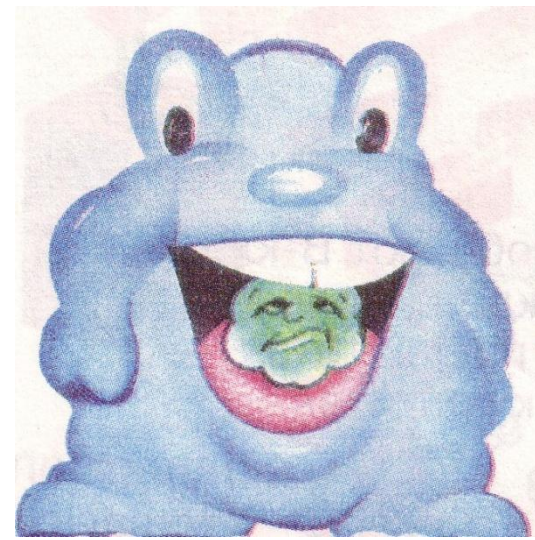


**Характеристика клеток
врожденного иммунитета (МФ, НГ,
NK-клетки.).
Методы оценки функциональной
активности фагоцитирующих
клеток и лимфоцитов врожденного
иммунитета.**



Лекция 5

Эффекторные клетки врожденного иммунитета

Клетки миелоидного ряда:

- Фагоциты (эозинофилы, базофилы, НГ, макрофаги, моноциты), дендритные клетки, тучные клетки

Клетки лимфоидного ряда

- (NK-лимфоциты)

Основные отличия от ИКК

- Клетки врожденного иммунитета активируются при распознавании специальными рецепторами (PRR) не индивидуальных молекул, а их групп – PAMP
- Клетки врожденного иммунитета всегда готовы к осуществлению эффекторных функций (не требуется пролиферации, дифференцировки и межклеточных взаимодействий)
 - Отсутствие иммунологической памяти
- Содержат в цитоплазме широкий спектр эффекторных молекул, используемых при фагоцитозе (внутриклеточно) и при экзоцитозе (внеклеточно)

Фагоциты - главные клетки врожденного иммунитета

микрофагоцит
ы

макрофагоцит
ы

НГ
ЭОЗ
БАЗ

МОН
МФ
Гистиоцит
ы
Ретикуляр
ные
клетки



Лейшмании в макрофаге

Характеристики фагоцитирующих клеток

| Клетки | Источник | Формы участия в защитных реакциях |
|------------|--|--|
| Нейтрофилы | Костный мозг; после дифференцировки выходят в кровоток | Адгезия к эндотелию и выход за пределы кровотока; хемотаксис; поглощение; дегрануляция; секреция O_2 -зависимых и O_2 -независимых микробицидных факторов |
| Эозинофилы | Тот же | Секреция O_2 -зависимых и O_2 -независимых микробицидных факторов, направленных против паразитов (простейшие и гельминты) |
| Моноциты | Костный мозг; после дифференцировки промоноциты выходят в кровоток | Адгезия к эндотелию и выход за пределы кровотока; хемотаксис; поглощение; дегрануляция; секреция O_2 -зависимых и O_2 -независимых микробицидных факторов (включая цитокины) |
| Макрофаги | Моноциты периферической крови | Адгезия к эндотелию и выход за пределы кровотока; хемотаксис; поглощение; дегрануляция; секреция O_2 -зависимых и O_2 -независимых микробицидных факторов; синтез компонентов комплемента, активатора плазминогена и других протеаз; секреция медиаторов и компонентов клеточных мембран, включая продукты I и II классов МНС; участие в иммунных реакциях |

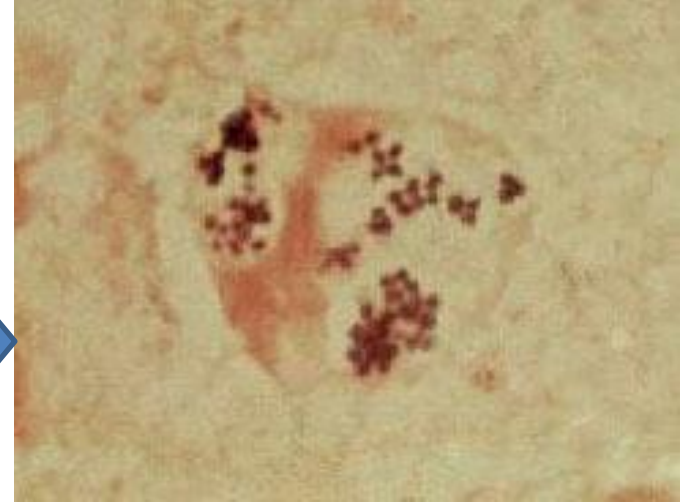
Фагоцитоз

- Фагоцитоз – это комплекс клеточных событий, в основе которых лежит распознавание, поглощение и элиминация из организма корпускулярных частиц, размером больше 0,5 мкм
- И.И. Мечников:
 - поглощение бактерий лейкоцитами является защитной реакцией, направленной на элиминацию возбудителя из организма,
 - фагоцитоз является первой линией в защите организма от патогенных микробов,
 - фагоцитоз является составной частью воспаления, как защитной реакции организма.



Фагоцитарная теория иммунитета.
И.И. Мечников, 1883 г

- Фагоцитоз может быть **завершенным**, заканчивающийся разрушением микроба
- Иногда наблюдается **незавершенный** фагоцитоз, когда микроорганизмы проявляют устойчивость к лизосомальным ферментам и размножаются внутри клетки



- Макрофаги фагоцитируют не истинные бактерии (как НГ), а спирохеты, актиномицеты, грибы, простейшие, вирусы, омертвевшие и злокачественные клетки.



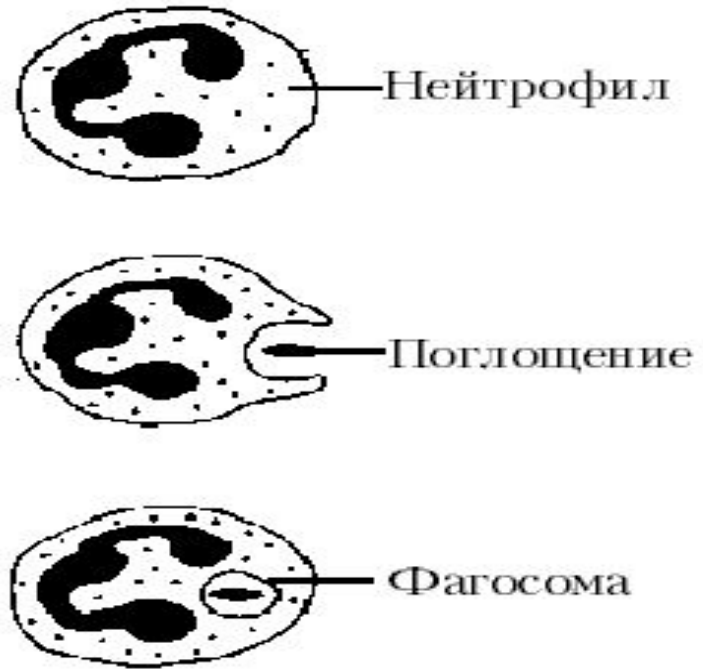
Лейшмании в макрофаге

Фагоцитоз стимулируют антитела, специфические иммуноглобулины, цитокины, соли кальция и магния, адреналин, гистамин и анаболические гормоны.

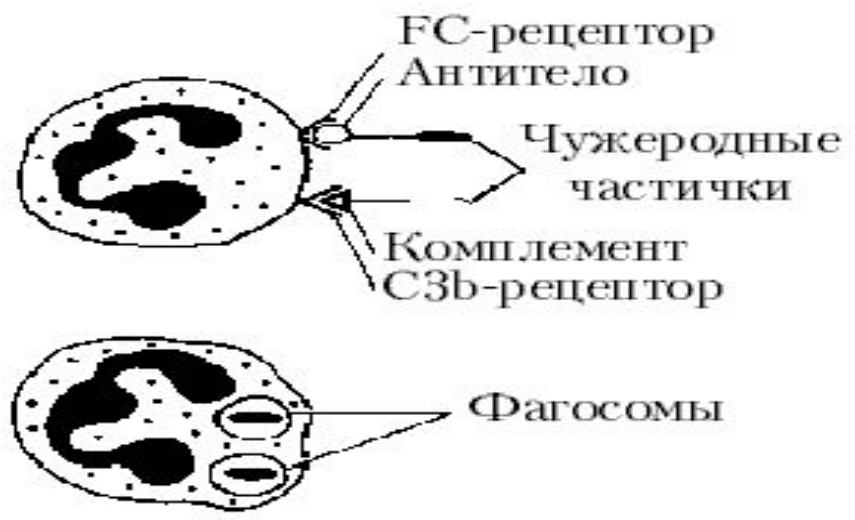


- если фагоцитирующие клетки поместить в сыворотку или плазму крови, то процесс фагоцитоза естественно усилится.
- Такое усиление получило название **опсонизации**, а вещества, которые усиливают фагоцитоз, - **опсонинов** (иммуноглобулины, комплемент)

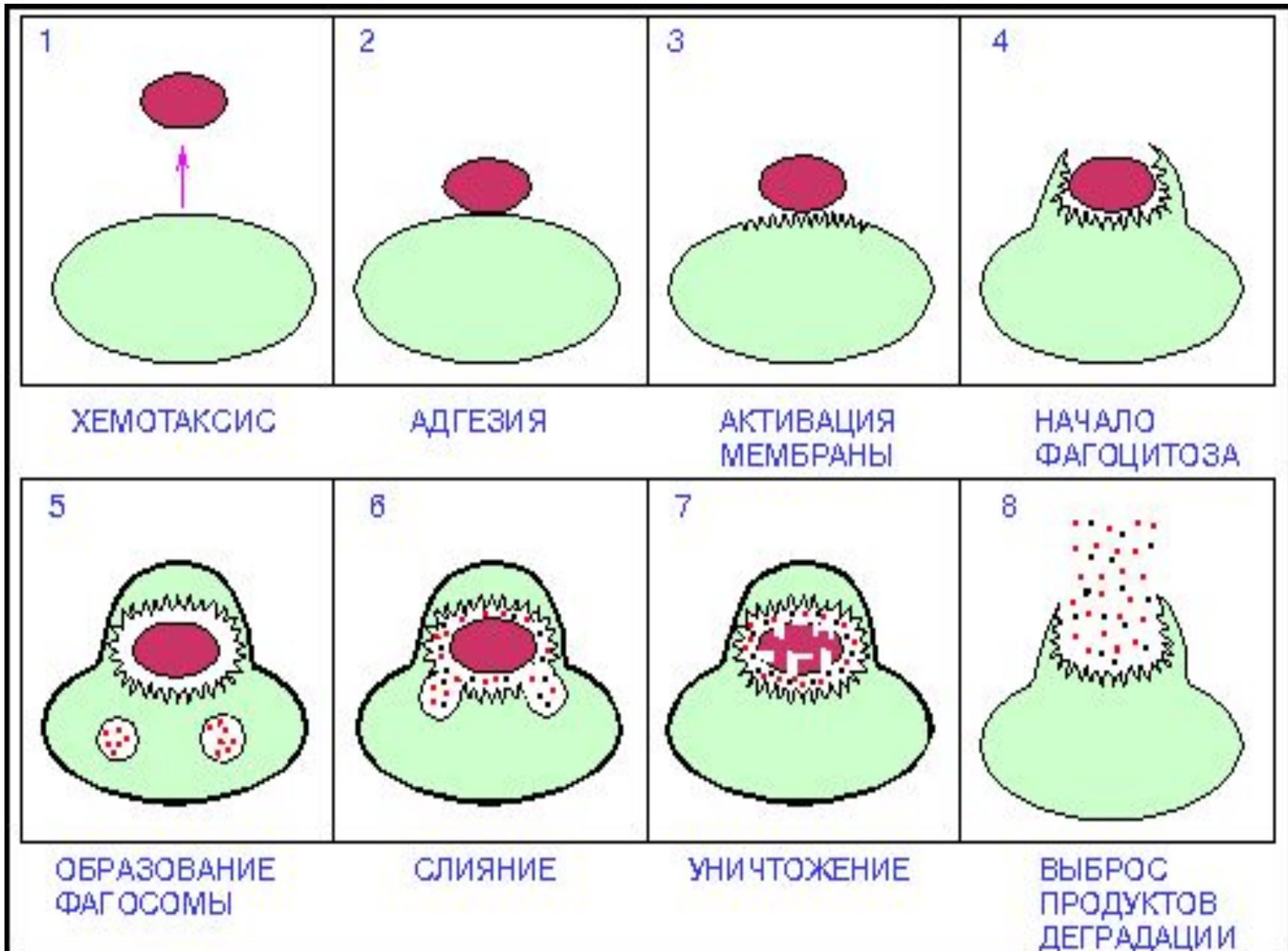
А. Неспецифический фагоцитоз

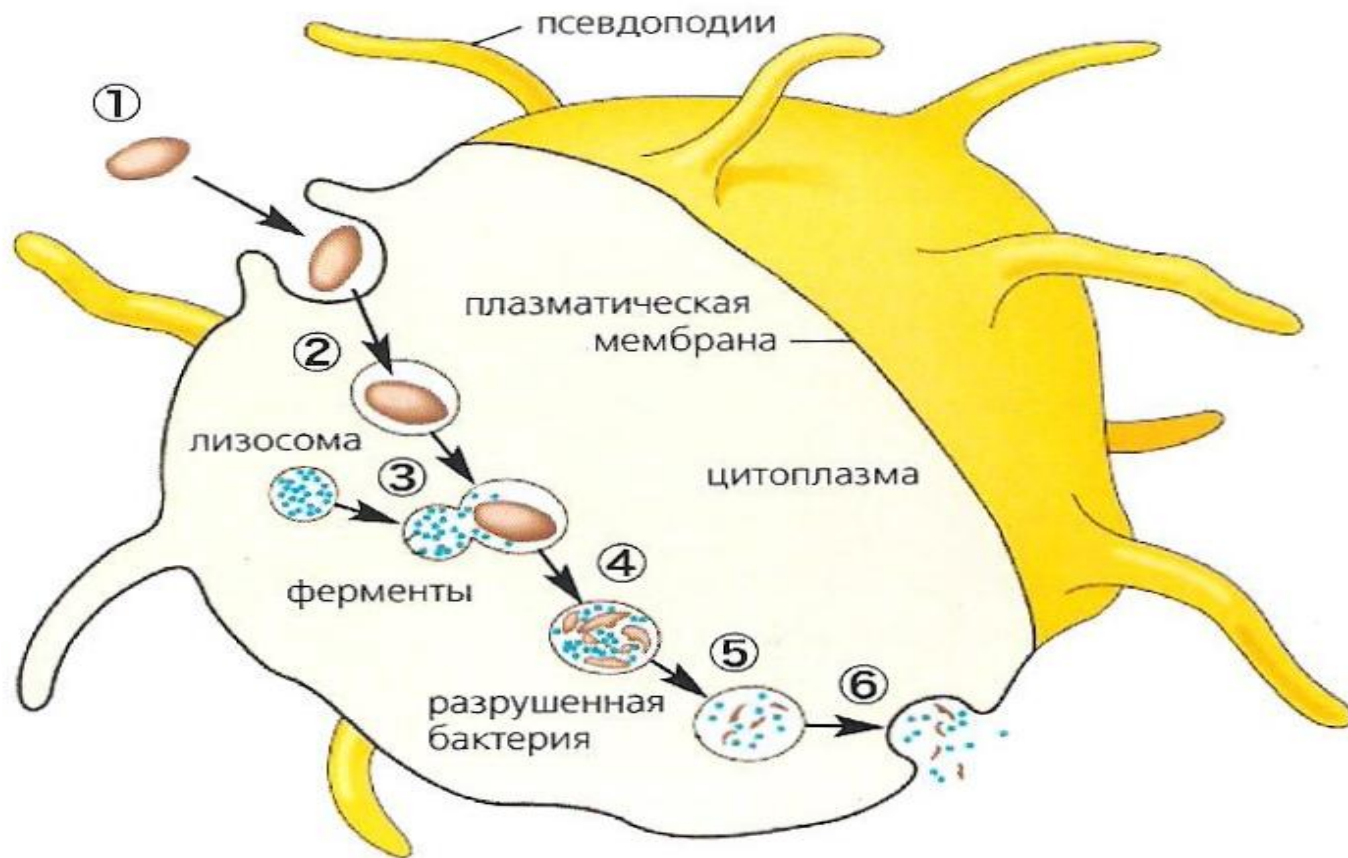


Б. Иммунный фагоцитоз



Этапы фагоцитарного акта

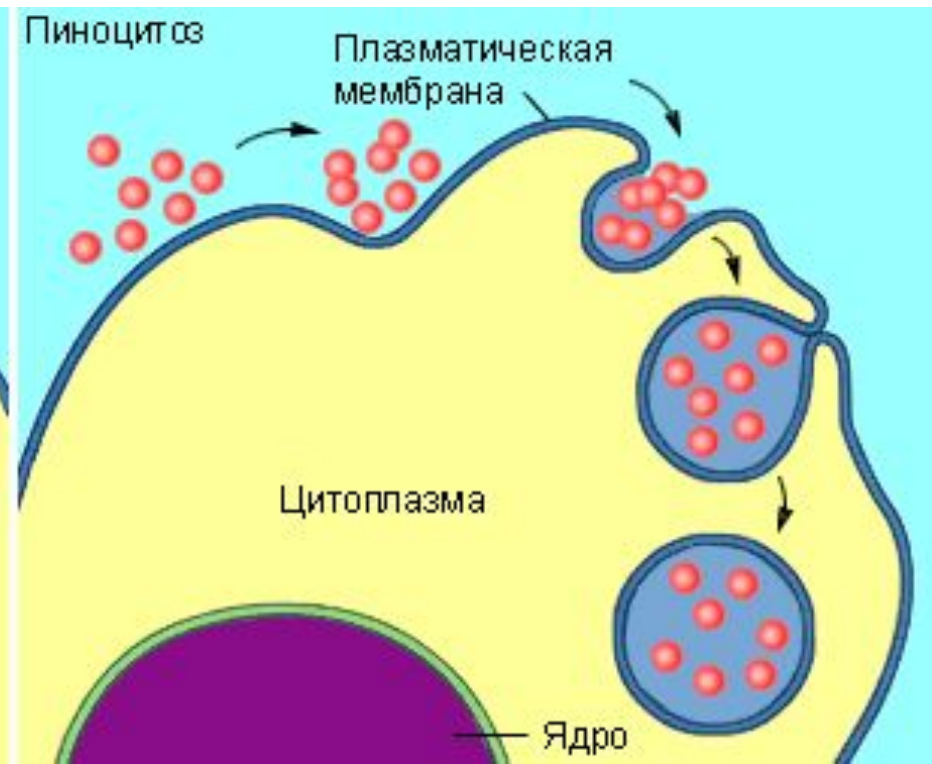
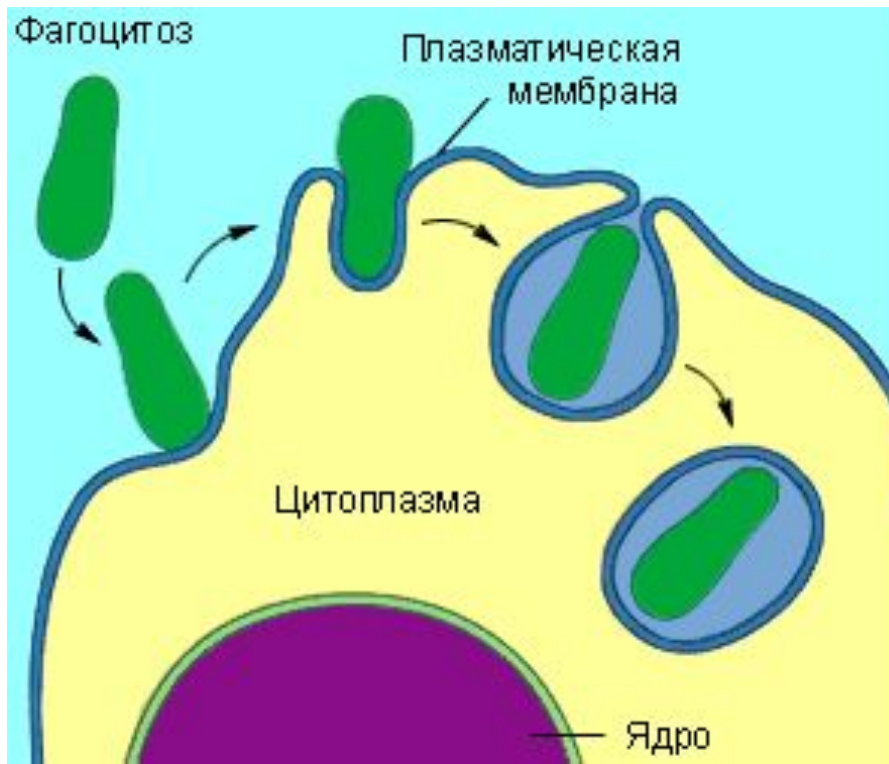




- ① – объект фагоцитоза
- ② – фагосома
- ③ – слияние фагосомы и лизосомы
- ④ – фаголизосома
- ⑤ – остаточные продукты
- ⑥ – переваренные остатки

| Стадия | Событие | Факторы фагоцитоза |
|-----------------------------|--|--|
| Хемотаксис | Сближение фагоцита и объекта | Рецепторы хемотаксинов, цитоскелет, лейкотриены |
| Прилипание | Установление контакта | Соответствующие рецепторы, интегрины |
| Активация мембраны | Подготовка к погружению | Интегрины, рецепторы, липиды, протеинкиназа C, кальций |
| Инициация фагоцитоза | Обволакивание объекта | Элементы цитоскелета, кальций, интегрины |
| Формирование фагосомы | Замыкание мембраны и погружение объекта | Элементы цитоскелета |
| Формирование фаголизосомы | Слияние фагосом и лизосом | Компоненты мембраны, цитоскелета |
| Киллинг и переваривание | Гибель объекта фагоцитоза, его переваривание | Продукты кислородного и азотного метаболизма |
| Выброс продуктов деградации | Выброс содержимого фаголизосомы из клетки | Цитоскелет, мембрана |

Фагоцитоз и пиноцитоз



Механизмы разрушения чужеродных веществ в гранулах фагоцита

кислородзависимый

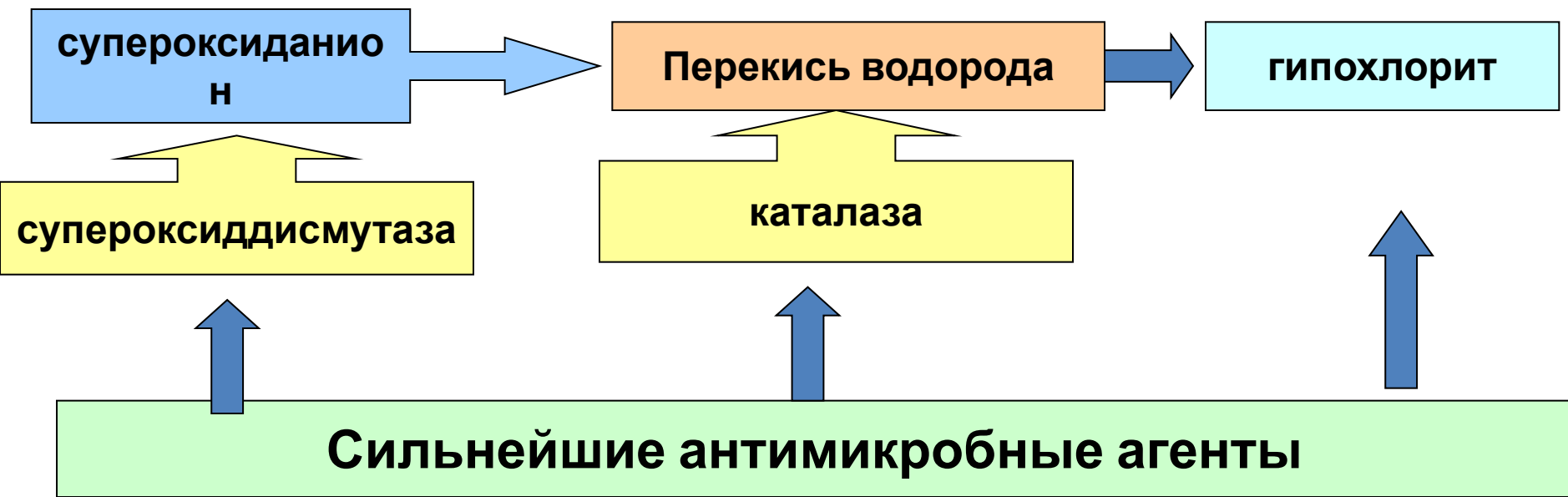
**миелопероксидаза,
перекись водорода;
Супероксид-анион;
синглетный кислород и
гидроксильные радикалы,
атомарный хлор (Cl).**

кислоронезависимый

**гидролитические ферменты:
протеиназы,
катионные белки, лизоцим,
Лактоферин
(активно связывает железо,
необходимое для
размножения бактерий).**

Респираторный (метаболический) взрыв

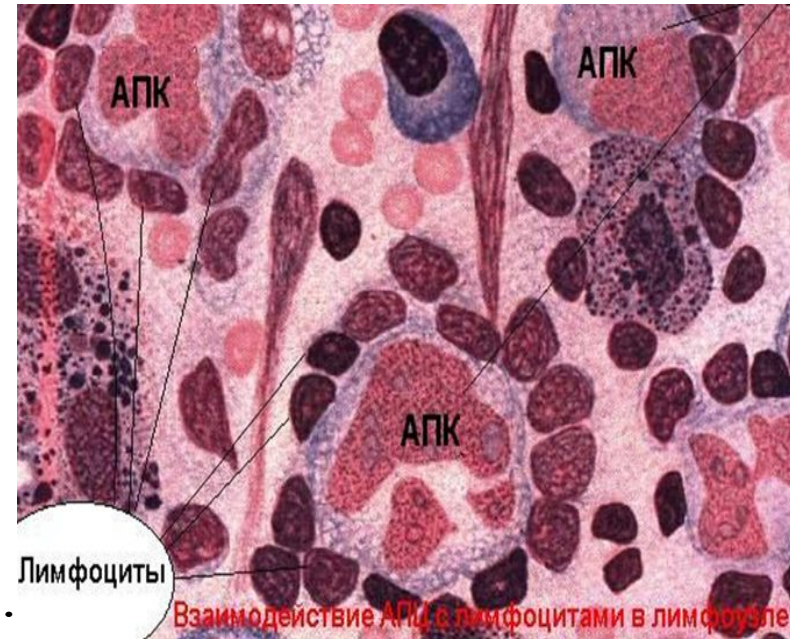
- Метаболические изменения, которые развиваются в клетке, вовлеченной в процесс фагоцитоза
- характеризуется :
 - увеличением потребления кислорода,
 - стимуляцией гексозомонофосфатного шунта,
 - увеличением продукции перекиси водорода, супероксидного аниона и синглетного кислорода.



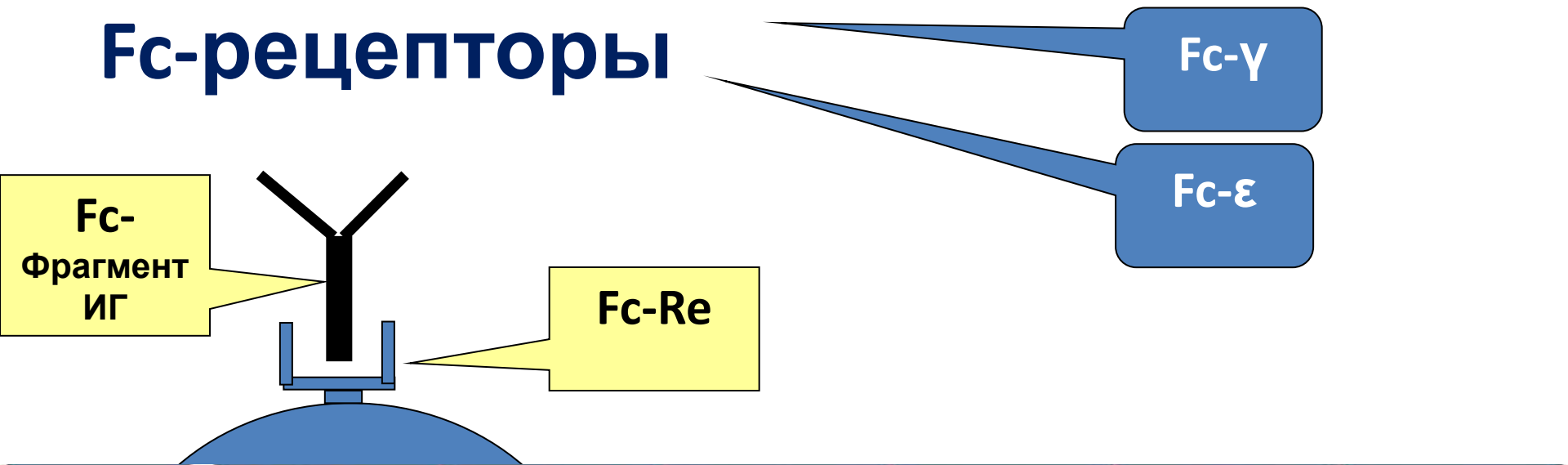
Тканевые макрофаги – производные моноцитов

1. Плевральные и перитонеальные макрофаги.
2. Звездчатые ретикулоэндотелиоциты (купферовские клетки) печени.
3. Альвеолярные макрофаги.
4. Интердигитирующие клетки лимфатических узлов.
5. Макрофаги вилочковой железы (тимические).
6. Костномозговые макрофаги.
7. Остеокласты.
8. Синовиальные клетки (тип А).
9. Глиальные макрофаги (микроглиоциты) мозга.
10. Мезангиальные клетки почек.
11. Поддерживающие клетки (клетки Sertoli) яичка.
12. Дендритные клетки лимфатических узлов и селезенки.
13. Клетки Лангерганса кожи и слизистых.

**Длительность
жизни
тканевых
макрофагов
40-60 суток**



Fc-рецепторы



| Receptor | Fc γ RI (CD64) | Fc γ RII-A (CD32) | Fc γ RII-B2 | Fc γ RII-B1 | Fc γ RIII (CD16) | Fc ϵ RI |
|--------------------|---|--|---|--|--|--|
| Structure | <p>α 74kDa γ</p> | <p>α 40kDa γ-like domain</p> | | | <p>α 50–70kDa γ or ζ</p> | <p>α 45kDa β 33kDa γ 9kDa</p> |
| Binding | IgG1 | IgG1 | IgG1 | IgG1 | IgG1 | IgE |
| Order of affinity | 10^8 M^{-1} 1) IgG1 2) IgG3=IgG4 3) IgG2 | $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 1) IgG1 2) IgG3=IgG4 3) IgG2 | $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 1) IgG1 2) IgG3=IgG4 3) IgG2 | $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 1) IgG1 2) IgG3=IgG4 3) IgG2 | $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ IgG1=IgG3 | 10^{10} M^{-1} |
| Cell type | Macrophages Neutrophils Eosinophils | Macrophages Neutrophils Eosinophils Platelets | Macrophages Neutrophils Eosinophils Platelets Langerhans' cells | B cells | NK cells Eosinophils Macrophages Neutrophils Langerhans' cells | Mast cells Eosinophils Basophils |
| Effect of ligation | Uptake | Uptake Granule release (eosinophils) | Uptake Granule release (eosinophils) | Inhibition of stimulation —no uptake | Induction of killing (NK cells) | Secretion of granules |

Рецепторы макрофагов

- к Fc-фрагменту иммуноглобулинов классов A, M, E и разным субклассам Ig G
- к различным лимфокинам, гормонам и регуляторным пептидам
- ко многим компонентам комплемента - C3, C1q, C4b, C5b, C5a.
- дифференцировочные антигены
- тканеспецифические антигены

Ферменты гранул макрофагов

- кислые гидролазы
- кислая фосфатаза
- альфа-нафтилэстераза
- кислая и другие эстеразы
- липаза
- катепсины
- эластаза
- лизоцим
- миелопероксидаза (МПО)
- коллагеназа
- катионные белки
- лактоферин.

Секреторные продукты макрофагов

- ферменты (нейтральные протеазы и кислые гидролазы),
- компоненты комплемента, ингибиторы ферментов,
- реактогенные метаболиты кислорода,
- биоактивные липиды (простагландины, лейкотриены,
- факторы хемотаксиса для лейкоцитов)

Миграционная и хемотаксическая функция макрофагов

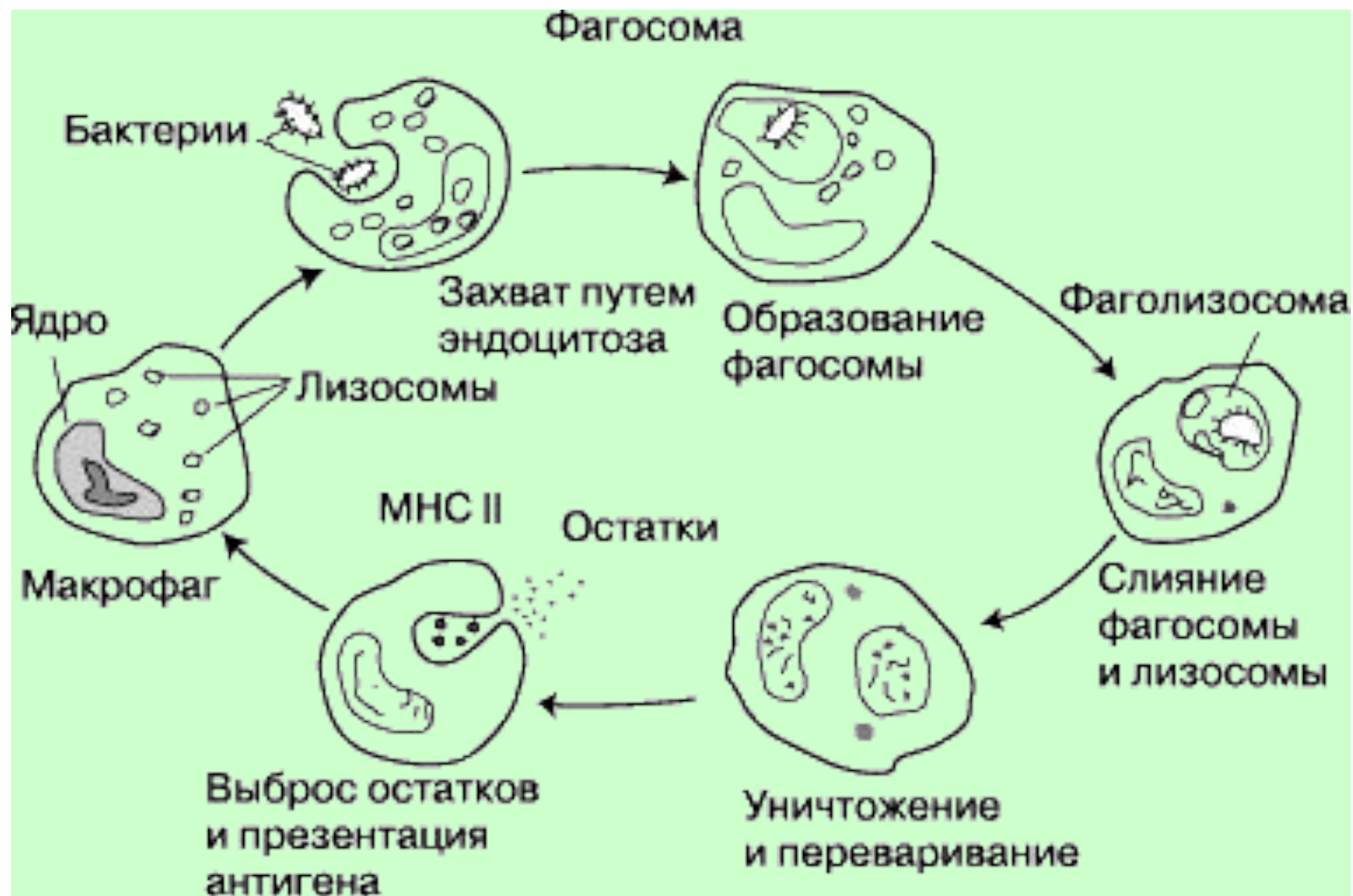
- В отличие от ненаправленной миграции, хемотаксис макрофагов является целенаправленным, а ориентиром, определяющим направление движения, служит хемотаксическое вещество – хемоаттрактант

хемоаттрактант
ы

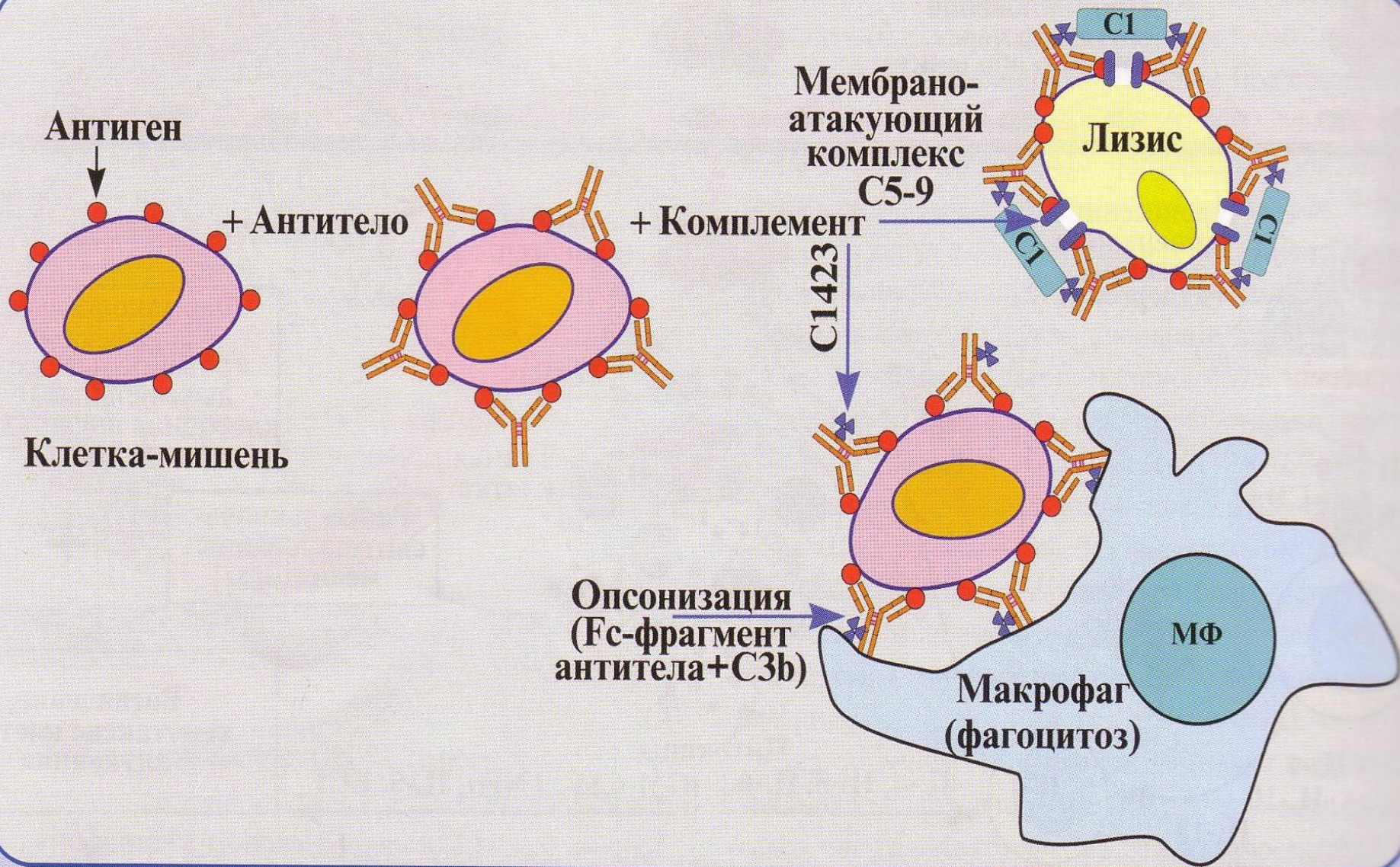
фрагменты системы комплемента,
глобулины сыворотки крови,
лимфокины,
продукты деградации фибрина,
коллагена и различных клеток

ФИМ –
фактор, ингибирующий
миграцию

интерферон, гиалуроновая кислота,
активатор плазминогена,
ингибиторы трипсиноподобных
протеиназ и др.



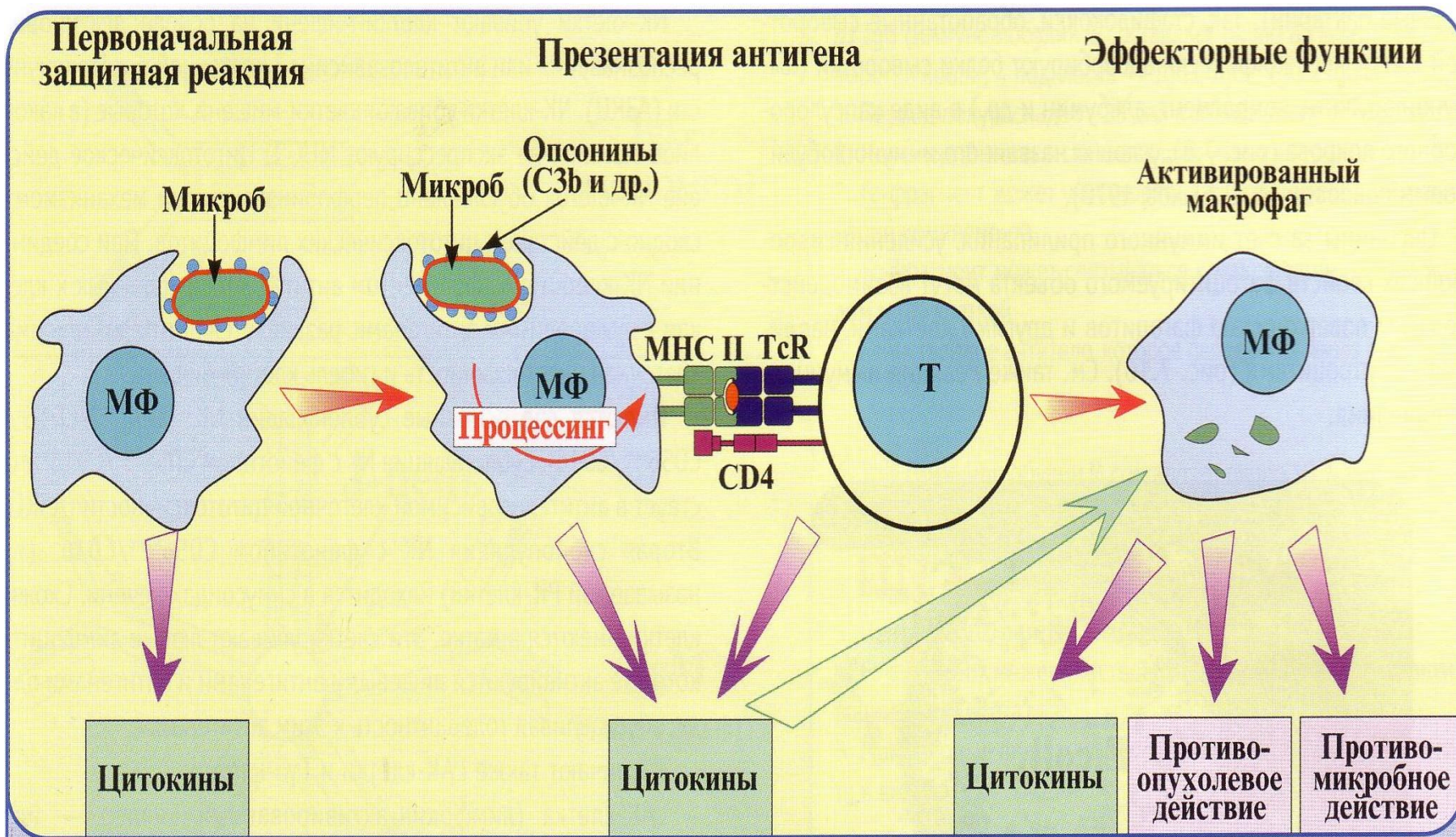
Спонтанная и антителозависимая цитотоксичность макрофагов



Секреция цитокинов макрофагами

- факторы, влияющие на клеточную дифференцировку и пролиферацию
(гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор - ГМ-КСФ)
- различные цитотоксические факторы **(ФНО)**
- **интерлейкин-1 (ИЛ1)**, имеющий принципиально важное значение в развитии как специфических иммунных реакций, так и реакций врожденного иммунитета
- **компоненты комплемента**
- **альфа-интерферон (α -ИФН), а также γ -ИФН (10%)**, которые также важны для поддержания врожденного и адаптивного иммунитета

Т.о., Роль макрофага в иммунной системе:



Гранулоциты -

полиморфноядерные лейкоциты, циркулирующие в крови и возникающие, как и моноцитарно-макрофагальные клетки, из миелоидной стволовой клетки в костном мозге.

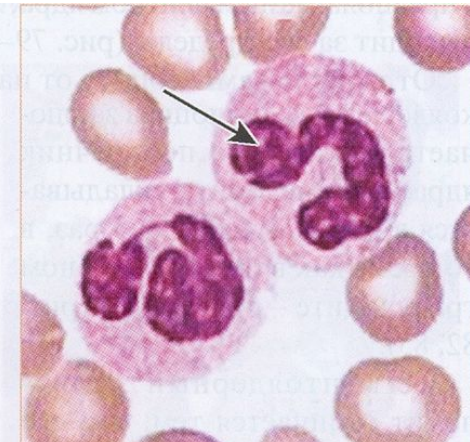
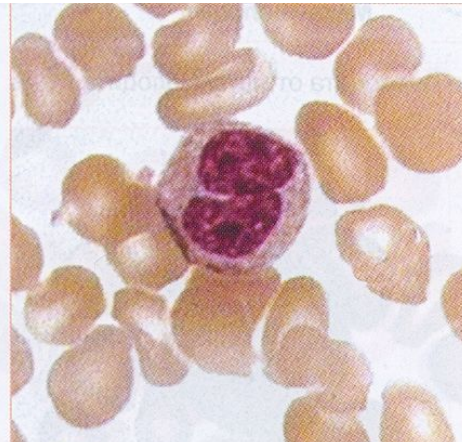
НГ



Эоз



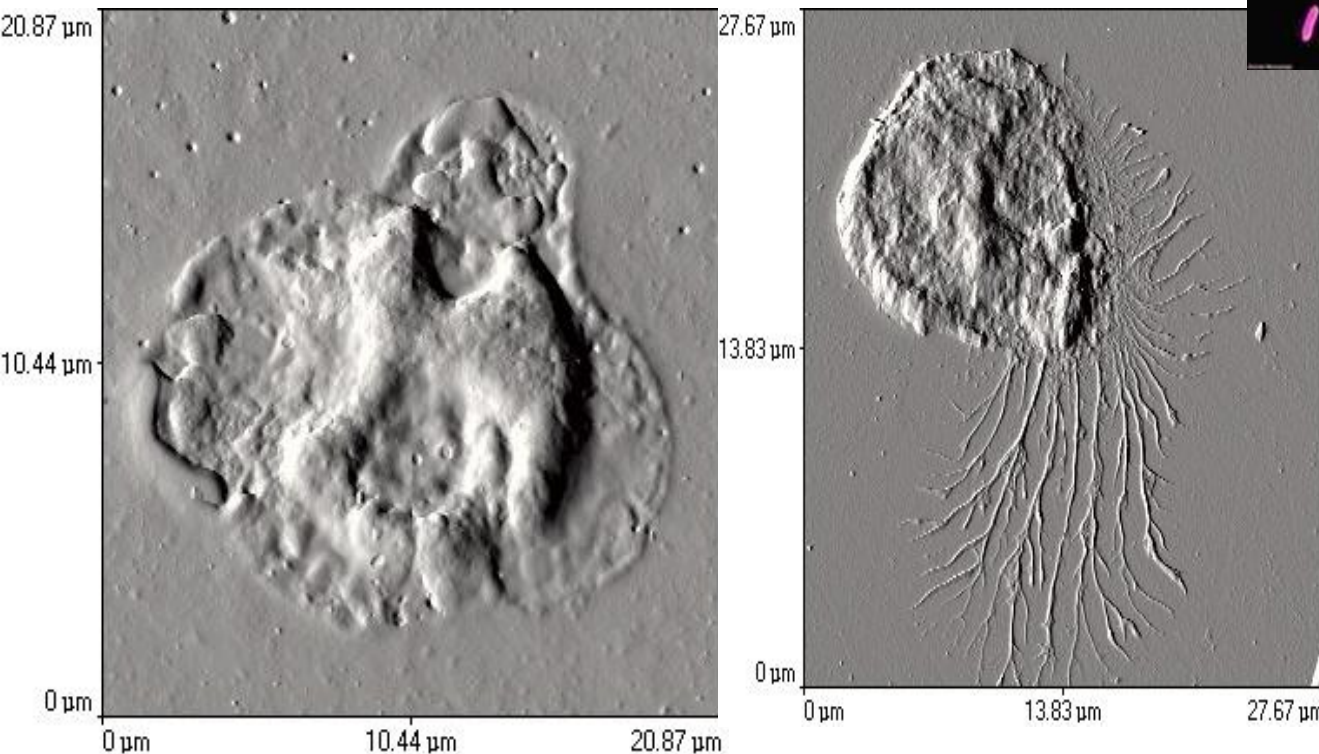
Баз



Зрелые нейтрофильные гранулоциты - профессиональные фагоциты истинных бактерий

- **НГ** составляют наибольшую часть популяции полиморфноядерных лейкоцитов.
- Основные функции нейтрофилов – **хемотаксис, фагоцитоз и секреция.**
- Для выполнения этих функций имеются многочисленные ферменты, локализованные в специфических гранулах.
- Под влиянием фагоцитированных частиц или клеток, агрегированных иммуноглобулинов, иммунных комплексов, компонентов комплемента, лектинов и других митогенов происходит активация нейтрофилов.
- Активированные нейтрофилы являются продуцентами ферментов, ответственных за непосредственное повреждение тканей при иммунных воспалительных процессах.

**Топография интактного НГ и
через 5 мин после контакта
со стафилококком
(активированного)**



Формирование псевдоподии *in vitro* необходимо НГ для более эффективного захвата и внутриклеточного разрушения микроорганизма

Эффекторные функции НГ

микробицидность

фагоцитоз

секреция

**Антитело-
и комплементзависимая
цитотоксичность**

- Адгезия
- Миграция
- Поглощение
- Дегрануляция
- Респираторный взрыв
- Рецепторный аппарат



Гранулярный аппарат НГ

Азурофильные
гранулы
(первичные)

Кислые протеиназы (катепсины А, Д, Е)
Бета-глюкуронидаза
Нейтральные протеиназы (коллагеназа,
эластаза, катепсин G)
Дифенсины
Миелопероксидаза
Лизоцим, кислая фосфатаза

Специфические
гранулы
(вторичные)

Лактоферрин
Щелочная фосфатаза
Лизоцим
Дифенсины
Гистаминаза
Коллагеназа

Секреторные пузырьки
(третичные гранулы)

Желатиназа
Катепсины
Бета-глюкуронидаза и др.

Не зависящие от
кислорода

Компоненты зрелого НГ, локализованные в азурофильных и специфических гранулах

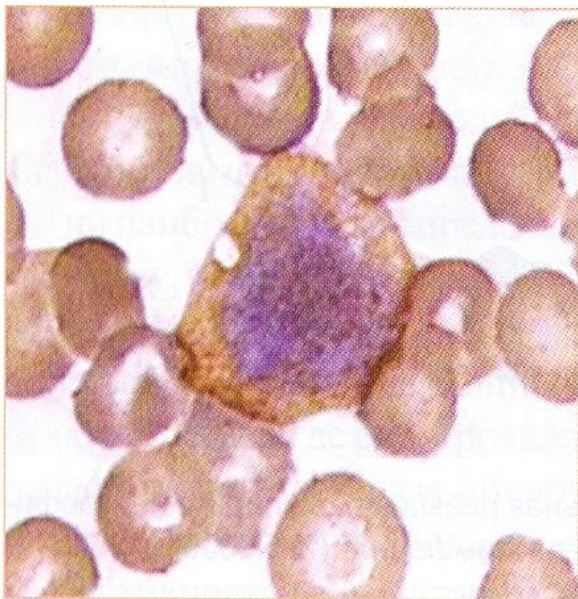
Микробицидные системы НГ

Компоненты, образующиеся или резко активирующиеся при стимуляции НГ

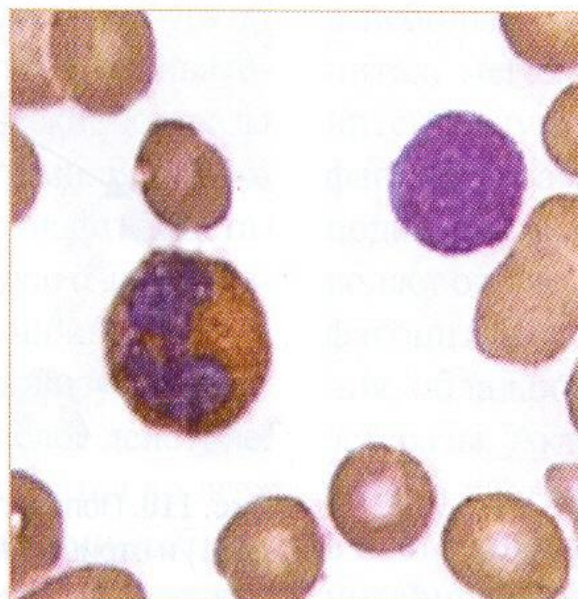
Зависящие от кислорода

Цитохимические методы диагностики внутриклеточных ферментов клеток гранулоцитарного ряда

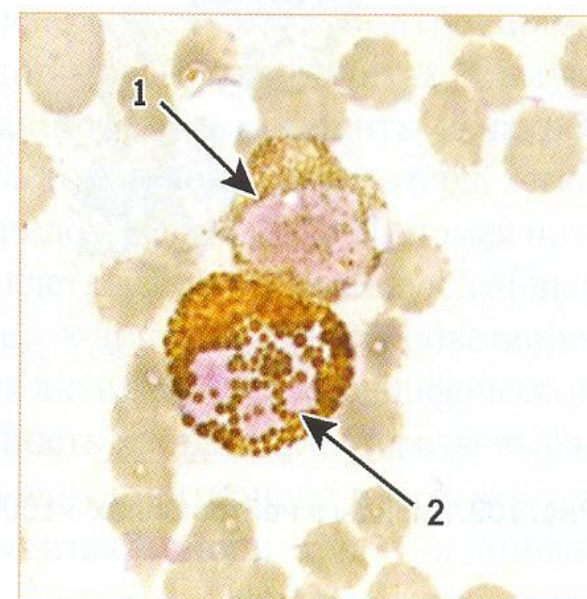
МПО



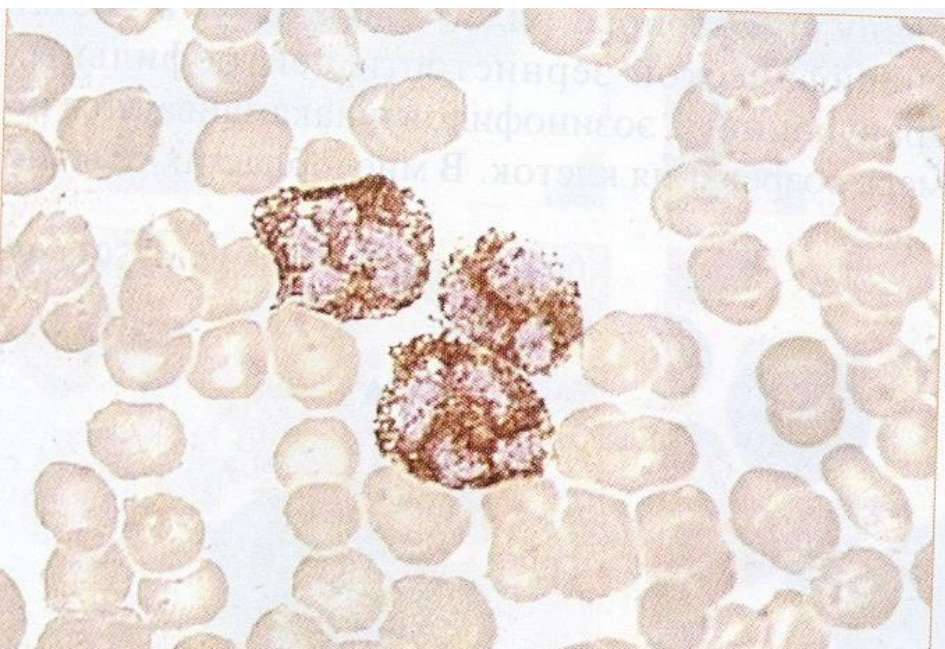
Положительная реакция
на миелопероксидазу
(миелоцит)



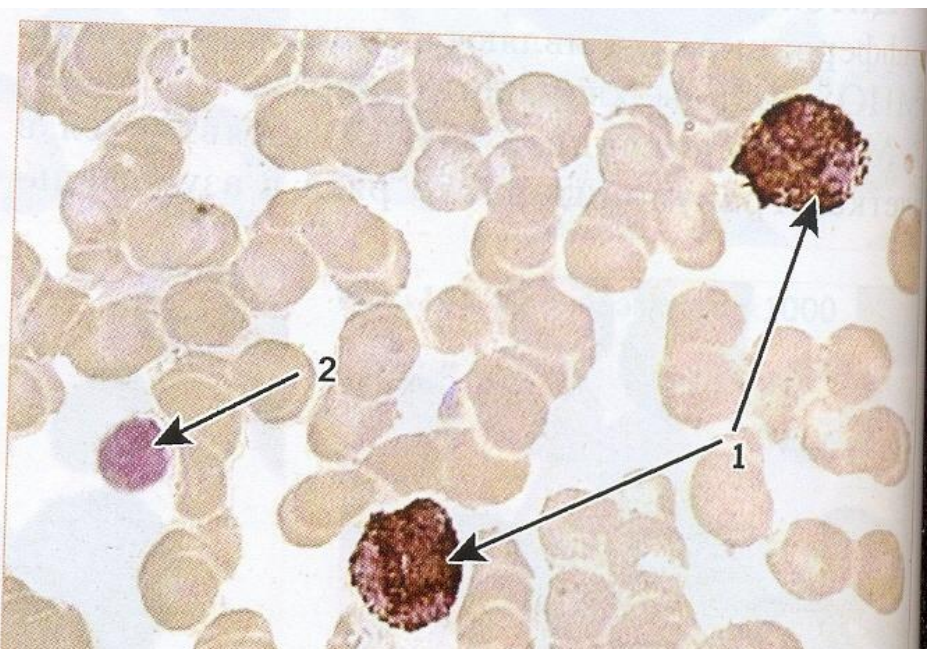
Положительная реакция
на миелопероксидазу
(нейтрофил)
Отрицательная -
(лимфоцит)



Положительная реакция
на миелопероксидазу
в нейтрофиле (1)
Резко-положительная -
в эозинофиле (2)

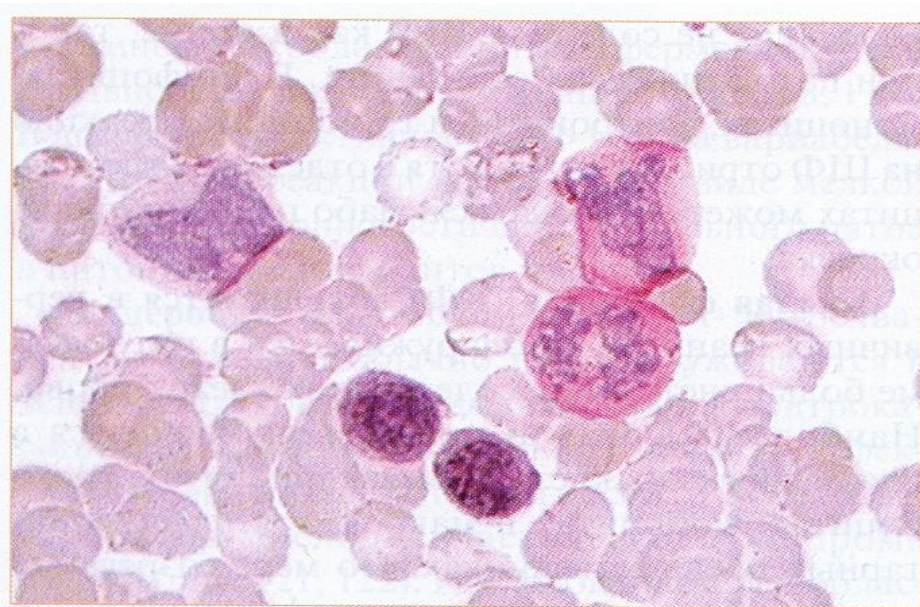


Липиды в нейтрофилах

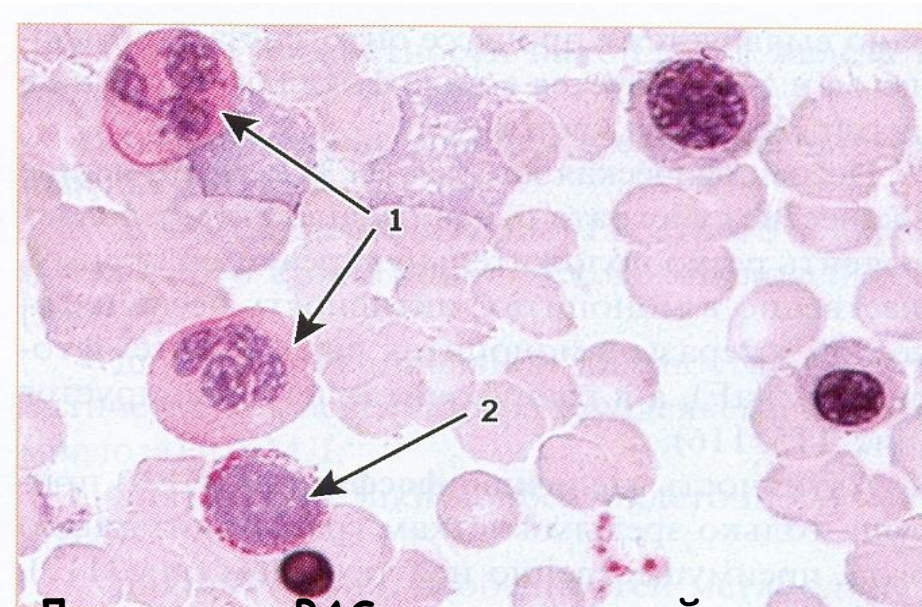


Липиды в нейтрофилах (1)
Отрицательная реакция -
в лимфоците (2)

Липиды

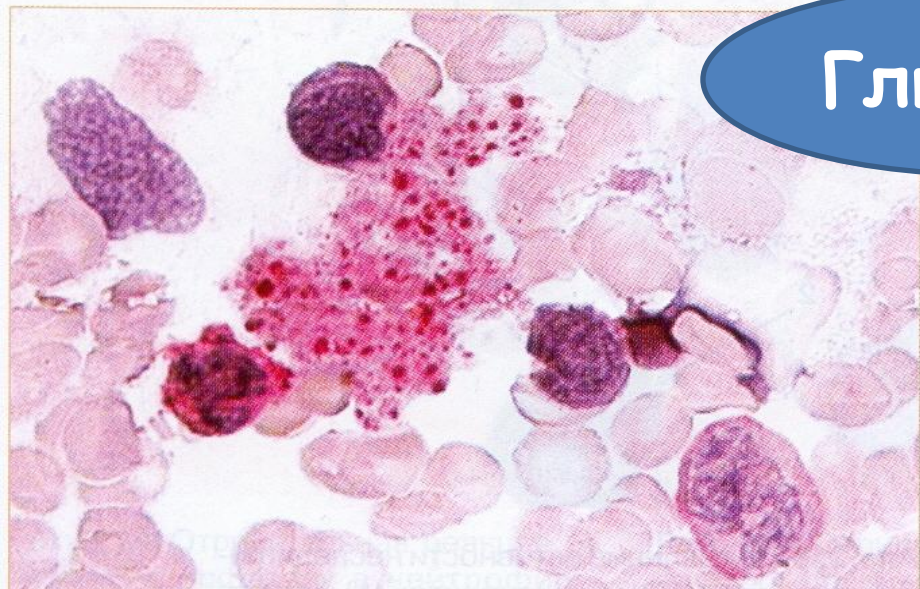


Диффузная PAS-реакция в гранулоцитах и нормобластах



Диффузная PAS-реакция в нейтрофилах (1) и гранулярная - в лимфоците (2)

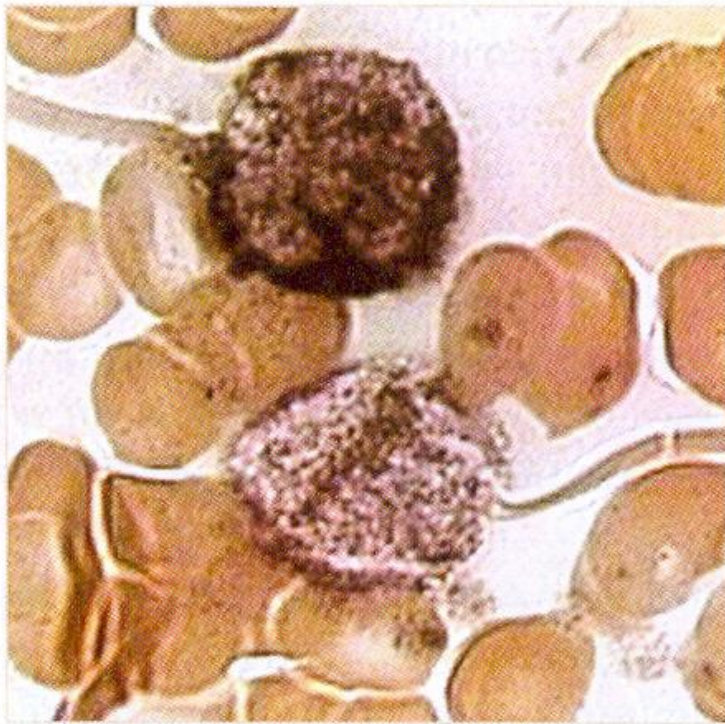
Гликоген



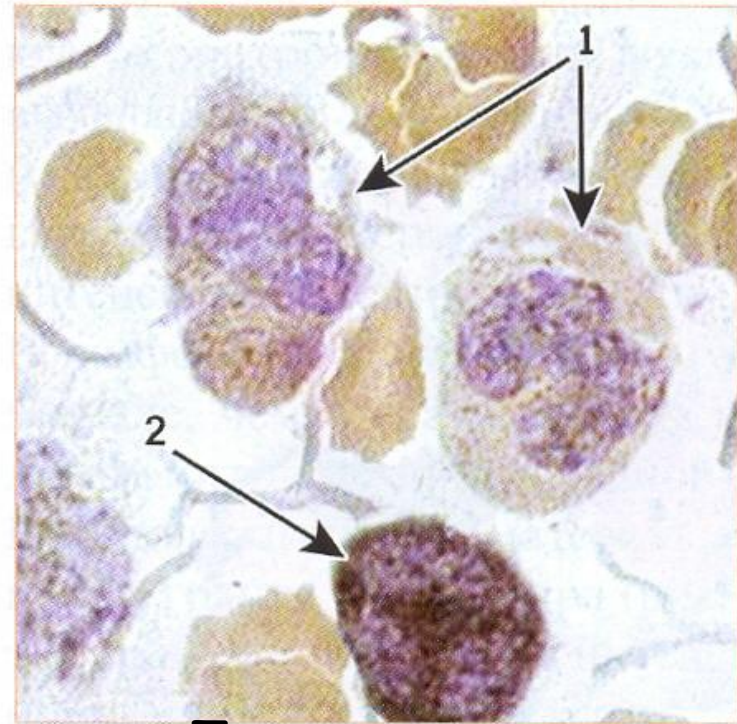
Диффузная PAS-реакция в тромбоцитах



Диффузная PAS-реакция в нейтрофилах

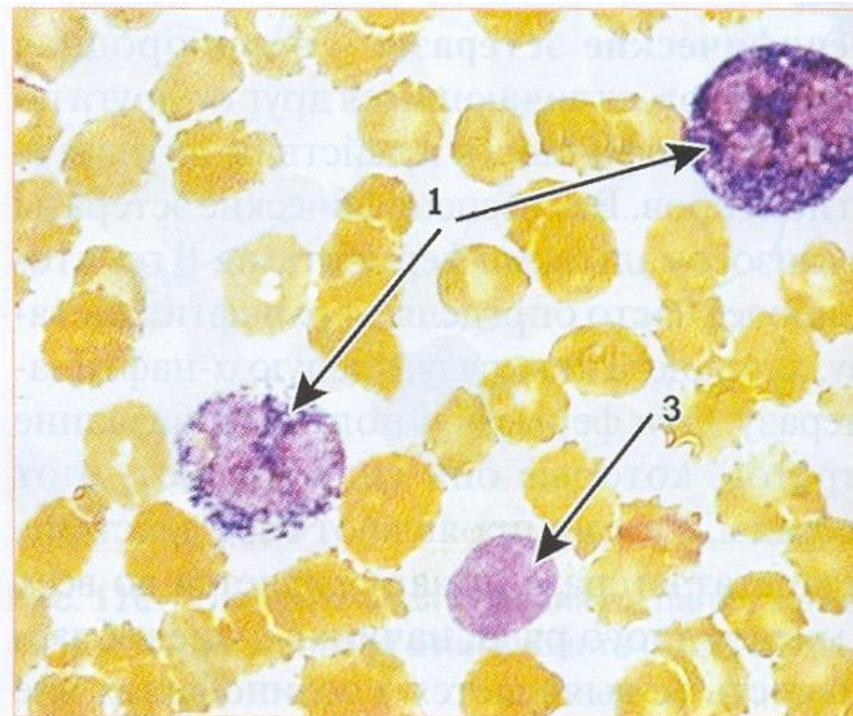
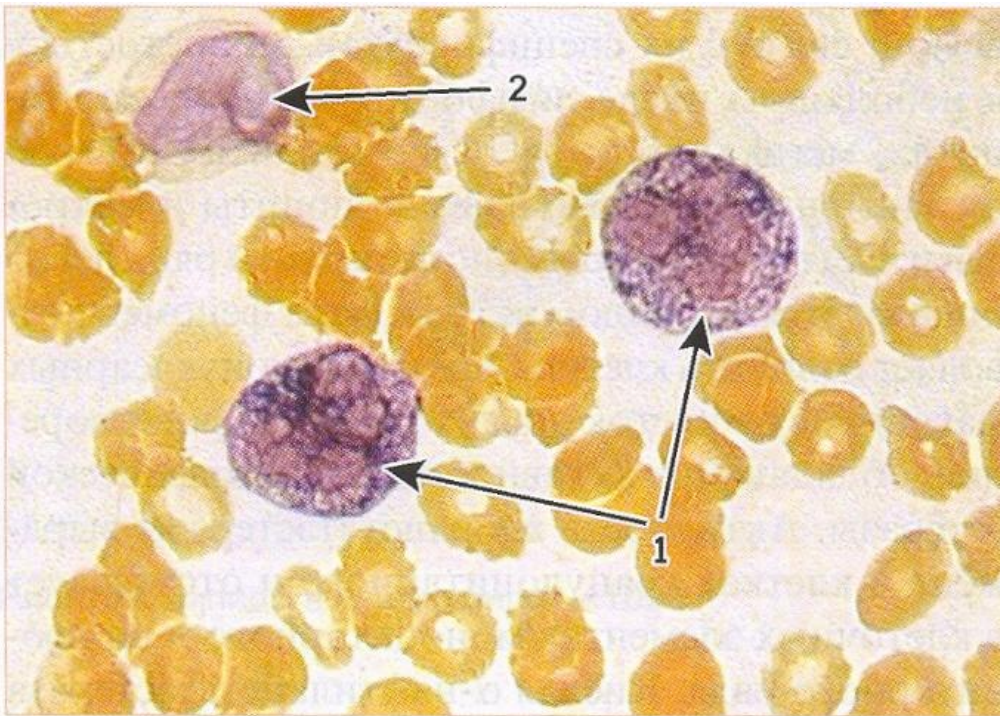


Высокая активность неспецифической эстеразы в моноците
Более низкая - в нейтрофиле



Подавление активности неспецифической эстеразы фторидом натрия в моноцитах (1)
Отсутствие подавления - в нейтрофиле (2)

Неспецифическая эстераза - устойчивая и ингибируемая фторидом натрия



**Положительная реакция на щелочную фосфатазу в нейтрофилах (1)
Отрицательная - в моноците (2) и лимфоците (3)**

**Щелочная
фосфатаза**

Рецепторы НГ

Функционально-значимые

- Fc-гамма-R1 (CD64)
- Fc-гамма-R2(CD32)
- CD35 к компоненту (связывание ИК)
- CD11b\ CD18 (фагоцитоз, адгезия)
- Fc-гамма-R3(CD16, НГ-киллеры)
- Fc-альфа-R(фагоцитоз, хемотаксис)
- Мас-2-эпсилон (связывание IgE)
- CD14 -для ЛПС (фагоцитоз)

Активационные

- к GM-CSF, G-CSF
- FPR - для f-MLP (активатора хемотаксиса и респираторного взрыва)
- NAP-1 для ИЛ-8
 - Re для ФНО
 - CD95
- CD25 (к ИЛ-2)
- H1-Re (про-воспалительные)
- Re к ЛТВ4

Рецепторы депрессии

- H2-Re (противо-воспалительные - торможение хемотаксиса и дегрануляции)
- Re к кортико-стероидам (ИДС-НГ)
- Re к ПГЕ

Типы клеток-участников воспаления - универсальной реакции организма на повреждение

- Нейтрофилы
- Моноциты
- Макрофаги
- Клетки эндотелия
- Фибробласты

Первыми в очаг воспаления мигрируют нейтрофилы (первые часы, сутки), затем - макрофаги (в течение нескольких дней), а последними - лимфоциты.

При остром воспалении преобладают нейтрофилы и активированные Т-хелперы

При хроническом - - больше макрофагов, ЦТЛ и В-лимфоцитов

Такая очередность миграции лейкоцитов в очаг воспаления обусловлена хемокинами и молекулами адгезии

Этапы проникновения лейкоцитов в ткани при воспалении

- Роллинг (перекатывание) - с помощью молекул адгезии - селектинов, а также ИЛ-8, секретируемого эндотелиоцитами
- Адгезия - прочное соединение лейкоцитов с эндотелиоцитами посредством других молекул адгезии - интегринов
- Проникновение в ткани - миграция (хемотаксис) при участии хемокинов (хемоаттрактантов - фактор активации тромбоцитов, лейкотриен В4, С5а, ИЛ8)



Методы диагностики фагоцитирующих клеток

- Оценка относительного и абсолютного содержания НГ, Мон в крови, МФ - в биожидкостях - **микроскопия**
- Оценка рецепторного аппарата фагоцитов (CD11b - рецепторы адгезии, CD16- рецепторы цитотоксичности, CD25 - рецепторы к ИЛ-2, CD95 - рецепторы проапоптотические или позитивной активации и др.) - **проточная цитометрия**
- Оценка фагоцитарной активности и переваривающей способности фагоцитов- **тест на показатели фагоцитарной функции (%ФАН, ФЧ, ФИ, %П, ИП, ИППА)**
- Оценка адгезивной способности фагоцитов - **адгезия к пластику**
- Оценка миграционной функции фагоцитов (НГ) - **в капилляре, под агаром, тест кожного окна**
- Оценка оксидазной биоцидности - **спонтанный и стимулированный NBT-тест, хемилюминесценция**
- Оценка интралейкоцитарной микробицидной системы (уровень содержания КБ, активность МПТ, ХА-ASD-эстеразы, ЩФ, КФ и др.) - **цитохимия, микроскопия**
- Оценка уровня секретируемых цитокинов (in vivo, in vitro) - ИЛ-8, ИЛ-1, Г-КСФ, ФНО-альфа и др. - **ИФА**

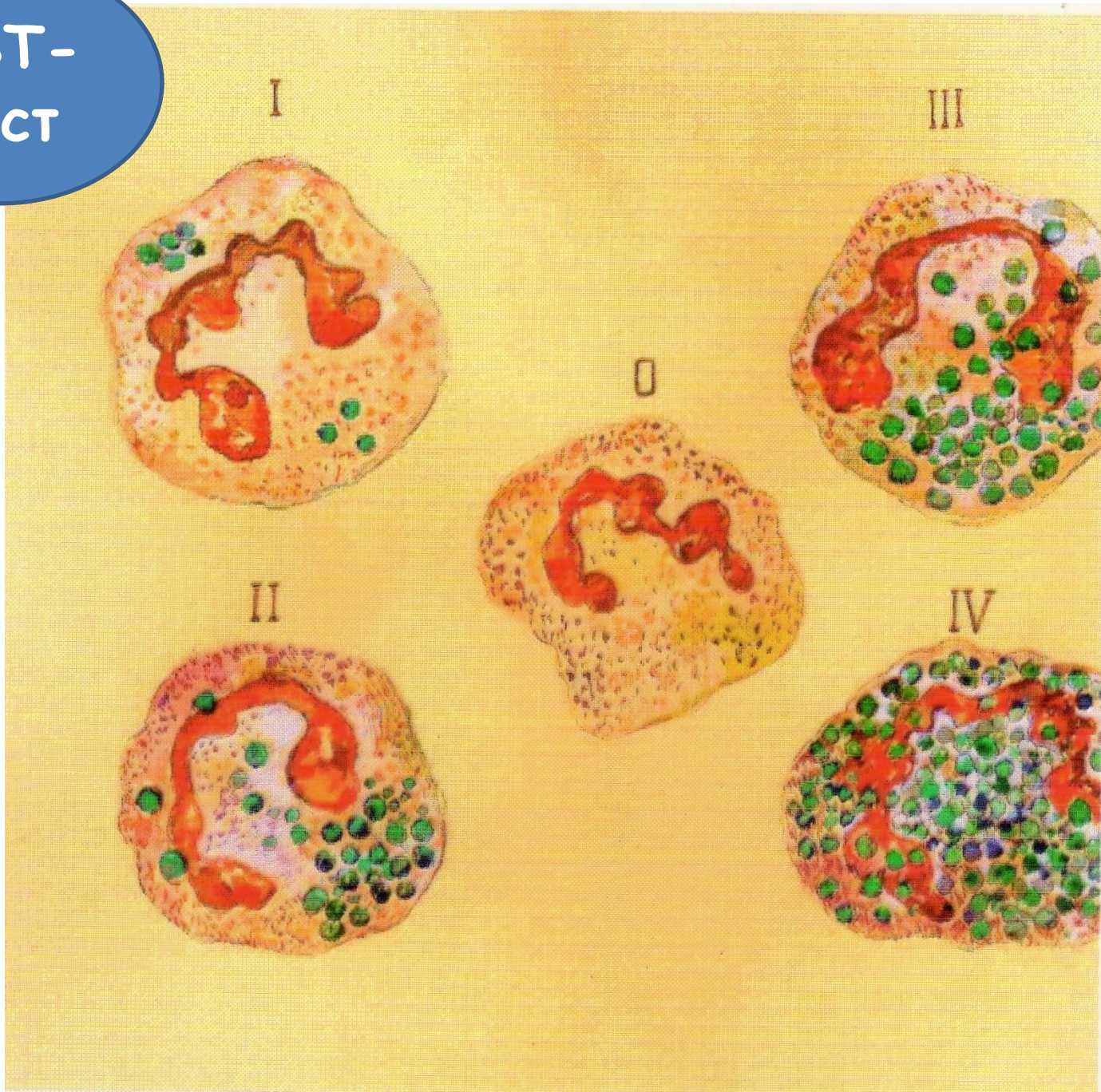
ПРИЗНАКИ АКТИВАЦИИ ФАГОЦИТИРУЮЩИХ КЛЕТОК

- Признаки активации фагоцитов (макрофагов, НГ) весьма разнообразны, как весьма разнообразны соответствующие тесты оценки активации фагоцитов. Активированными считают функционально измененные фагоциты, которые приобретают повышенную способность к фагоцитозу, усилению цитотоксичности, способности к секреции различных иммунных медиаторов.
- Кроме функциональных критериев активации макрофагов и НГ существуют морфологические, биохимические и биофизические тесты активации, которые удобно разделять на ранние и поздние.
- **РАННИЕ** – выявляют изменения, наступающие в течение минут или часов после активирующего воздействия
- **ПОЗДНИЕ** – в течение 1-2 суток.

РАННИЕ ПРИЗНАКИ АКТИВАЦИИ:

- «**окислительный взрыв**», сопровождающийся накоплением и выделением в среду активных форм кислорода – перекись водорода, OH , O_2^- – способствует уничтожению патогенных микроорганизмов
- **Накопление и секреция супероксидных соединений** определяется:
 - биохимическими,
 - цитохимическими
- **способность фагоцитов к хемилюминесценции в присутствии люминола** (ответ более выражен, чем NBT-тест)

NBT-
TECT

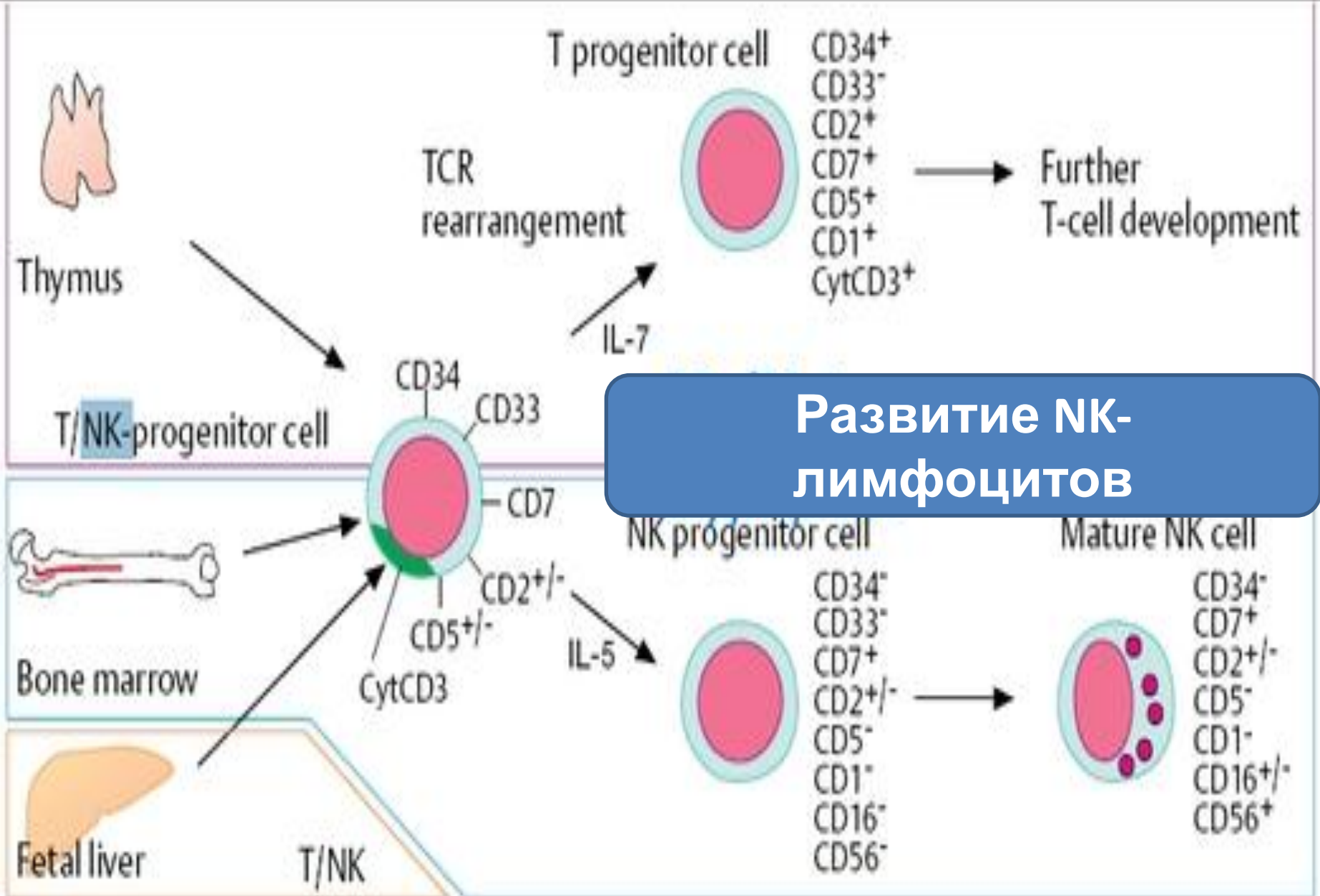


ПОЗДНИЕ ПРИЗНАКИ АКТИВАЦИИ н е й т р о ф и л о в

- Для оценки активации НГ используются тесты, аналогичные макрофагальным:
- Оценка цитотоксичности НГ крови человека, обработанных ФГА, относительно куриных эритроцитов (низкая активность у больных лимфогранулематозом)
- NBT-тест, хемилюминесценция
- Миграционная способность (ТГЕ-2-образующие лейкоциты подавляют спонтанную миграцию НГ в агарозе)
- Фагоцитоз, иммунофенотипирование (проточная цитометрия)

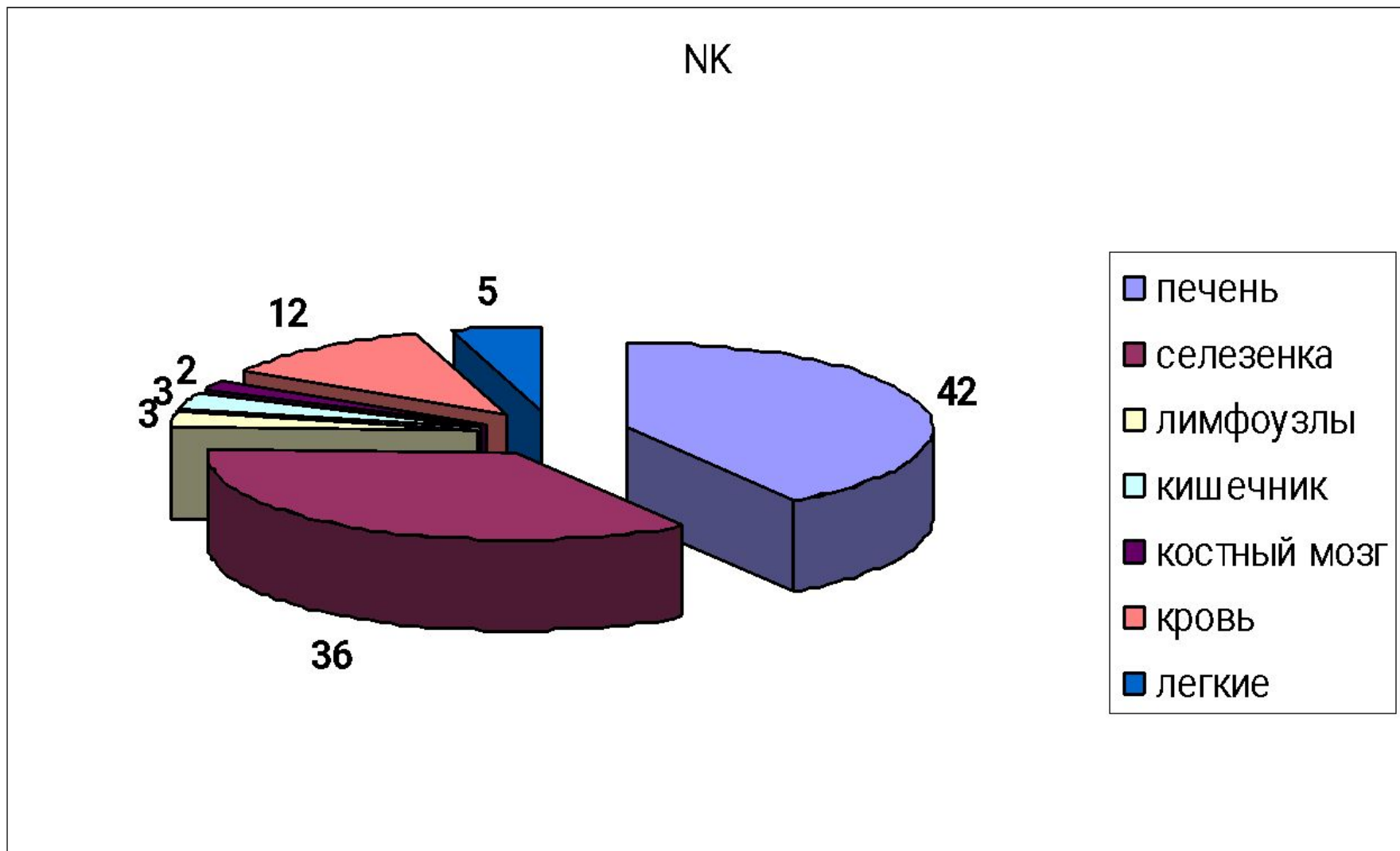
Натуральные (естественные) киллеры - НК-клетки

- Эффекторные клетки (лимфоциты) врожденного иммунитета, осуществляющие прямое цитотоксическое действие на клетки-мишени (опухолевые, вирусинфицированные) без предварительной активации
- В крови их доля составляет 10-12% от общего числа лимфоцитов
- Отличие от Т-лф - нет CD3, отличие от В-лф - нет иммуноглобулиновых рецепторов
- Развитие НК происходит при отсутствии сигналов для Т- и В-лимфопоэза (гипотеза), фактор дифференцировки предшественников НК - неизвестен
- НК-лимфоциты являются особенными клетками иммунной системы, распознающими преимущественно собственные молекулярные структуры, что позволяет им осуществлять функцию надзора за состоянием других клеток организма

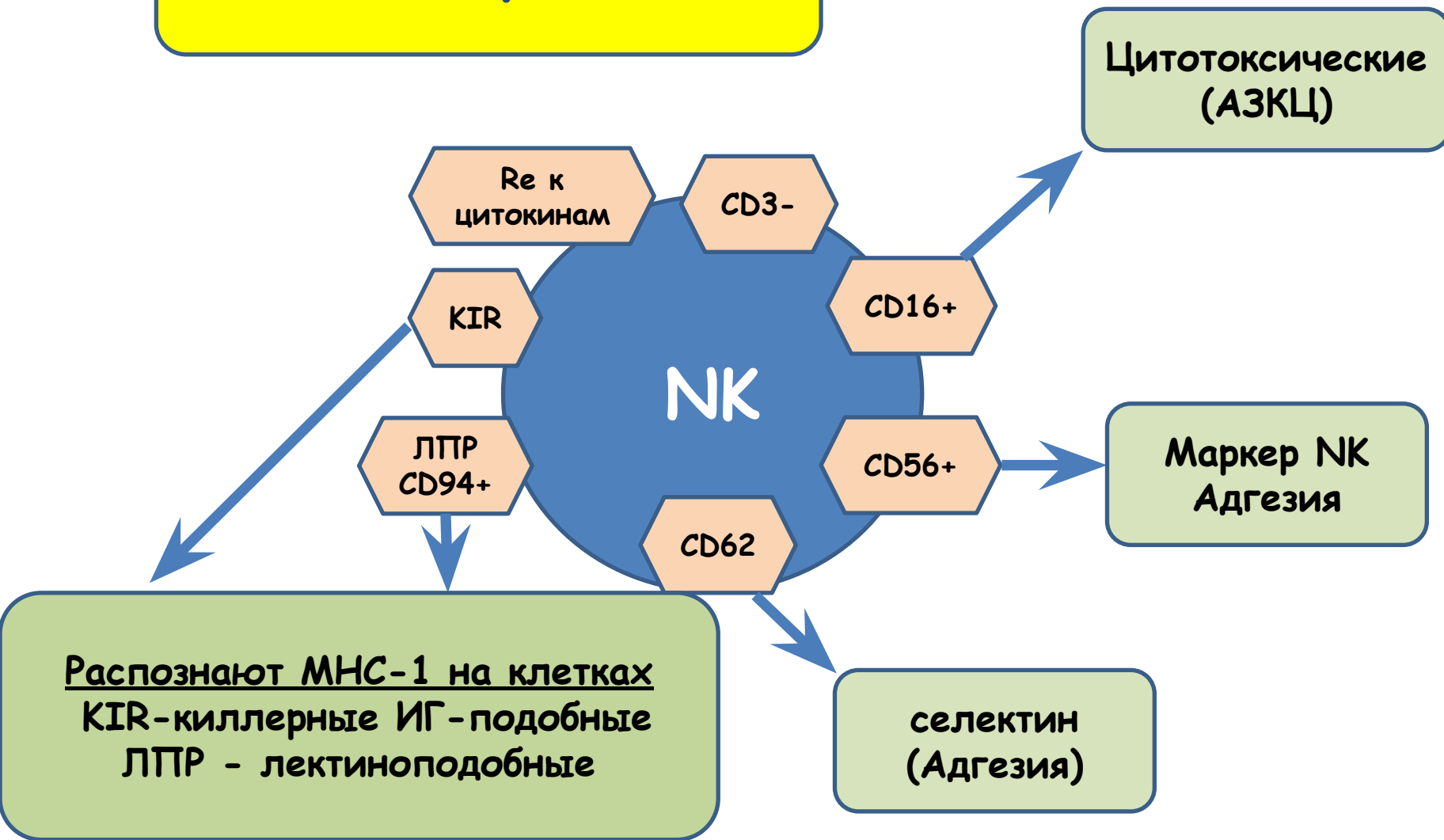


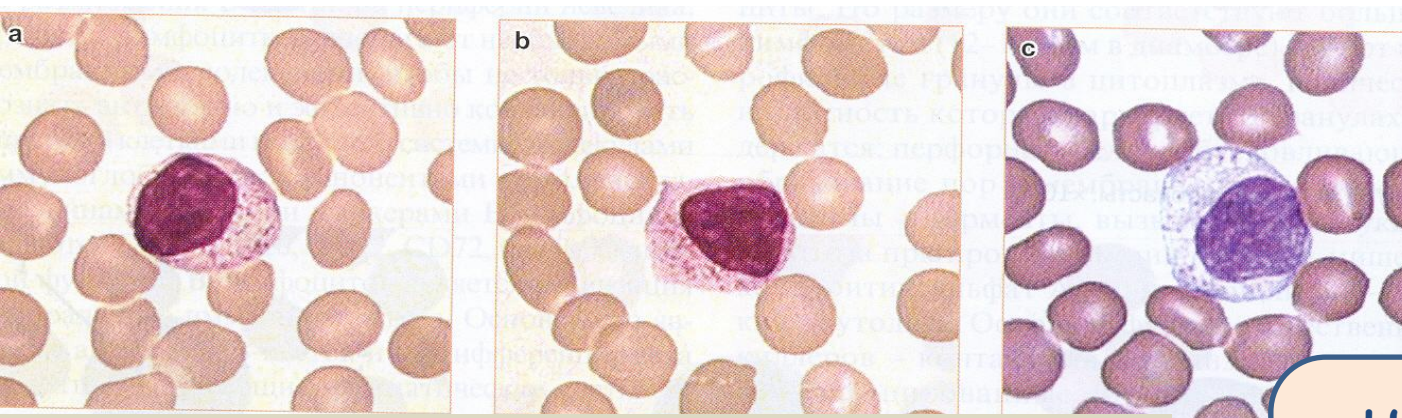
Развитие НК-лимфоцитов

Содержание НК в популяциях лимфоцитов различных органов



Рецепторы NK



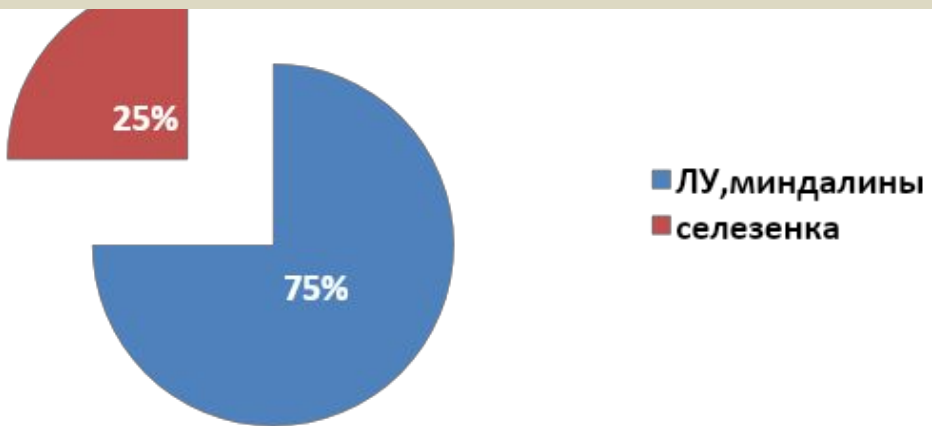


**NK в периферической крови
(90% от всех NK)**

**NK
CD56+
CD16-**

**Низкая плотность
CD56+
Высокая плотность
CD16+**

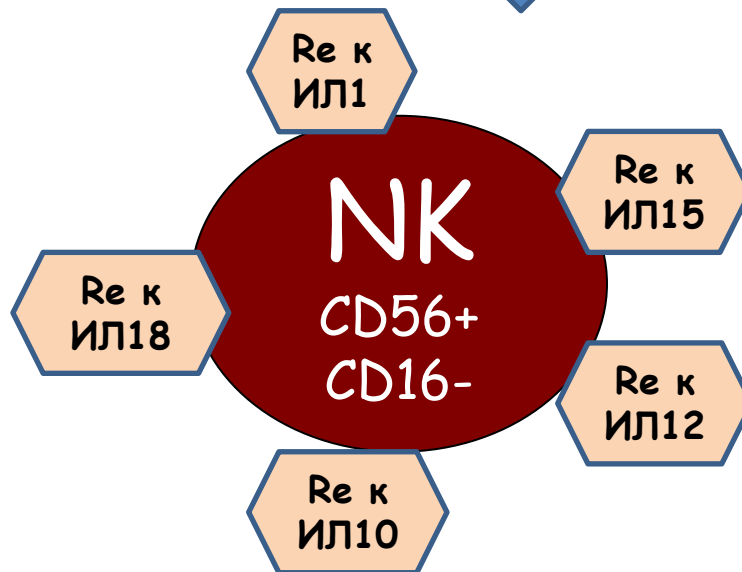
**Содержание NK в лимфоидных органах
(10% от всех NK)**



**NK
CD56-
CD16+**

**Высокая плотность
CD56+
Низкая плотность
CD16+**

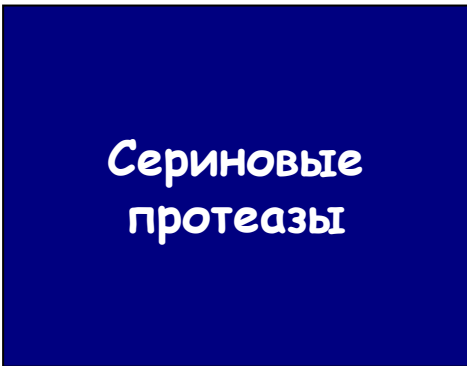
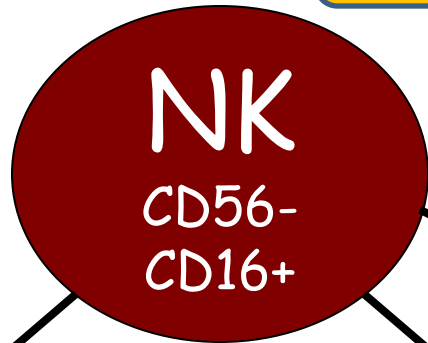
МОНОКИНЫ



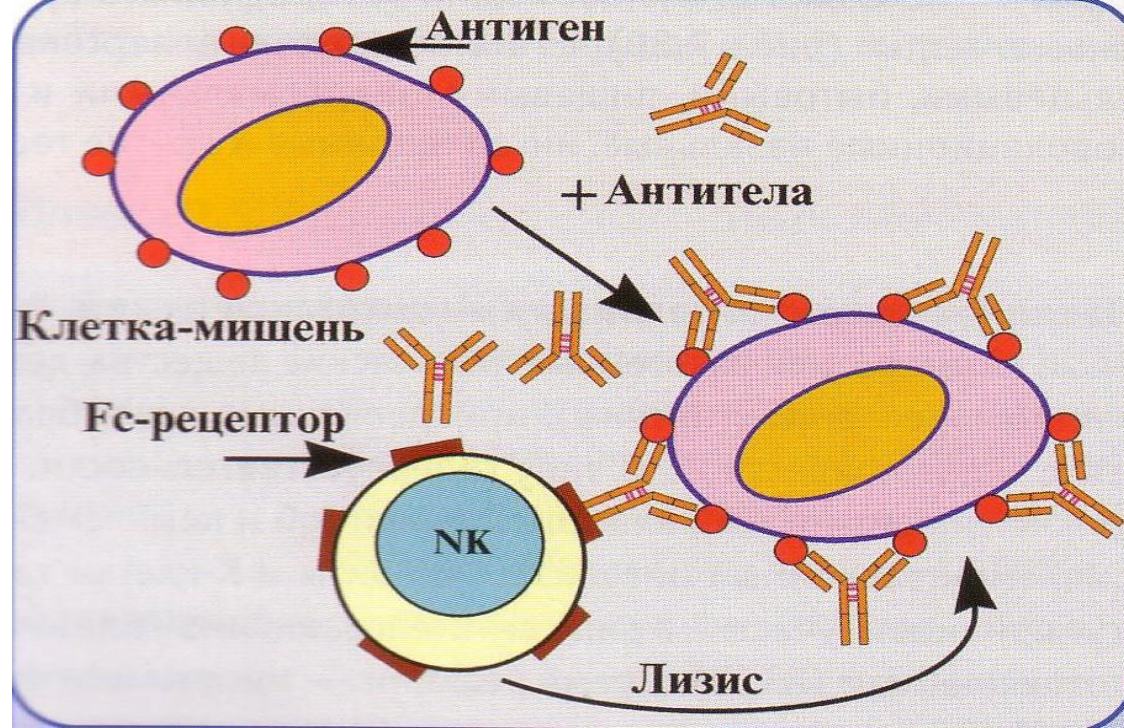
Усиленная секреция
ИФН-гамма, ФНО-альфа,
ГМ-КСФ, ИЛ10, ИЛ13

Гуморальные костимулирующие функции NK на ранних этапах инфекционного процесса, когда еще отсутствует адаптивный ответ

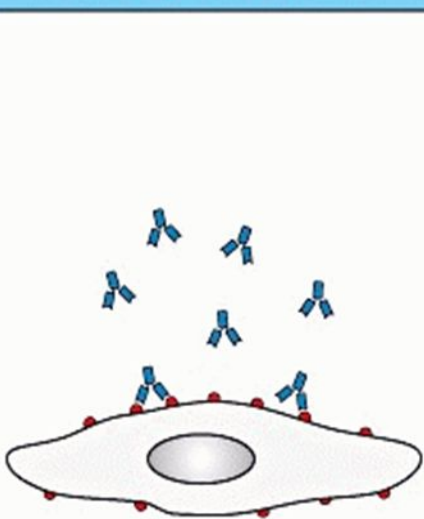
Гуморальные цитотоксические факторы
CD56-CD16+ NK-клеток



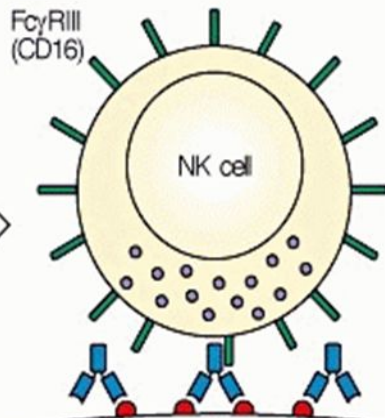
Цитотоксическая функция NK-клеток



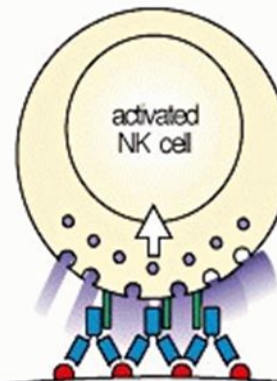
Antibody binds antigens on the surface of target cells



Fc receptors on NK cells recognize bound antibody



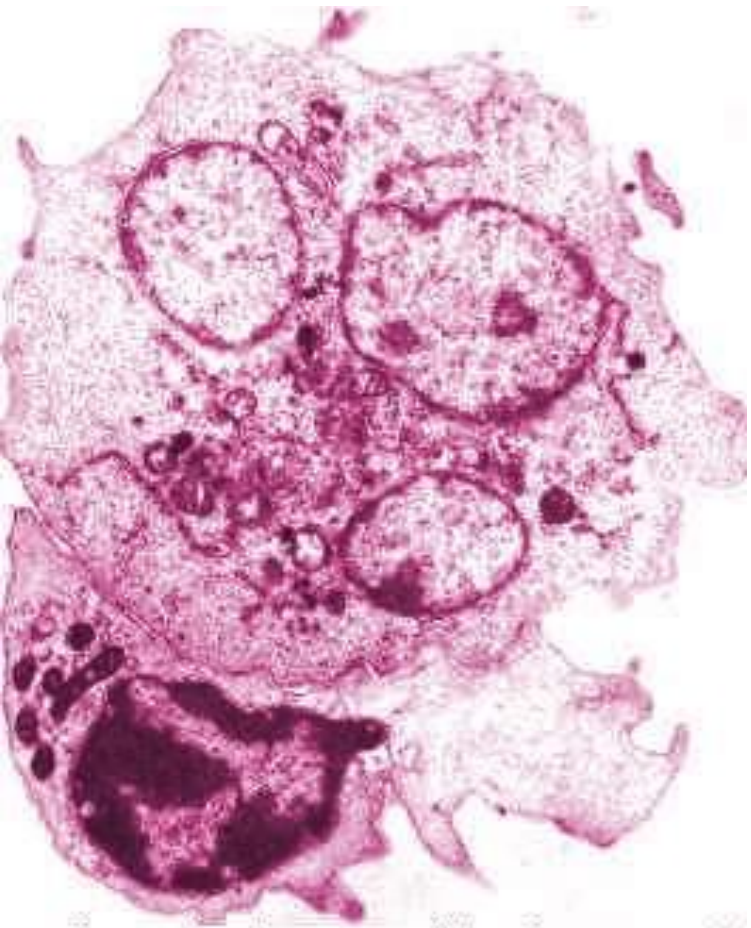
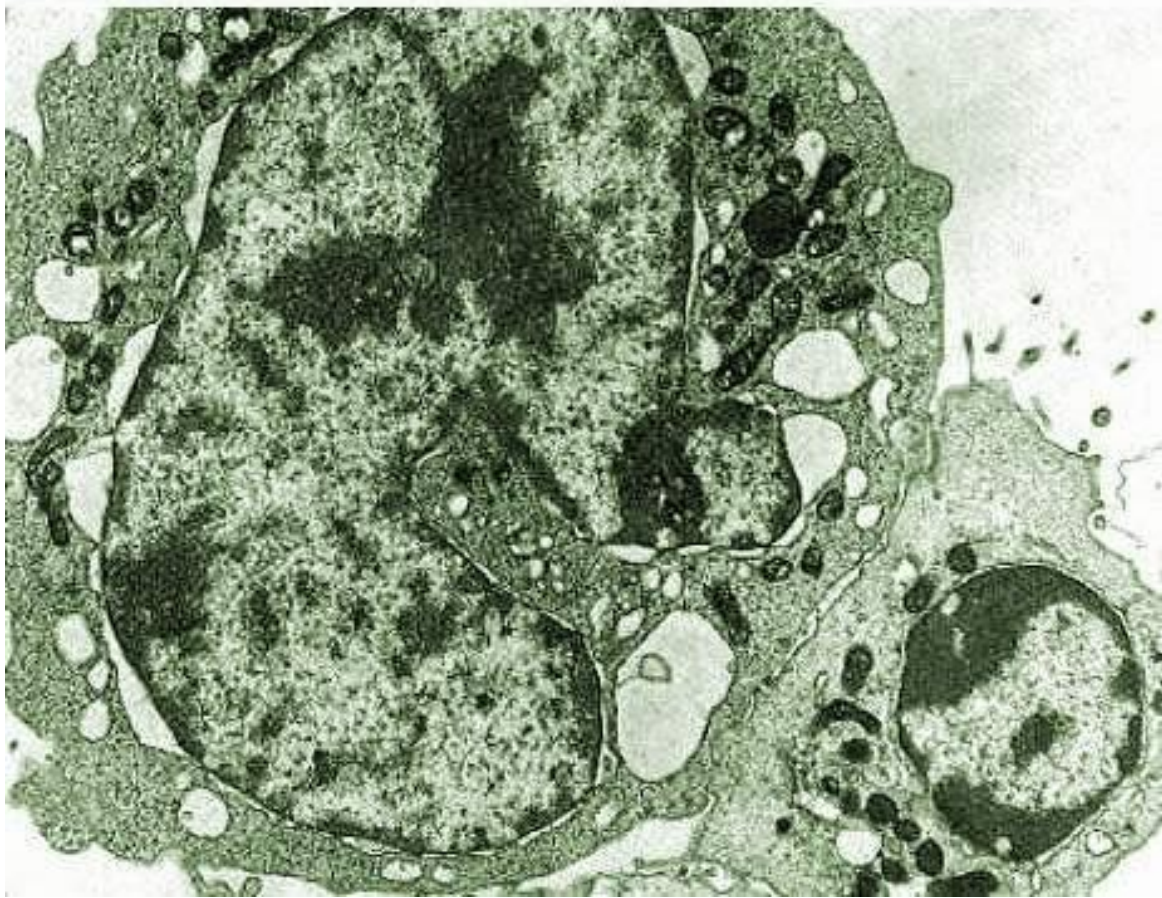
Crosslinking of Fc receptors signals the NK cell to kill the target cell



Target cell dies by apoptosis and/or membrane damage



Активированная NK-клетка (справа) атакует опухолевую клетку (слева)



АЗКЦ: К-клетка (внизу) атакует клетку-мишень (сверху), на поверхности которой фиксировано антитело

Заболевания и состояния, приводящие к изменению количества CD16-лимфоцитов в крови

| Увеличение | Снижение |
|---|--|
| Активация антитрансплантационно го иммунитета Криз отторжения донорских органов Бронхиальная астма | Онкологические заболевания Воричные ИДС ВИЧ-инфекция Тяжелые вирусные инфекции Ожоги, травмы, стресс Лечение цитостатиками и иммунодепрессантами Ионизирующее облучение Лечение глюкокортикоидами |

Исследование функций NK-лимфоцитов

- Оценивают при использовании в качестве клеток-мишеней разных линии трансформированных клеток, чувствительных к действию NK-лимфоцитов.
- Разрушение клеток-мишеней осуществляется лишь при образовании тесного контакта с NK-лимфоцитами.
- Антителозависимую клеточную цитотоксичность оценивают, используя клетки-мишени, покрытые антителами класса IgG. Снижение цитотоксической активности NK-лимфоцитов выявляется при многих заболеваниях, в том числе при злокачественных новообразованиях, а отсутствие наблюдается крайне редко.