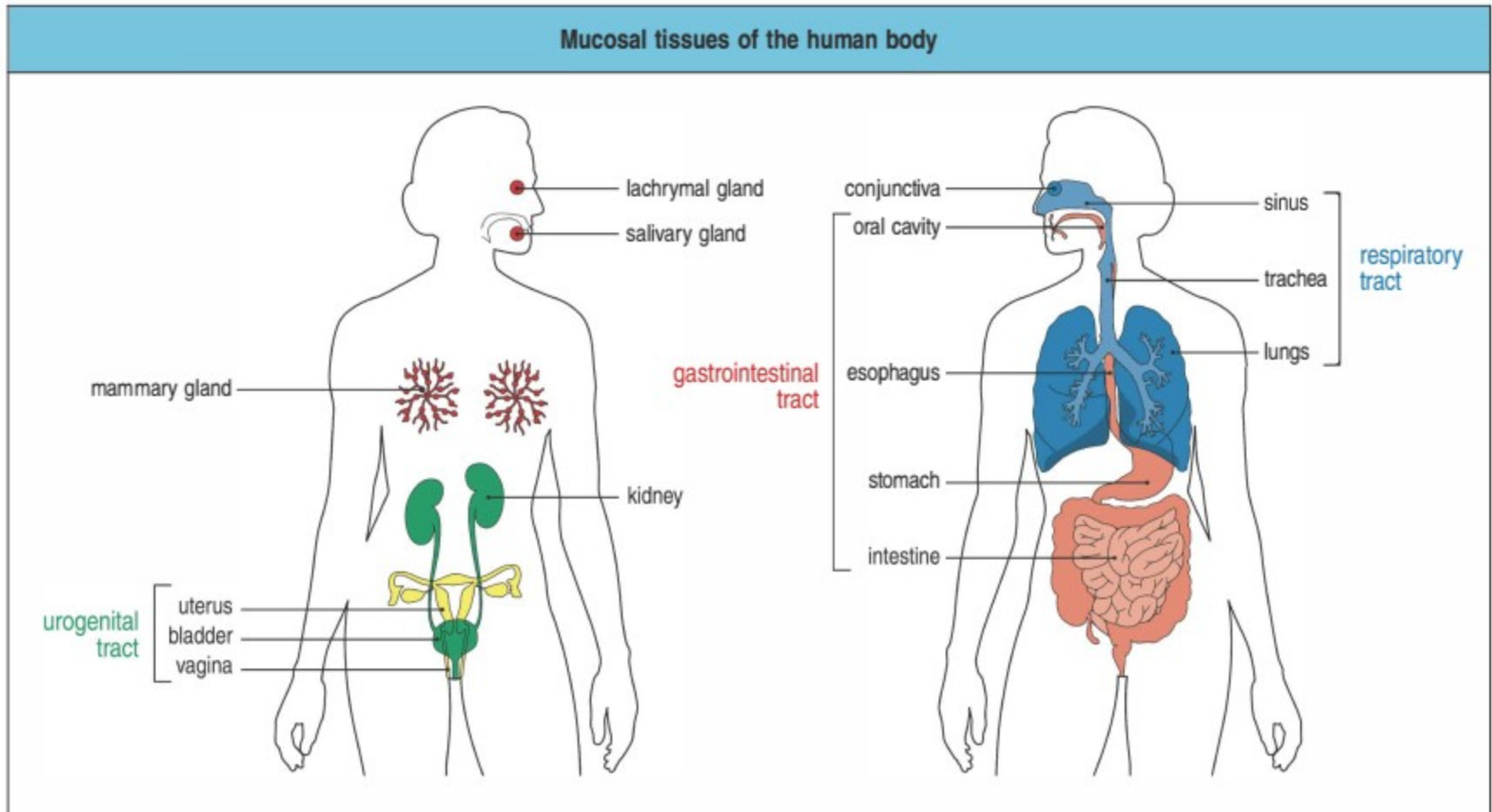


Slizniční a kožní imunita

Slizniční povrchy

- Oddělení vnějšího prostředí od vnitřního prostředí člověka
- Slizniční povrchy jsou zodpovědné za resorpci živin, výměnu plynů x obrovské množství podnětů (složky potravy, fyziologická mikroflóra, indiferentní mikroflóra, enviromentální podněty)
– nesmí dojít ke vzniku imunitní odpovědi
- X patogenní mikroby – nutná imunitní reakce – eliminaci patogenů – reparace poškození

SPOLEČNÝ IMUNITNÍ SYSTÉM SLIZNIC



Mukózní imunitní systém – MALT (Mucosa- Associated Lymphoid Tissue)

- GALT – Gut- Associated Lymphoid Tissue – slizniční imunitní systém trávicího traktu
- BALM – Bronchus-Associated Lymphoid Tissue- slizniční imunitní systém dýchacího traktu
- NALT- Nasal – Associated Lymphoid Tissue – nasální imunitní systém
- Močopohlavní slizniční imunitní systém
- Oko, slinné žlázy, střední ucho

Regionalizace imunitního systému

TABLE 13–1 Features of Regional Immunity

Region	Special Challenges	Special Anatomic Features	Specialized Cells or Molecules: Functions
Gastrointestinal tract	Tolerance of food antigens Tolerance to commensal microbiota but responsive to rare pathogens Enormous surface area	Tonsils Peyer's patches, lamina propria follicles	Intestinal epithelial cells: mucus secretion M cells: luminal antigen sampling Paneth cells: defensin production Secretory IgA, IgM: neutralization of microbes in the lumen DC subsets: luminal antigen sampling; lamina propria antigen sampling; T cell tolerance induction; effector T cell activation; induction of B cell IgA class switching; imprinting gut-homing phenotypes of B and T cells
Respiratory system	Exposure to mix of airborne pathogens and innocuous microbes and particles	Adenoids	Ciliated respiratory epithelial cells: mucus and defensin production and movement of mucus with trapped microbes and particles out of airways Secretory IgA, IgM, IgG: neutralization of microbes outside epithelial barrier
Cutaneous immune system	Large surface area	Keratinizing stratified squamous epithelial barrier	Keratinocyte: keratin production, cytokine and defensin secretion Langerhans cell: epidermal antigen sampling DC subsets: dermal antigen sampling; T cell tolerance induction; effector T cell activation and imprinting skin-homing phenotype

Regionalizace imunitního systému

TABLE 13–2 Numbers of Lymphocytes in Different Tissues

Spleen	72×10^9
Bone marrow	50×10^9
Blood	10×10^9
Skin	20×10^9
Gastrointestinal tract	50×10^9

Data from Clark RA, B Chong, N Mirchandani, NK Brinster, K Yamanaka, RK Dowkier, and TS Kupper. The vast majority of CLA⁺ T cells are resident in normal skin. *Journal of Immunology* 176:4431-4439, 2006; Ganusov AA and De Boer RJ. Do most lymphocytes in humans really reside in the gut? *Trends in Immunology* 28:514-518, 2007.

Každý regionální imunní systém má

- Vlastní unikátní anatomii zahrnující sekundární lymfoidní tkáň
- Zahrnuje speciální typy buněk a molekul, které se zřídka vyskytují v jiných místech (Langerhansovy buňky v kůži, M buňky ve střevě, Tg,d v epitelu, B lymfocyty produkující IgA v mukóze)
- Vlastní imunoregulační mechanismy

SLIZNICE A KŮŽE (EPITELEM KRYTÉ POVRCHY)

- Povrch sliznic zažívacího traktu..... 200 m²
- Povrch dýchacího traktu..... 80 m²
- Povrch kůže 2 m²
- Podněty: potrava ~ tuny
mikrobiota 10¹⁴ bakterií
antigeny ve vzduchu
- Obměna epitel. buněk střeva 10¹¹/den
- Produkce IgA (převyšuje ostatní isotypy)... 5-9g/den
- 90% infekčních agens vstupuje sliznicemi
- 80% imunologicky aktivních buněk organismu je ve sliznicích

Slizniční imunitní systém gastrointestinálního traktu GALT

- Difúzně rozptýlené lymfoidní buňky střevní sliznice
- Agregáty lymfoidních buněk v mukózní vrstvě
- Peyeroovy pláty
- Apendix
- Mezenterické lymfatické uzliny
- Játra

Imunita gastrointestinálního systému

2 základní charakteristiky:

Mukóza tenkého a tlustého střeva – větší než 200m² (velikost tenisového kurtu)

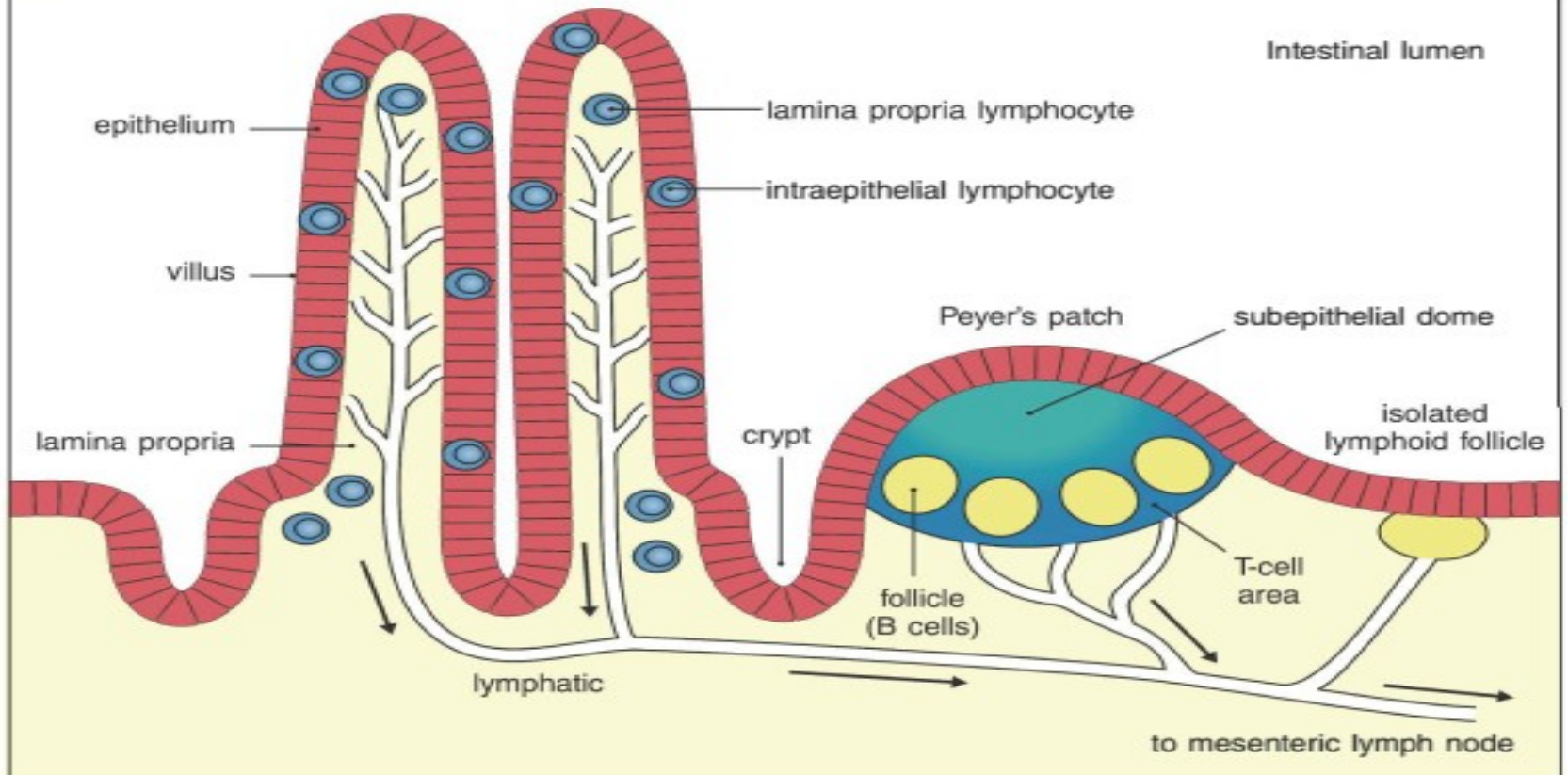
500 různých druhů bakterií – dohromady 10¹⁴ buněk – 10x více než buněk člověka

Soustředěno okolo 80% imunokompetentních buněk těla – největší lymfytický orgán) spolu s kůží

Intestinal lymphocytes are found in organized tissues where immune responses are induced, and scattered throughout the intestine, where they carry out effector functions

Scattered lymphoid cells

Organized lymphoid tissues



Buňky střevního epitelu

Vznikají diferenciací multipotentní kmenové buňky:
4 typy buněk:

Enterocyty, kolonocyty v tlustém střevě
rychlá obměna - 18 h

Pohárkové buňky - granula mucinu produkují hlen

Panethovy buňky - na dně krypt tenkého střeva,
sekreční granula - defensiny, žijí 20 dní

M- buňky - v epitelu kryjícím lymfatické folikuly

Buňky střevního epitelu

- Epitelové buňky
 - Součást fyziologických bariér: pevné spojení epitel. buněk, tvorba hlenu, rychlá obnova slizniční vrstvy
 - Krátce žijící, 3-5 dní, rychlá obměna
 - Mikrob, který pronikl do epitelové buňky, nemůže invadovat do podslizniční vrstvy díky rychlému odlučování buněk
 - Udržování střevní homeostázy regulací absorpce vody, elektrolytů a živin
 - Povrch buněk chráněn a muciny - tvorba hlenu a glykosaminoglykany – glykokalyx) obojí produkováno každých 6 -12 hodin
 - Schopny diskriminace mezi patogenní a nepatogenními mikroorganismy – zajištěno intracelulární lokalizací PAMP receptorů (TLR2,4,5,6,7,9; NLR receptory pro flagelin)

Buňky střevního epitelu

- Obměna je regulována mírou expozice potravním faktorům
- Podvýživa či absence potravinových podnětů vede k atrofii epitelové vrstvy
- Stimulace proliferace epitelových buněk působením mikrobiálních podnětů – výrazně omezena u bezmikrobních zvířat

Úloha epitelových buněk

- Přímá ochrana před vniknutím mikroorganismů
- Kooperace s intraepitelovými T-lymfocyty pomocí adhezivních interakcí
- Produkce humorálních složek regulujících aktivitu epitelových buněk

Epitelové buňky

- Bez aktivace nízká exprese TLR2 a TLR4
- Po aktivaci produkce prozánětlivých cytokinů: TNF alfa, GM-CSF, IL-8, zvyšování exprese TLR4
- Přítomny receptory pro IL-2 a další cytokiny
- Po aktivaci zvýšení exprese HLA-II, působením IFN- γ – produkován intraepitelovými T-lymfocyty, zvyšuje se schopnost ep. buněk prezentovat Ag
- Konstitutivně přítomna molekula CD1d – předkládání antigenů ne-proteinové povahy – např. lipopolysacharidů

Epitelové buňky střeva

- Na svém povrchu mají Fc receptory: FcγRII a FcγRIII a dále neonatální FcRn
- neonatální FcRn – přenos mateřských IgG in utero
- U dospělých přenos imunokomplexů IgG a ciz. Ag do podslizniční vrstvy – pro zpracování dendritickými bb.

Pohárkové buňky

- Vytváří ve velkém množství muciny - hydratované gely skládající se z různých glykoproteinů
- Funkce mucinů: lubrikace a ochrana střevních klků
- Interakce s lysozymem a sekrečními imunoglobuliny
- Hlen chrání epitelové buňky před přichycením mikroorganismů

Panethovy buňky

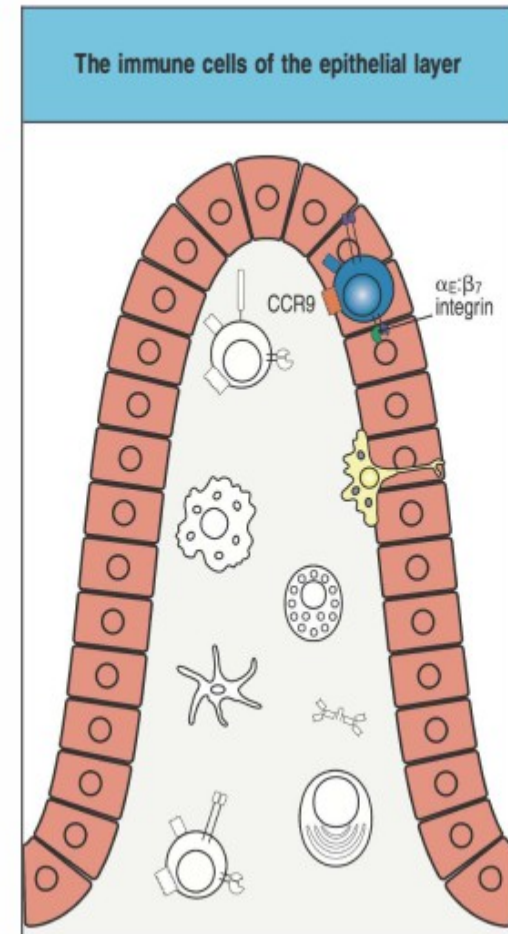
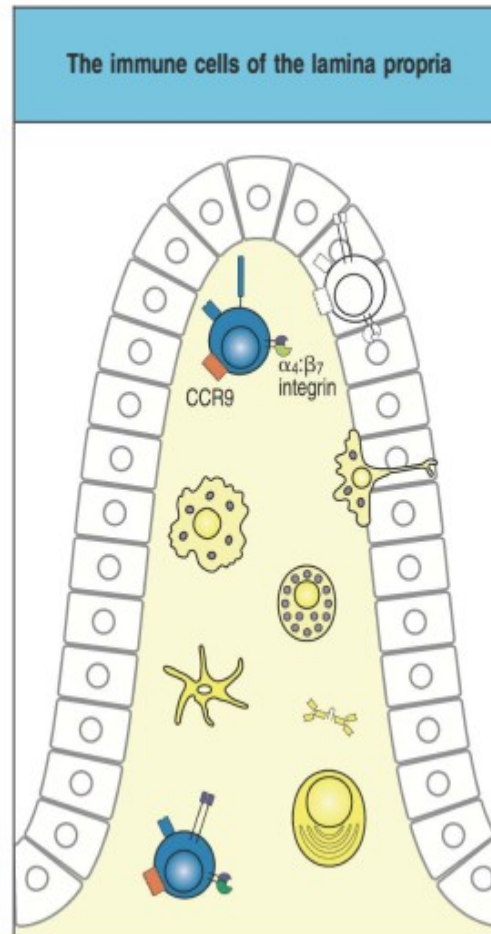
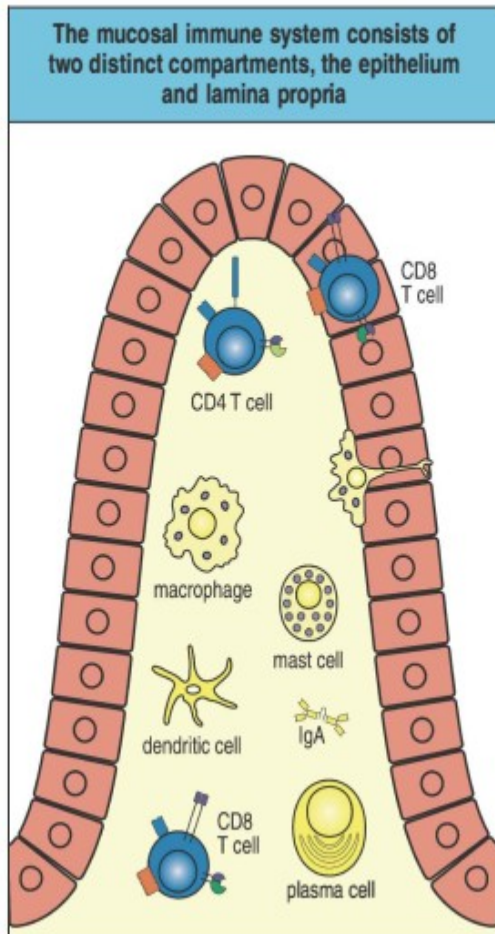
- Sekreční epitelové buňky
- Produkce lysozymu, fosfolipázy A
- Produkce defenzínů – vazba na mikrobiální membrány s velkým obsahem záporně nabitých fosfolipidů a působí mikrobicidně (*Listeria*, *Esherichia*, *Salmonella*, *Candida Albicans*)
- Lokalizovány v blízkosti proliferujících kmenových buněk, které chrání před mikrobiálním poškozením

Intraepiteliální T lymfocyty

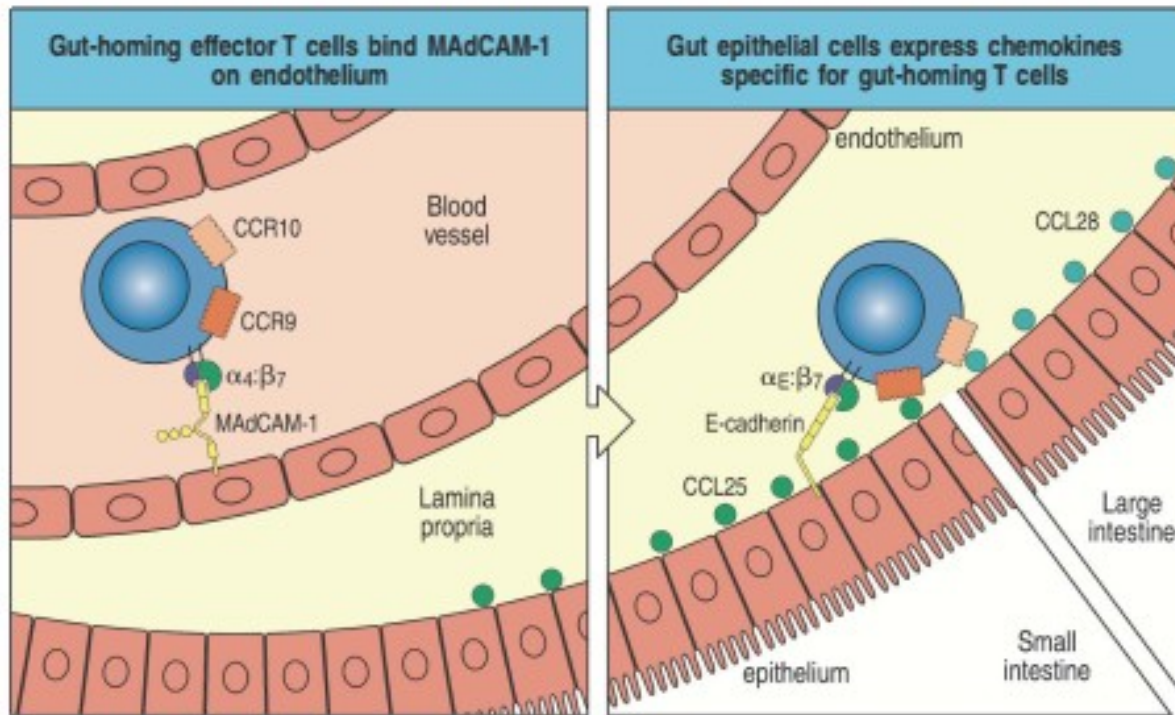
- Lokalizovány zejména v klcích tenkého střeva
- Tc lymfocyty (CD3+8+), působí cytotoxicky – granzym nebo vazbou přes Fas-FasL na infikované nebo nádorově změněné epiteliální bb.
- 75% exprimuje receptor $\alpha\beta$ oligoklonálního charakteru
- Regulace nežádoucích reakcí proti potravinovým Ag
- 25% exprimuje receptor $\gamma\delta$ – sekrece cytokinů důležitých při hojení epitelii

Epiteliální T-lymfocyty a lamina propria

T-lymfocyty



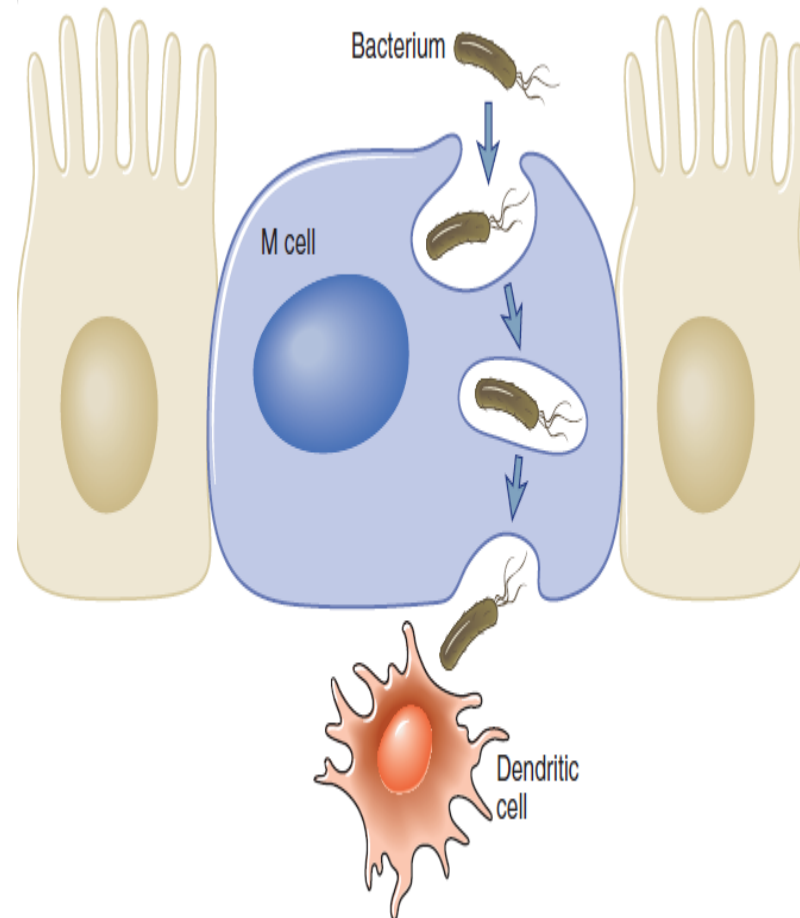
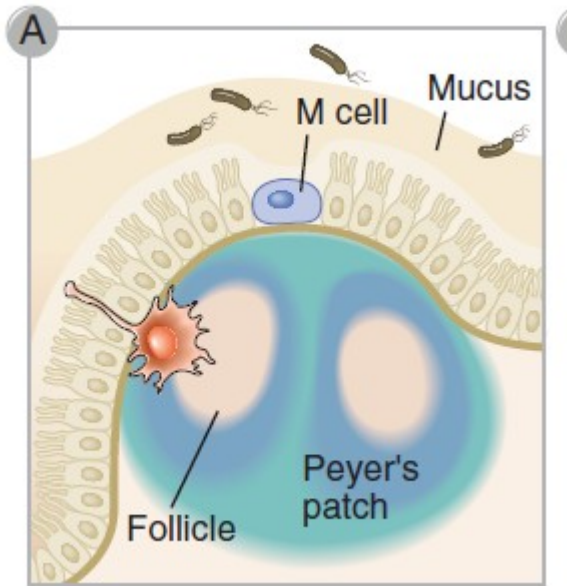
Homing tkáňově specifických T-lymfocytů



M - BUŇKY V EPITELU KRYJÍCÍM LYMFATICKÉ FOLIKULY

- Epitelové buňky s nízkým nebo chybějícím kartáčkovým lemem, minimální glykokaalyx, bez lysozomálních struktur, basolaterálně výběžky
- Funkce: transport antigenů do lymfatického folikulu
- Počet: 1/100 - 1/1000 konvenčních enterocytů

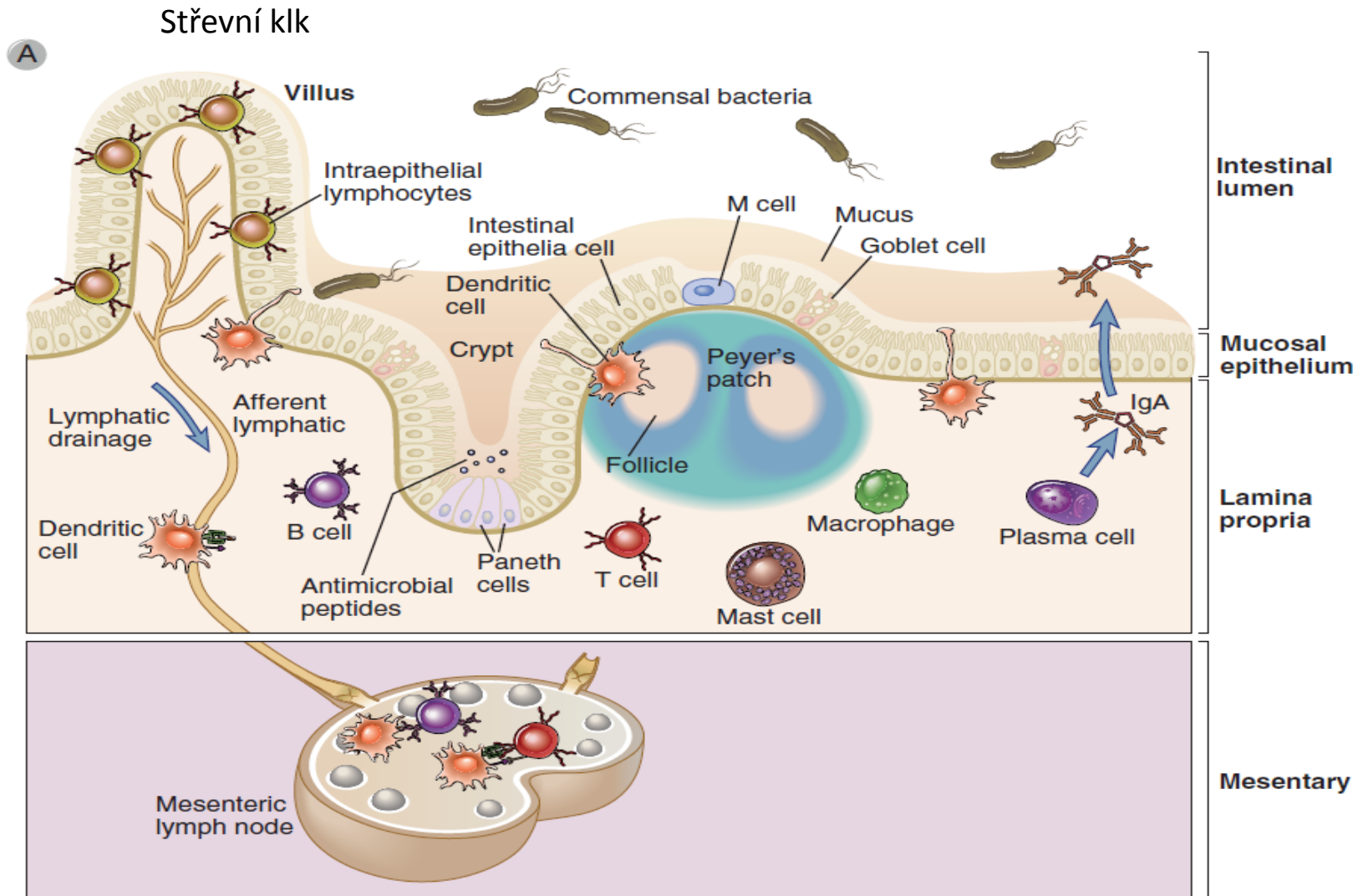
Epteliální M buňky – transport Ag přes slizniční povrch



Lymfoidní folikuly

- Organizovaný lymfoidní systém
- V epiteliální vrstvě sliznic nebo těsně pod touto vrstvou
- Peyerovy plaky – tvořeny více než 100 folikulů s centrální zónou složenou z lymfocytů B a menším počtem lymfocytů T
- Uprostřed jsou folikulární dendritické buňky, dendritické buňky a makrofágy
- V interfolikulární oblasti se nacházejí venuly s vysokým epitelem – exprese adhezivních molekul – zachycení lymfocytů z oběhu

Gastrointestinální imunitní systém



„Homing“ lymfocytů

- Řízená migrace a usazování se lymfocytů u určitých tkáních imunitního systému.
- Je závislá na expresi adhezivních molekul označovaných jako **homingové receptory** na lymfocytech.
- Na endoteliích cílových tkání jsou exprimovány příslušné ligandy pro tyto receptory, označované jako **adresiny**.

Venuly s vysokým endotelem

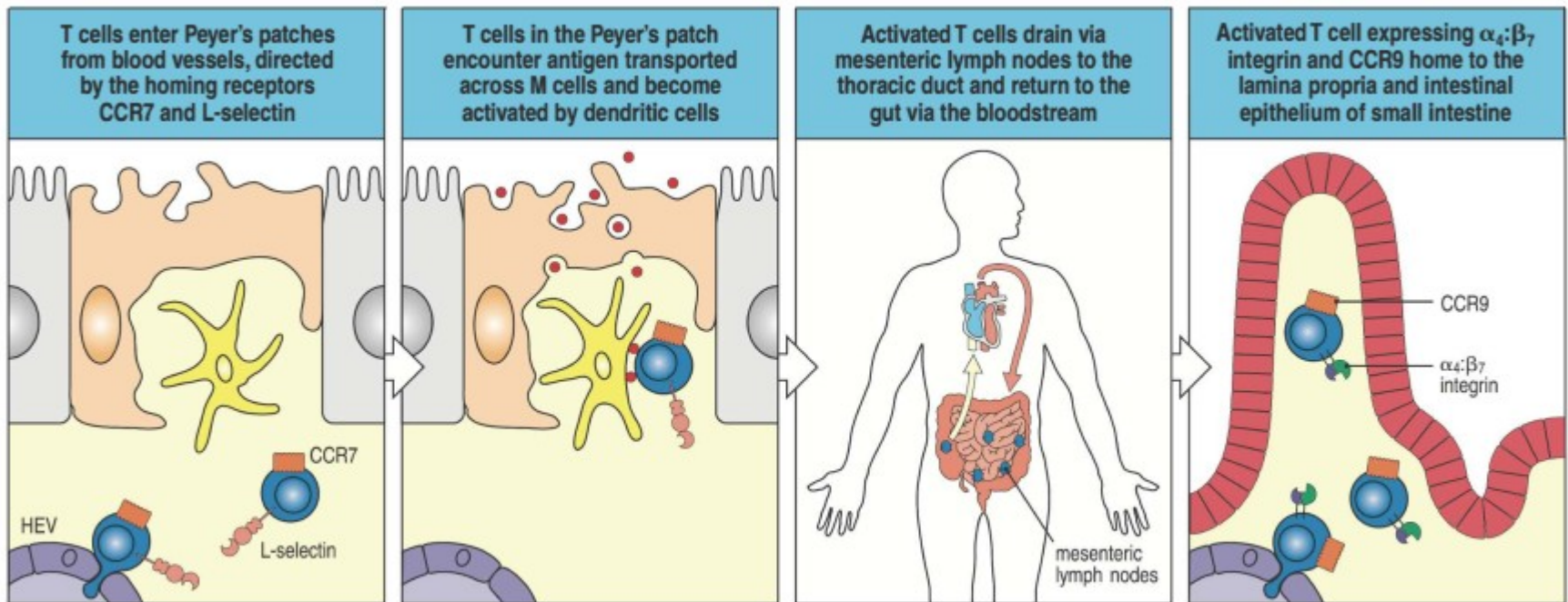
(High endothelial venules)

- Specializované venuly, místem kde lymfocyty pronikají z krevního oběhu do stromatu lymfatických uzlin nebo do slizničního imunitního systému.
- Jsou na nich adhezivní molekuly umožňující vazbu zejména „naivních“ (panenských) T-lymfocytů.

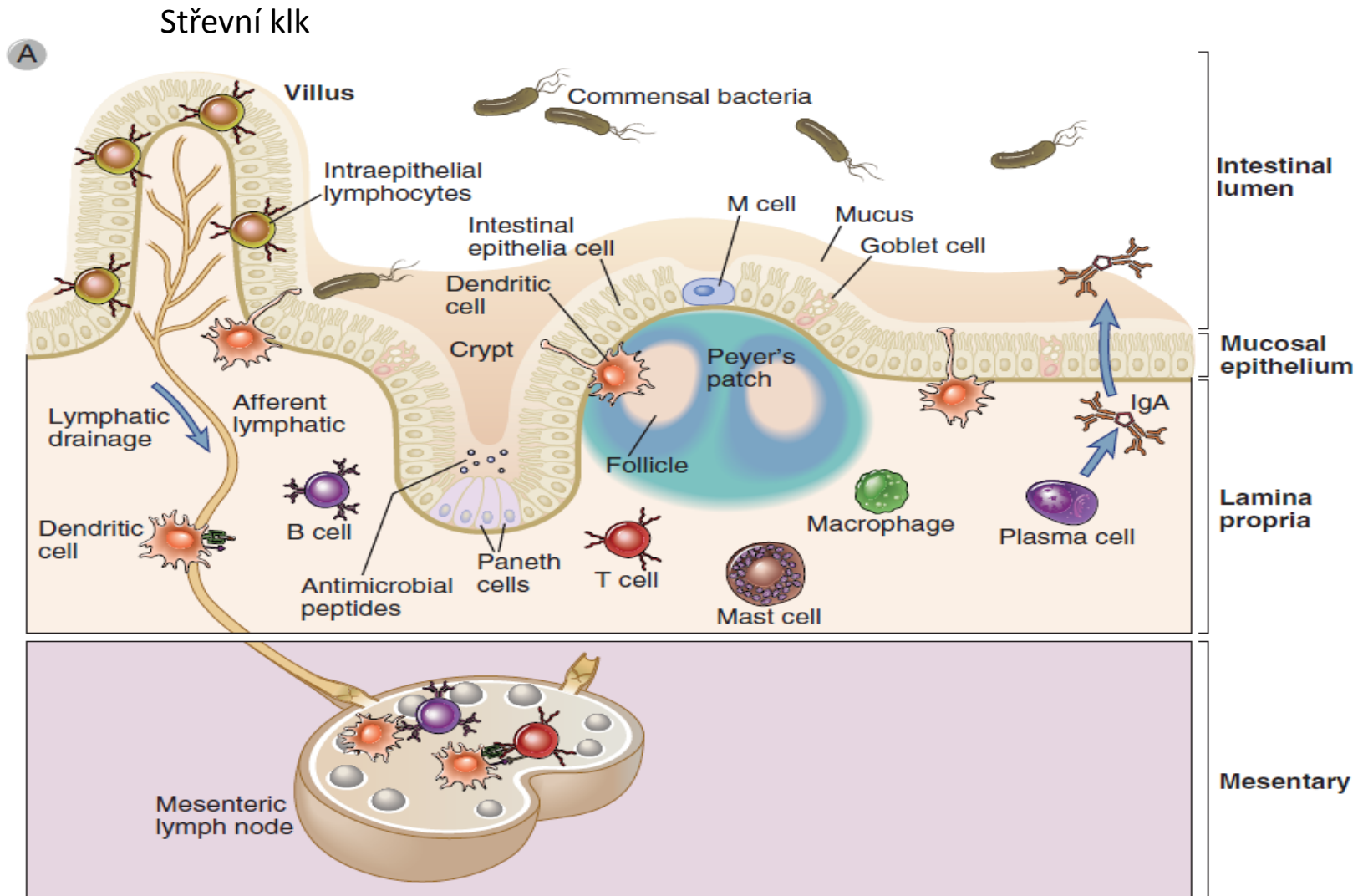
Cesty T-lymfocytů

$\alpha_4\beta_7$ integrin se váže na mukózní vaskulární adresin MAdCAM-1 na endoteliálních buňkách

CCR9 se váže na CCL25 na střevní epitelové buňky



Gastrointestinální imunitní systém



Indukce imunitní odpovědi na střevní sliznici

- M-buňky lokalizovány v tenkém střevě, v oblasti zvané Peyeroovy plaky
- Před M- buňky prostupují, makromolekuly částice, mikroorganismy
- Pod nimi se nachází lymfoidní folikul tvořený velkými lymfocyty a APC
- Dále velký počet paměťových B-lymfocytů stimulovaných Ag

Indukce imunitní odpovědi na střevní sliznici

- Mnoho folikuly jsou v lamina propria rozptýleny:
- CD4+T-lymfocyty, které sousedí s venulemi tvořenými vysokým endotelem
- Fibroblasty – podílejí se na diferenciaci epitel. buněk
- Makrofágy a dendritické buňky – zdroj cytokinů
- Den. bb. nejsou plně vyztřálé, po stimulaci dozrívání a přenos Ag do příslušných lymfatických uzlin

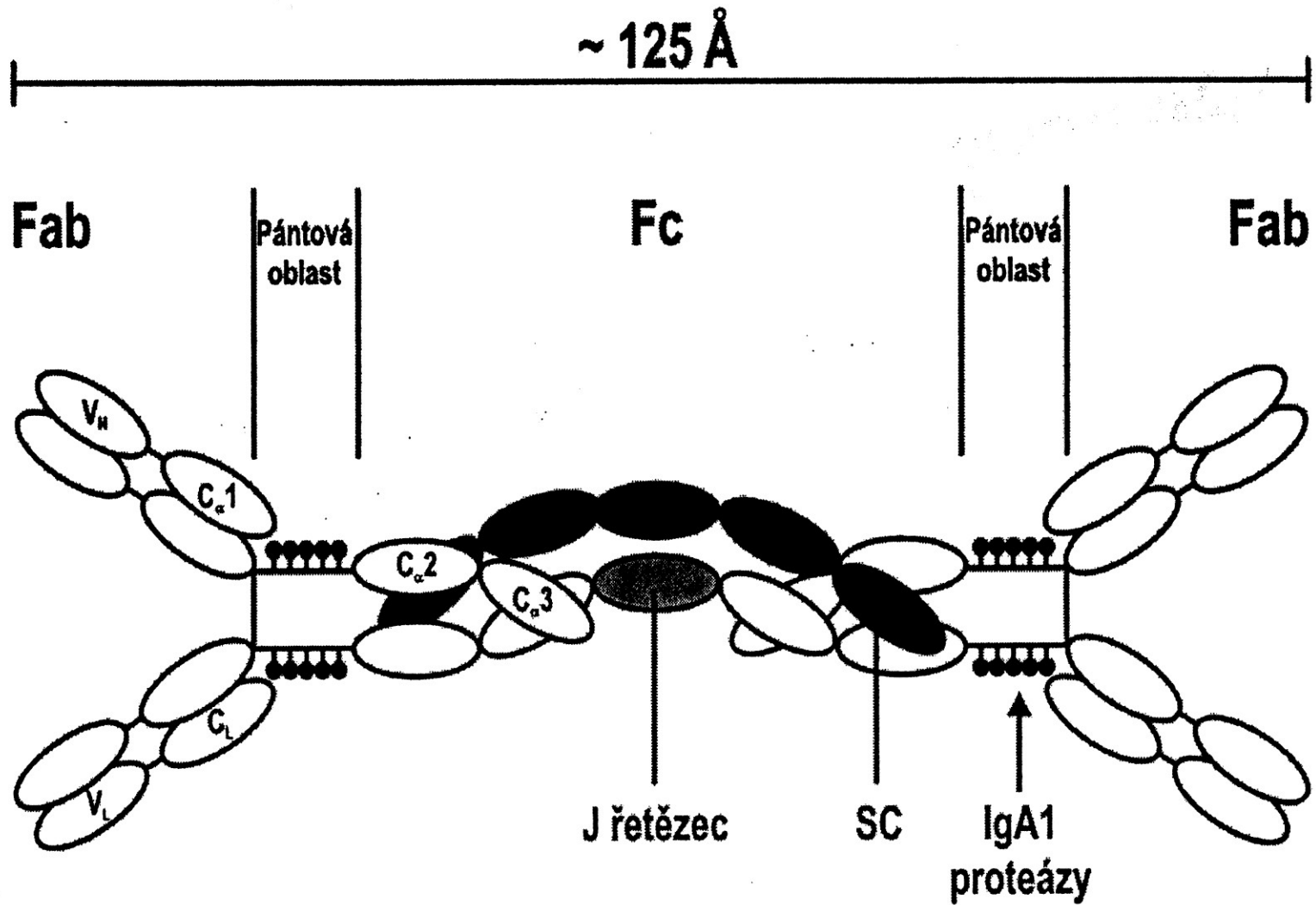
Dendritické buňky sliznic

- Rozdělení do dvou subsetů DC-1 a DC-2
- DC-1 -stimulace infekčním Ag ve vysoké koncentraci – aktivace T-lymfocytů do Th1 (IFN- γ a cytotoxické mechanismy)
- DC-2 –stimulace nízkými dávkami Ag – za fyziologických podmínek – aktivace lymfocytů do Th2 (IL-2,4 a 13) a Tr – produkce cytokinů IL-10 a TGF β
- Výsledek aktivace B-lymfocytů k produkci IgA

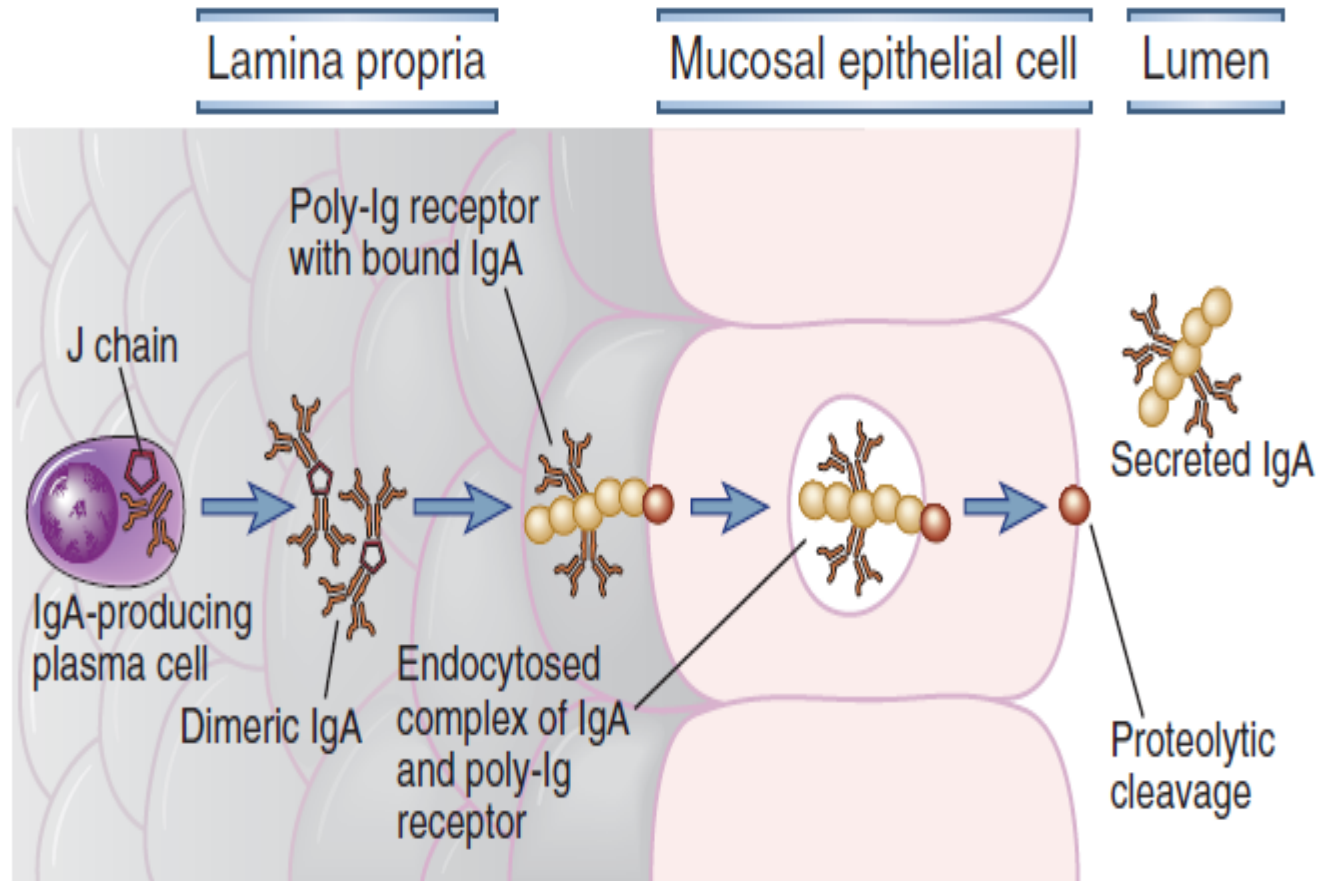
Humorální mechanismy slizničního imunitního systému – role IgA

- Produkován B-lymfocyty a plazmatickými buňkami v submukózních vrstvách
- Transport přes epteliální buňku na slizniční povrch - **transcytóza**
- Váže se na transportní Fc-receptor → endocytóza a přenesení na luminární stranu buňky, tam fúzuje s membránou a část receptorové molekuly (tzv. sekreční komponenta) spolu s navázaným IgA se odštěpí
- Přenos IgA do mateřského mléka a do zažívacího traktu novorozence

Struktura molekuly sekrečního IgA



Transcytózsa



Vlastnosti a funkce sekrečního IgA

- **Produkováno v největším množství -3-5g denně**
- Odolnost vůči proteolytickým enzymům
- Neutralizace toxinů, virů a enzymů
- Inhibice adherence mikroorganismů k epitelům
- Zábрана průniku antigenu a mikrobů
- Oponizační efekt
- Protilátkami mediovaná cytotoxicita
- Intracelulární neutralizace virů v epitelových buňkách při transportu slgA (fúze vesiklů obsahujících slgA s endosomy obsahujícími antigen)
- Protizánětlivá aktivita kompetitivní vazbou na antigen (blokace IgG a IgE mediovaných reakcí)

Sekreční imunoglobuliny

- IgA – největší strukturní heterogenita
- Monomer, polymer a sekreční
- V zažívacím traktu IgA2, v dýchacích cestách IgA1
- U sekrečních výhodou polyvalence – 4 -8 vazebných míst pro Ag – vysoká avidita x nízká afinita
- Kromě IgA také IgM
- Význam v raném dětství a u selektivního deficitu IgA
- Náchylnější k proteolytickému rozkladu v lumen střeva

Antimikrobní mechanismy na sliznicích

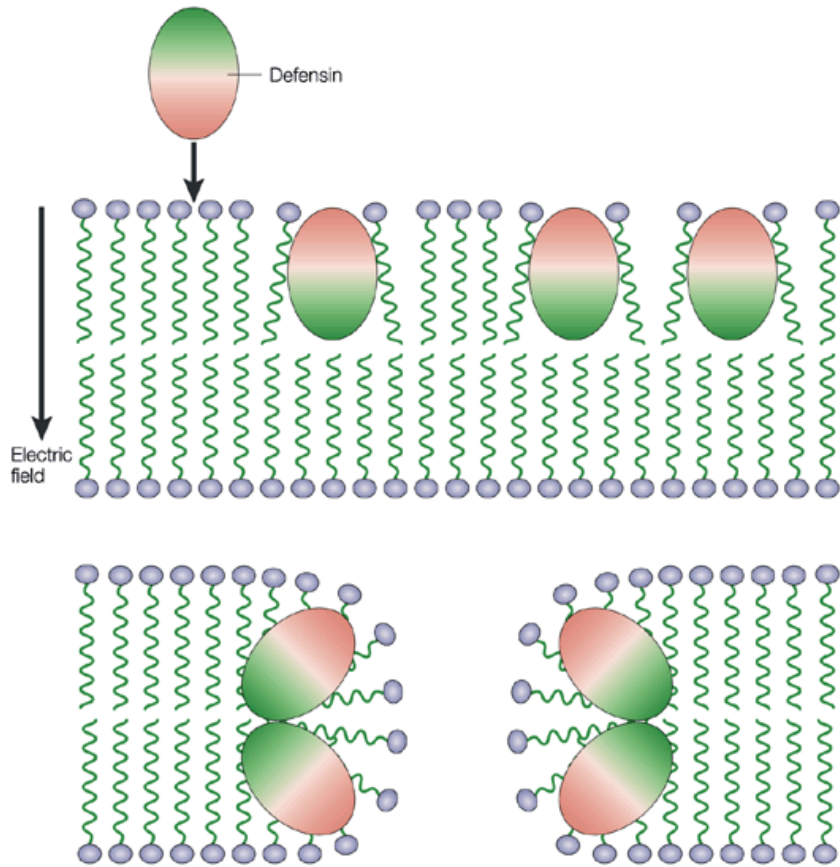
Faktor	Mechanismus
komensální bakterie	kompetice s exogenními mikroby, produkce protizánětlivých látek
těsné spoje epitelu	brání průniku bakterií
řasinky	zachytávají mikroby
mucin	zachytává bakterie
lysozym	zabíjí G+ bakterie (stěny)
laktoferin	váže železo (inhibice růstu mikrobů)
laktoperoxidas	usmrcuje bakterie (volné radikály)
antibiot. peptidy	usmrcují bakterie
sekreční Ig	blokuje adhezi bakterií k epitelu

Antimikrobní peptidy

- Cathelicidiny - kationické peptidy
neutrofilní leukocyty, některé epitelové buňky, mastocyty,
účinkují jako přirozená mikrobicidní antibiotika
- Defensiny - kationické peptidy
 - α -defensiny – neutrofily, Panethovy buňky tenkého
střeva, mají významnou roli při zánětu,
hojení ran a zasahují i do imunity získané
 - β -defensiny - epitelové buňky ústní sliznice bronchů, urogenitálního traktu,
epidermis,
 - jejich vazba na fosfolipidové membrány mikrobů vede k porušení její integrity
a k zabití
mikroba



Funkce defensinů



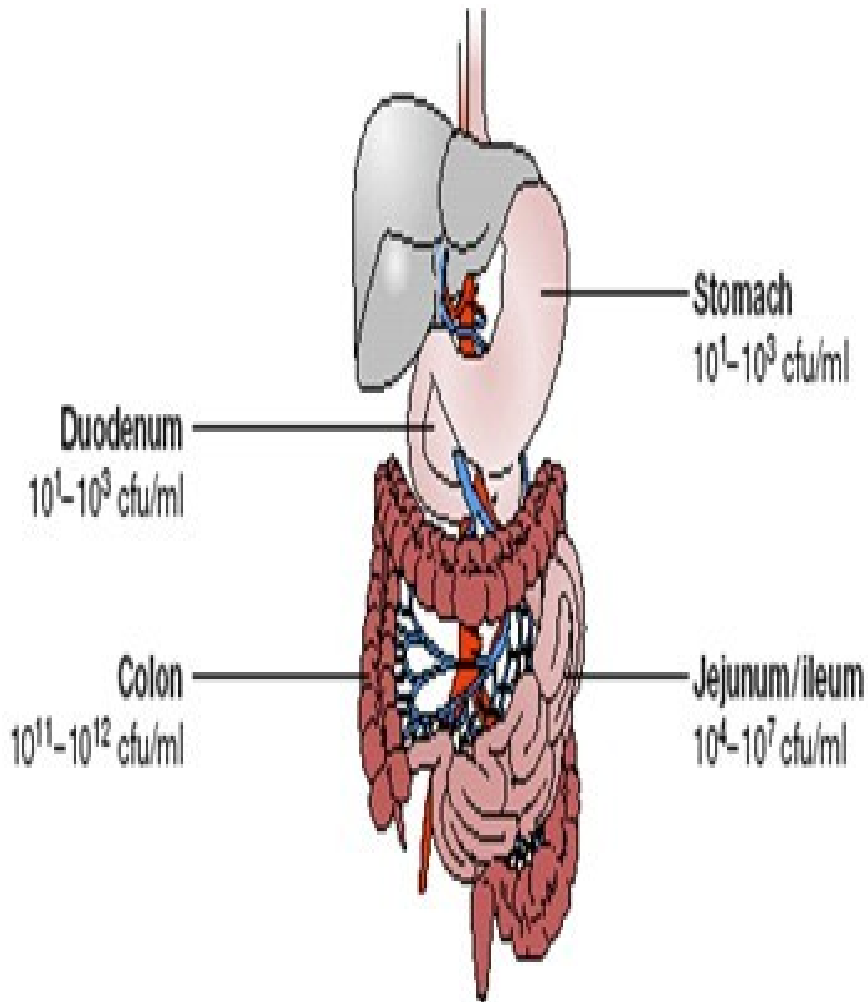
Komensální (normální) mikroflora *mikrobiota*

- $\sim 10^{14}$ bakterií, ~ 1000 druhů
~ 50% nekultivovatelných
- složitý ekosystém
- součást přirozené imunity sliznic a kůže
- vzájemné interakce mikroorganismů
kompetice-kolonizační resistance, “quorum sensing”, produkce bakteriocinů ...
- interakce s makroorganismem: symbiosa, komensalismus, patogenita, účast v metabolismu hostitele (fysiologické funkce)
- modulace imunity

Lidský mikrobiom

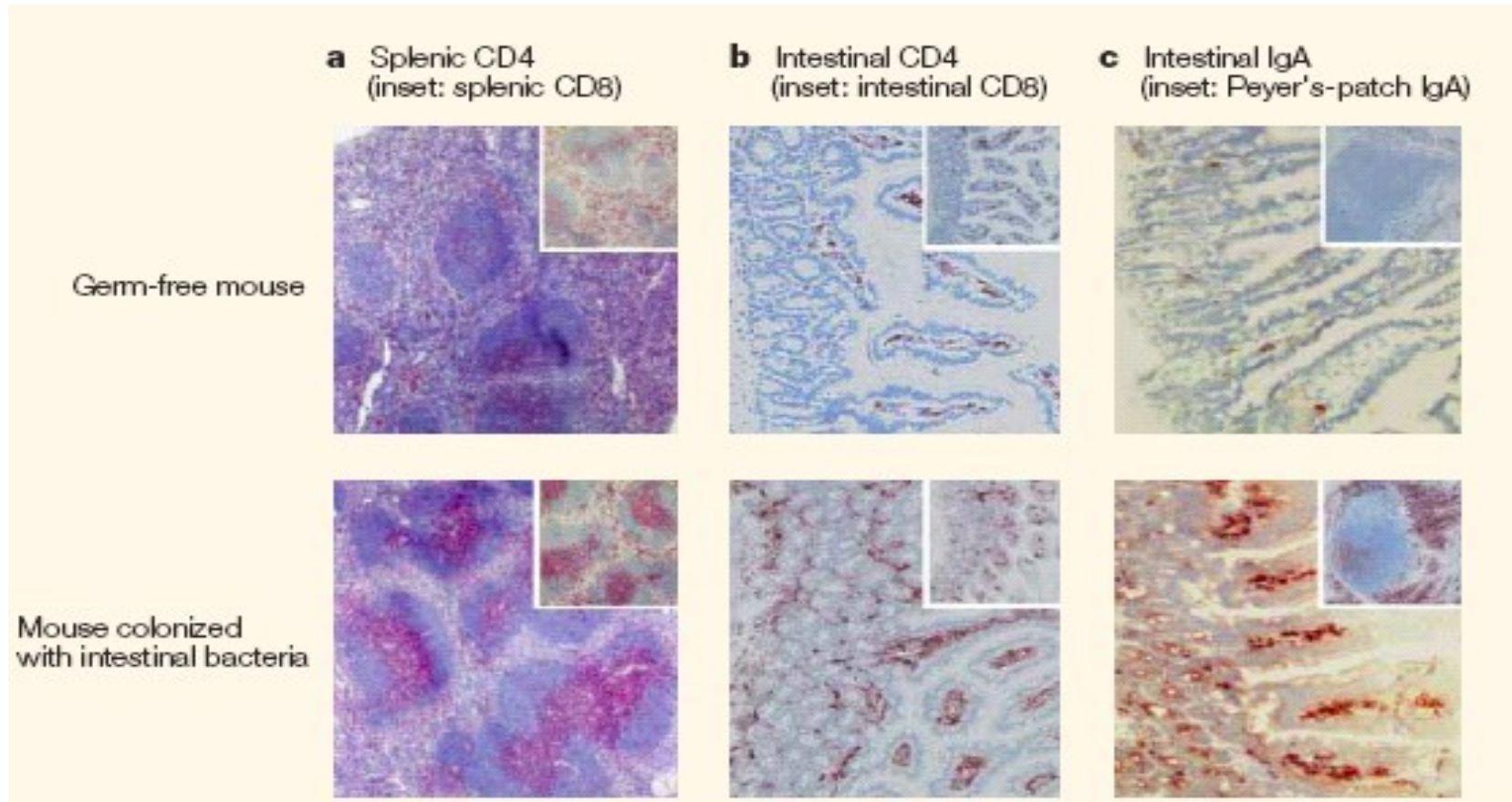
- We are a “super-organism”
- The human gastrointestinal tract hosts a vast microbiome – >1000 different species;
>majority non-culturable
- Establishes during the first week and stabilizes within the first 3-5 years of life
- Cooperative relationships have established through co-evolution to maintain homeostasis

Lidský mikrobiom



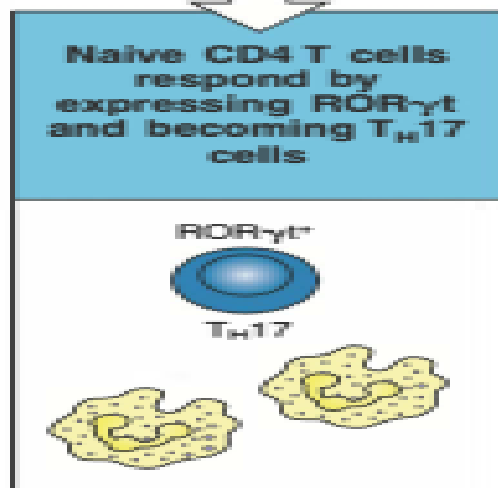
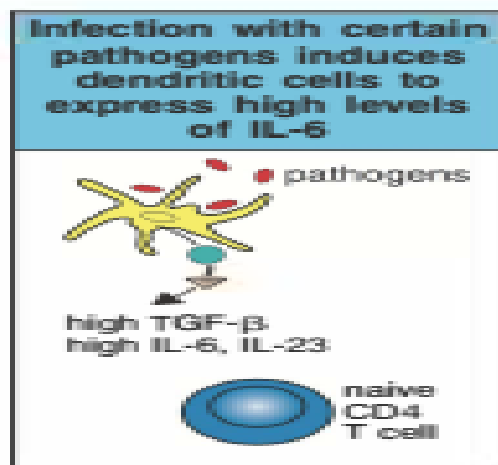
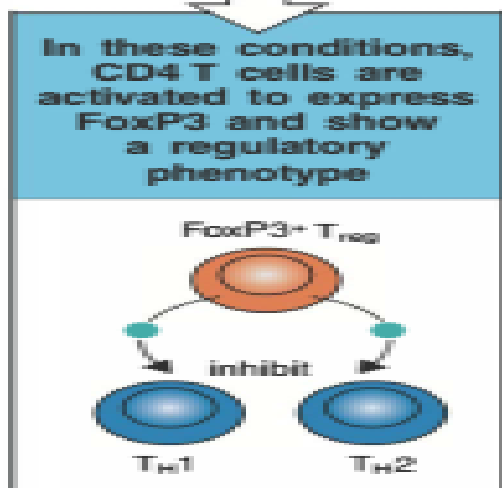
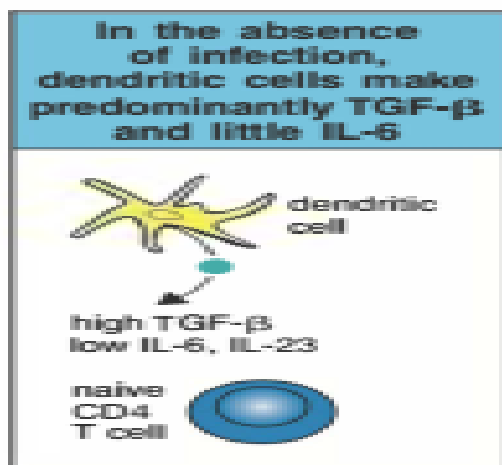
- Bacteria (~1000 species)
- Firmicutes (Ruminococcus, Clostridium, Eubacteria)
- Bacteroidetes (Bacteroides)
- Actinobacteria (Bifidobacteria)
- Proteobacteria (Enterobacteraceae)
- Fusobacteria
- Viruses
- Fungi

Immune tissue development requires normal gut colonization



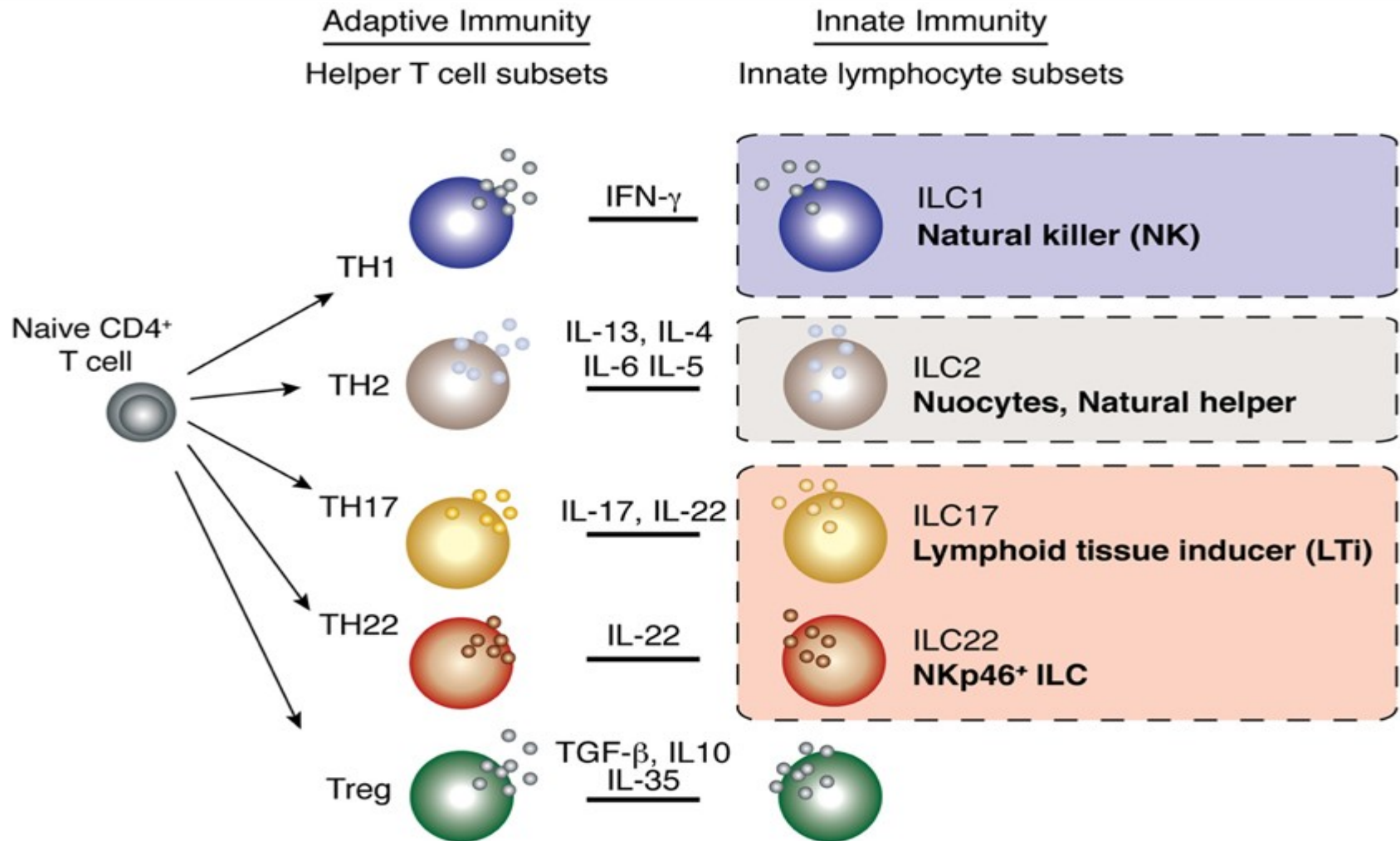
Reprinted from Nature Review Immunology Volume 4, Macpherson, AJ and Harris, NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system, p478-485, Figure 2. Copyright (2004) with permission from Nature Publishing Group.

Navození tolerance

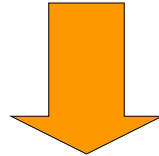


Na začátku infekce nejsou dendritické bb. plně aktivovány, záleží na koncentraci IL-6. Při nízké koncentraci IL-6 vznikají regulační T-lymfocyty, které inhibují Th1, Th2 odpověď.

Innate leukocyte cells



ORÁLNÍ TOLERANCE



Inhibice systémové imunity následující
po perorálním podání antigenu (proteinu)

Ustavení tolerance: 5 až 7 dní po orální
aplikaci

Trvání: několik měsíců

Fyziologický význam: tolerance k antigenům potravy

Oral tolerance

- Induction of mucosal and systemic non-responsiveness to dietary antigens
- Active immune response that depends upon
 - tolerogenic dendritic cells (make IL-10),
 - CD4 + CD25 + T regulatory cells (make TGF β & IL-10)
- Mechanisms of tolerance:
 - Ignorance (no/low costimulatory signals)
 - Inhibition/Anergy (inhibitory signals)

Využití indukce „orální“ (slizniční) tolerance v prevenci a léčbě

perorální, intranasální nebo inhalační aplikace antigenů

- Autoimunitní choroby (autoantigeny)
 - exp. modely, klin. studie (RA, RS, diabetes)
- Transplantace (aloantigeny)
 - exp. modely
- Alergie (čištěné alergeny např. roztočový Derp. 111-139)
 - exp. modely

Kůže jako imunologický orgán

- Kůže má funkci primárního lymfoidního orgánu
(*Fichtelius KE et al.: Int Arch Allergy 1970;37:607*)
- **SALT** (skin associated lymphoid tissues)
(*Streilein JW: J Invest Dermatol 1978;71:167-171*)
- **SIS** (skin immune system)
(*Bos JD et al.: J Invest Dermatol 1987;88:569-573*)

Fyziologické obranné bariéry kůže

- Epidermis – vícevrstevnost
- Odumírání
- Přítomnost látek tukové povahy a jejich cidní působení na mikroorganismy
- pH – nízké
- Fyziologická mikrobiální flóra kůže
- G pozit.(corynebacterium, stafylokoky, mikrokoky)

Fyziologické obranné bariéry kůže

- Prostup infekcí – nejčastěji kožní žlázy a vlasové váčky, nebo mechanickým narušením struktury
- Cizorodé organismy zachycovány pomocí Langerhansových buněk v epidermis i dermis

Buňky v kožním imunitním systému

Keratinocyty - produkce cytokinů: (IL-1,6,10, TGF- β , TNF), exprese MHC II.třídy - možnost prezentace Ag

Melanocyty

Langerhansovy buňky v epidermis - APC

Dendritické buňky v dermis

Fibroblasty - produkce kolagenu, odstaňování apoptotických bb.

Monocyty a makrofágy

Granulocyty (neutrofilní, ojediněle basofilní a eosinofilní)-dermis

Mastocyty

Endotelové buňky lymfatických a krevních cév

Buňky NK (ojedinělé)

Buňky NKT- dermis

Lymfocyty T (cca 90% α/β a 10% γ/δ)

v dermis CD3+,CD4+, CD8+; DR+, CD25+

v epidermis CD3+,CD8+

Dendritické buňky v kůži

- Langerhansovy buňky
- Kožní dendritické buňky – vyvíjejí se z myeloidních dendritických buněk
 - Nacházejí se v dermis
 - Funkce – prezentace Ag T- lymfocytům

Funkce Langerhansových buněk

- Exprese CD1a
- Antigeny pronikající epidermální vrstvou jsou vychytávány Langerhansovými buňkami, které poté cíleně migrují do spádové regionální uzliny. Přitom dozrávají a zpracovávají antigenní materiál. Dendritické buňky stimulují primární imunitní reakci s klonální expanzí specifických T a B lymfocytů.

Kůže - poškození nebo průnik infekce

- Dendritické bb – zachycují Ag,
- prezentace T-lymfocytům v lymfatické uzlině
- Vznik efektorových a paměťových T-lymfocytů
- Putování do místa zánětu

Keratinocyty

- Hlavní složka epidermis
- Diferenciace z kmenových buněk pod vlivem cytokinů
- Zdroj regulačních a efektorových cytokinů
- Regulace procesu krvetvorby

Humorální faktory v kožním imunitním systému

Antimikrobiální peptidy -defensiny, cathelicidiny, dermcidiny

Lysozym

Složky komplementového systému (C3, fB, fH; CD59 /DAF/, CD46 /MCP/, CD59; CR1, CR2)

Cytokiny (IL-1, TNF- α , ... interferony, chemokiny...)

Imunoglobuliny (IgG, IgA vč. SIgA)

Fibrinolysiny

Produkty koagulační kaskády

Eikosanoidy a prostaglandiny

Neuropeptidy

Klinické imunopatologické stavy spojené s poruchou imunitní funkce kůže

- Puchýřnatá onemocnění kůže – pemphigus vulgaris, pemphigoid
- Psoriasis
- Atopická dermatitida
- UV světlo