified by keratinocyte responses Author links open overlay panel / Michelle A.Lowes, Chris B.Russell, David A.Martin, Jennifer E.Towne, James G.Kruege // Trends in Immunology. – 2013. - Volume 34, Issue 4. - P. 174-181.

ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ

1. Які клітини гастроінтестинального тракту поглинають/засвоюють розчинні антигени та антигени продуктів харчування?

- а) епітеліоцити;
- б) ентероцити;
- в) інтраепітеліальні лімфоцити;
- г) мастоцити (М-клітини).

2. За нормальних умов поглинання інтактних макромолекул відбувається за допомогою механізму трансцелюлярного транспорту антигенного матеріалу через:

- а) базолатеральну поверхню епітелію;
- б) ентероцити;
- в) М-клітини;
- г) інтраепітеліальні лімфоцити.

3. Під час поглинання антиген може бути модифікований присутністю:

- а) Т-лімфоцитів;
- б) IgA;
- в) IgG;
- г) IgE.

4. Імуноглобуліни якого класу призводять до імунного виключення антигену?

- а) IgG;
- б) IgA;
- в) IgM;
- г) IgE;

д) IgD.

5. Імуноглобуліни яких класів можуть посилювати поглинання антигену через епітелій шляхом експресії імуноглобулінових рецепторів?

а) IgG;

б) IgA;

в) IgM;

г) IgE;

д) IgD.

6. Антимікробні пептиди, які впливають на загоєння:

а) шар слизу;

б) глікопротеїни;

в) дефензини;

г) кателіцидини;

д) трефолієві фактори.

7. Найбільш еволюційно древніми пептидами, які беруть участь в неспецифічному захисті макроорганізму від інфекційних агентів, є:

а) кателіцидини;

б) лізоцим;

в) дефензини;

г) лізосомальні катіонні протеїни;

д) трефолієві фактори.

8. Хемотаксичними властивостями для нейтрофілів, дендритних клітин і Т-клітин пам'яті володіють:

а) криптидини;

б) кателіцидини;

- в) лізоцим;
- г) дефензини;
- д) трефолієві фактори.

9. Антимікробні пептиди, які індукують апоптоз:

- а) криптидини;
- б) трефолієві фактори;
- в) кателіцидини;
- г) дефензини;
- д) лактоферицин.

10. У різних відділах травного тракту людини мешкає приблизно:

- а) від 50 до 100 видів бактерій;
- б) від 500 до 1000 видів бактерій;
- в) від 5000 до 10000 видів бактерій;
- г) від 50000 до 100000 видів бактерій.

11. До якого типу серологічних реакцій відноситься РІД ?

- а) реакція аглютинації;
- б) ІФА;
- в) реакція лізису;
- г) реакція фагоцитозу;
- д) реакція преципітації.

12. З якою метою використовують РІД?

- а) виявлення цілих бактерійних клітин;
- б) визначення полісахаридного антигену бактерій;
- в) кількісного визначення класів імуноглобулінів;
- г) визначення активності фагоцитуючих клітин.

13. Видимий результат позитивної реакції РІД:

- а) утворення аглютинінів;
- б) помутніння середовища;
- в) розчинення клітин;
- г) утворення кілець преципітації в гелі.

14. Як називаються антитіла, які беруть участь в РІД, з метою кількісного визначення класів імуноглобулінів?

- а) антибактеріальні АТ;
- б) антивірусні АТ;
- в) комплементзв'язуючі антитіла;
- г) антиімуноглобулінові антитіла;
- д) опсоніни.

15. Для визначення кількості імуноглобулінів в секретах використовують наступний тест:

- а) імунофлюоресценція;
- б) реакція кільцепреципітації;
- в) радіоіmunний тест;
- г) радіальна імунодифузія по Манчіні;
- д) реакція аглютинації;
- е) ELISA.

16. Нейтрофіли здатні:

- а) фагоцитувати бактерії;
- б) виділяти біооксиданти;
- в) виділяти бактерицидні білки;
- г) виділяти гістамін.

17. При фагоцитозі біологічні окислювачі виділяють:

- а) макрофаги;
- б) нейтрофіли;
- в) еозинофіли;
- г) лімфоцити.

18. Макрофаги здатні до:

- а) прямого фагоцитозу;
- б) фагоцитозу, опосередкованого антитілами;
- в) секреції біологічно активних речовин;
- г) подання антигенів лімфоцитам.

19. Перицити виконують такі функції:

- а) опорну;
- б) скоротливу;
- в) продукцію компонентів базальної мембрани;
- г) участь у процесах регенерації судин.

20. Секреторний компонент IgA в слизовій оболонці кишечника продукують:

- а) лімфоцити;
- б) М-клітини;
- в) макрофаги;
- г) епітеліоцити;
- д) плазмоцити.

21. До макрофагальної системи в печінці відносяться:

- а) ліпоцити;

- б) гепатоцити;
- в) ямкові клітини (Pit-клітини);
- г) зірчасті клітини;
- д) ендотеліоцити.

22. Печінка виконує ряд функцій, крім:

- а) знешкодження продуктів білкового обміну;
- б) інактивації гормонів, біогенних амінів, лікарських препаратів;
- в) утворення глікогену;
- г) синтезу білків плазми крові;
- д) синтезу ферментів порожнинного травлення.

23. Епідерміс представлений усіма видами клітин, крім:

- а) кератиноцитів;
- б) меланоцитів;
- в) внутрішньоепідермальних макрофагів;
- г) внутрішньоепідермальних фібробластів;
- д) дотикових клітин Меркеля.

24. У епідермісі зустрічаються клітини:

- а) меланоцити;
- б) клітини Меркеля;
- в) внутрішньоепідермальні макрофаги;
- г) внутрішньоепідермальні фібробласти.

ДОДАТОК 1.

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДЛЯ СТУДЕНТІВ З ОСВОЄННЯ ДИСЦИПЛІНИ

Вимоги до ведення робочого зошита: ведення зошита в довільній формі.

Вимоги до оформлення презентації

1. Презентація не повинна бути меншою за 10 слайдів і більшою за 30 слайдів.
2. Перший слайд - це титульний лист, який містить відомості про найменування університету, факультету, тему курсової роботи, прізвище, ім'я, по батькові студента, прізвище, ім'я, по батькові керівника.
3. На наступному слайді ви представляєте план (питання) вашої доповіді і презентації.
4. Алгоритм побудови презентації відповідає логічній структурі роботи і відображає послідовність її етапів.
5. На одному слайді не повинно бути більше 4 пропозицій і більше 20 слів. Пам'ятайте, що люди можуть одноразово запам'ятати не більше трьох фактів, висновків, визначень. Найбільша ефективність досягається тоді, коли ключові пункти відображаються по одному на кожному окремому слайді.
6. Не робіть презентацію шляхом копіювання тексту з вашої роботи: в презентації використовують короткі фрази, мінімізуйте кількість прийменників, прислівників, прикметників; заголовки повинні привертати увагу аудиторії.
7. Використовуйте в презентації ілюстрації: це можуть бути фотографії, які стосуються вашого об'єкта дослідження, якісь метафори і т.д.
8. Уважно перевірте свою презентацію на грамотність. Презентація з граматичними і стилістичними помилками знижує враження від вашої роботи.
9. Останній слайд - «Дякую за увагу!»
10. Для оформлення слайдів презентації використовуйте прості шаблони. Анімацію можна використовувати, але не у всіх слайдах. Намагайтеся не

відволікати слухачів від основної вашої доповіді. Рекомендується дотримуватися одного стилю оформлення всіх слайдів: використовувати на одному слайді не більше 3 кольорів - один для фону, один для заголовків, один для тексту. Зміна слайдів встановлюється одним помахом.

11. Шрифт, який обирається повинен бути в межах розмірів - 18-72 пунктів. Не слід використовувати різні шрифти в одній презентації. При копіюванні тексту з програми Word на слайд він повинен бути вставлений в текстові рамки на слайді.

12. У презентації матеріал доцільніше представляти у вигляді таблиць, моделей, програм.

Вимоги до реферативних повідомлень

1. На титульному аркуші обов'язкові: назва університету, кафедри, теми роботи, місяць і рік виконання

2. Актуальність обраної теми

3. План

4. Мета і завдання

5. Основна частина доповіді повинна відповідати плану

6. Використання таблиць, схем і графіків вітається

7. Висновок

8. Список використаних джерел

9. Обсяг реферату не повинен становити більше 20-25 сторінок друкованого тексту

10. Час усної доповіді складає 10 хвилин

Використана література

1. Иммунология:учеб.-метод. пособие / сост.: О.В. Скороходкина, А.А. Васильева, Р.Ф. Хакимова и др. – Казань: КГМУ, 2017. – 117 с.

ДОДАТОК 2. ТЕМИ СЕМІНАРСЬКИХ ЗАНЯТЬ

Для самостійного вивчення розділів дисципліни «Місцевий імунітет» виносяться наступні теми:

1. Діагностичні можливості слини.
2. Секреторний IgA. Синтез і роль у захисті слизових оболонок.
3. Імунна система слизових оболонок та шкіри. Лімфоїдні структури та дифузні лімфоцити.
4. М-клітини епітелію слизової оболонки кишечника.
5. Міграція лімфоцитів у бар'єрних тканинах.
6. Зміни імунної системи слизових оболонок під впливом шкідливих чинників довкілля, побутових факторів.
7. Вікові особливості імунної системи слизових оболонок.
8. Місцевий імунітет сечостатевого апарату.
9. Місцевий імунітет органів зору, слуху.
10. Мигдалики. Концепція кільця Вальдейера.
11. $\gamma\delta$ T-клітини.
12. Трефоїлові фактори.
13. Взаємозв'язок між рівнем експресії трефоїлових факторів і наявністю захворювань.
14. Імунітет шкіри.
15. Лабораторні методи дослідження місцевого імунітету.

Рекомендована література

1. Возможности ранней диагностики заболеваний путем анализа метаболитов слюны / Прокопьева С.Р., Шамитова Е.Н., Николаева Н.В. // Международный студенческий научный вестник. – 2019. – № 2.

<http://eduherald.ru/ru/article/view?id=19583>

2. Encyclopedia of Immunology. – Editor in Chief Michael J.H. Ratcliffe – 2016. – 3155 p.
3. Кожа как орган иммунной системы / Т.Э. Боровик, С.Г. Макарова, С.Н. Дарчия и др. // Педиатрия. -2010. - Том 89. - № 2. - С. 132-136.
4. Современные представления о структуре и функциях эпидермиса / С.Л. Кузнецов, В.Л. Горячкина, Д.А. Цомартова и др. // Российский журнал кожных и венерических болезней. - 2013. - № 2. – С. 26-32.