

Błony śluzowe – stan gotowości immunologicznej. Część II

Małgorzata Gieryńska, Ewa Kalinowska-Gacek¹

z Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Układ odpornościowy związany z przewodem pokarmowym jest największą i najbardziej skomplikowaną częścią ogólnego układu immunologicznego. Przewód pokarmowy jest miejscem kontaktu z dużą liczbą antygenów pokarmowych, a także miejscem, gdzie konieczne

jest natychmiastowe odróżnienie drobnoustrojów chorobotwórczych i nieszkodliwych antygenów, takich jak mikroflora autochtoniczna i białka pokarmowe. Ponieważ błony śluzowe są potencjalnym miejscem wnikania patogenów, na drodze ewolucji rozwinęły się mechanizmy

pozwalające na jednoczesne utrzymanie tolerancji oraz na szybkie uruchomienie obrony organizmu. Nieswoiste mechanizmy obronne związane z błonami śluzowymi układu pokarmowego są uzupełniane przez mechanizmy odporności swoistej. Nadzór immunologiczny błon śluzowych w przewodzie pokarmowym sprawowany jest dzięki tkance limfatycznej zorganizowanej w grudki limfatyczne oraz dzięki limfocytom rozproszonym zasiedlającym przewód pokarmowy (1). Są to dynamiczne struktury, rozwijające się w odpowiedzi na sygnały środowiskowe, takie jak flora symbiotyczna przewodu pokarmowego czy wnikające czynniki zakaźne. Co więcej,

¹ Studentka Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW.

Immunological alert at the mucosal sites.

Part II

Gieryńska M., Kalinowska-Gacek E., Department of Preclinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

Mucosal surfaces of the intestinal tract are continuously exposed to both potential pathogens and beneficial commensal microorganisms. This creates a requirement for homeostatic balance between tolerance and immunity that represents a unique regulatory challenge to the mucosal immune system. Gut associated lymphoid tissue (GALT), that constantly connects with intruding pathogens is able to trigger inflammatory or innate response to microbial intrusion and simultaneously there remain tolerant to commensal resident microflora. Due to the locally developed mechanisms it is possible for GALT to discriminate between harmful and beneficial antigens providing balance required for maintaining gut homeostasis. This review discusses the mechanisms for establishing and controlling the relation between unresponsiveness and initiation of active immune defences in the gut.

Key words: gut, innate and adaptive immunity, tolerance.

odbywa się stałe krążenie komórek układu odpornościowego wraz z limfą, od ściany jelita do kręzkowych węzłów chłonnych. Pozwala to na stworzenie funkcjonalnych przedziałów, w których zachodzi stymulacja swoistej odpowiedzi immunologicznej w pewnym oddaleniu od błony śluzowej przewodu pokarmowego, co chroni tę ostatnią przed efektami reakcji zapalnej (2). Istniejący w stanie zdrowia brak stanu zapalnego w przewodzie pokarmowym, mimo obecności fizjologicznej flory bakteryjnej, nie jest odzwierciedleniem ignorancji (bakterii i przewodu pokarmowego), ale doskonale dopasowanych choć antagonistycznych względem siebie procesów: ciągłego poszukiwania

i kontrolowania przechodzących przez barierę jelitową mikroorganizmów, co prowadzi do natychmiastowej odpowiedzi eliminującej czynniki zakaźne oraz procesu tolerancji, albo, inaczej mówiąc, braku reagowania. Przy czym proces tolerancji jest procesem bardzo aktywnym. Dlatego też można powiedzieć, że ekosystem przewodu pokarmowego wykształcił mechanizmy, które jednocześnie hamują stan zapalny i w tym samym czasie prowadzą ciągły nadzór i są gotowe do swoistej odpowiedzi immunologicznej w reakcji na jakiegokolwiek wnikające drobnoustroje.

Obrona swoista związana z błonami śluzowymi przewodu pokarmowego

Limfocyty śród nabłonkowe

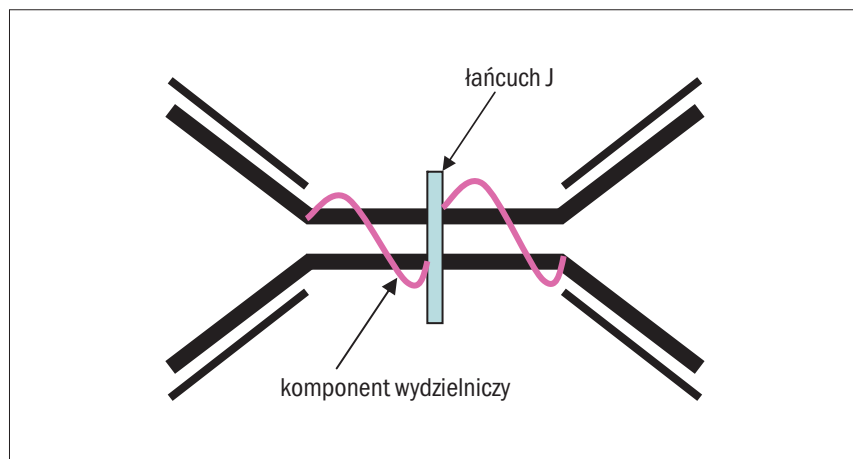
Najważniejszymi komórkami układu immunologicznego związanego z błonami śluzowymi przewodu pokarmowego (gut associated lymphoid tissue-GALT) są limfocyty śród nabłonkowe (intraepithelial lymphocyte-IEL). Są to przede wszystkim limfocyty T, zarówno TCR $\gamma\delta$, jak i TCR $\alpha\beta$ oraz komórki CD8 $\alpha\alpha$, które są również odpowiedzialne za nadzór immunologiczny i ochronę przewodu pokarmowego przed reakcjami immunopatologicznymi (2). Dodatkowo w ścianie jelita cienkiego i grubego rozmieszczone są limfocyty regulatorowe TregFoxp3⁺ (forkhead box protein 3), wspomagające utrzymanie równowagi między procesami pobudzenia i hamowania GALT. Limfocyty śród nabłonkowe różnią się od pozostałych limfocytów T krążących w organizmie tym, że są aktywowane przez inne komórki i odmienne receptory powierzchniowe. Limfocyty śród nabłonkowe nie ulegają stymulacji za pośrednictwem receptora TCR-CD3, tak jak jest to w przypadku typowych limfocytów T, ale poprzez receptor CD2 (3, 4, 5). Są one rozmieszczone między komórkami nabłonka błony śluzowej i w obszarach

międzygrudkowych kępek Peyera. Taka lokalizacja limfocytów śród nabłonkowych jest możliwa dzięki interakcji integryny $\alpha E\beta 7$, obecnej na powierzchni limfocytów z E-kadheryną enterocytów. W kręzkowych węzłach chłonnych, po kontakcie z komórkami prezentującymi antygen, na limfocytach T pojawiają się receptory zasiedlania jelita, pozwalające na ich migrację do ściany jelita, gdzie pełnią swoje funkcje. Najwięcej opisywanych limfocytów występuje w jelicie czczym (20/100 komórek nabłonka), jelicie krętym (13/100 komórek nabłonka) i okrężnicy (5/100 komórek nabłonka). Limfocyty związane z błonami śluzowymi wydzielają: TNF α , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5 i inne cytokiny. Występowanie różnic funkcjonalnych i strukturalnych tłumaczy się tym, że limfocyty śród nabłonkowe są stymulowane podczas ich różnicowania przez wiele różnych typów komórek prezentujących antygeny (6, 7).

Limfocyty śród nabłonkowe spełniają funkcje regulatorowe, stymulują odnowę komórek nabłonka, a wydzielane przez nie TNF α i INF γ mogą wspomagać zdolność transportu jonów przez nabłonek jelitowy (7). Możliwe jest też oddziaływanie komórek nabłonka na te limfocyty. Enterocyty wytwarzają: IL-7 i czynnik wzrostowy komórek pnia (stem cell factor – SCF), będące aktywatorami limfocytów śród nabłonkowych. Limfocyty śród nabłonkowe mogą eliminować niektóre drobnoustroje chorobotwórcze, indukują powstawanie i wspomagają działanie IgA, a także odpowiadają za utrzymanie tolerancji na antygeny pokarmowe (5).

Limfocyty B

Na terenie błon śluzowych jelit znajdują się też limfocyty B. Komórki te, o fenotypie komórek dziewiczych lub komórek pamięci immunologicznej, zlokalizowane są głównie w grudkach limfatycznych kępek Peyera. Ścisła współpraca limfocytów B i pomocniczych limfocytów T oraz obecność TGF- β i IL-10, umożliwia przekształcenie tych pierwszych w komórki plazmatyczne, główne źródło wydzielniczych IgA. Z odpornością błon śluzowych wiąże się również działalność limfocytów B1, w odróżnieniu od konwencjonalnych limfocytów B, mają na powierzchni cząsteczkę CD5. Limfocyty B1 nie są na stałe związane z tkanką limfatyczną błon śluzowych, ale krążą pomiędzy jamą otrzewnej i błoną śluzową jelit z pominięciem krwi. Biorą one udział tylko w pierwotnej odpowiedzi immunologicznej, przed rozwinięciem się specyficznych mechanizmów efektorowych. Głównym zadaniem limfocytów B1 jest wytwarzanie przeciwciał IgM, ale są zdolne również do syntezy IgA w sposób niezależny od limfocytów T



Ryc. 1. Schemat budowy wydzielniczej IgA

pomocniczych. IgM wykazują małe powinowactwo do antygenów, ale są wielospecyficzne i mogą wiązać kilka typów antygenów bakteryjnych (np. lipidy lub białka bakteryjne). Z pobudzonych komórek B1 nie powstają komórki pamięci immunologicznej, tak jak jest to w przypadku typowych limfocytów B (8).

Immunoglobuliny klasy A

Humoralna odpowiedź immunologiczna w jelitach polega na wytwarzaniu przeciwciał klasy A (IgA). Przeciwciała klasy IgA mają zdolność swoistego rozpoznania i wiązania antygenów, a w następstwie utworzenia kompleksu antygen – przeciwciała aktywują komórki efektorowe układu immunologicznego. Immunoglobuliny klasy A występują w postaci monomeru – we krwi i polimeru, najczęściej dimeru, w wydzielinach. Wydzielnicze IgA (secretory IgA – S-IgA) są wytwarzane miejscowo w sąsiedztwie odpowiedniego nabłonka i uwalniane do śluzu. Monomeryczna postać IgA powstaje natomiast w komórkach plazmatycznych szpiku kostnego i śledziony. S-IgA, znajdują się we łzach, w pocie i w wydzielinach przewodu pokarmowego, układu oddechowego i układu moczowo-płciowego. Przeciwciała te zbudowane są z dwóch łańcuchów ciężkich α oraz dwóch łańcuchów lekkich κ lub λ , połączonych mostkami dwusiarczkowymi. Monomery IgA są połączone glikoproteinami: łańcuchem J oraz tzw. komponentem wydzielniczym (secretory component – SC; **ryc. 1**). Łańcuch J jest syntetyzowany wraz z IgA w komórkach plazmatycznych. Jego kluczową rolę jest udział w regulacji stopnia polimeryzacji miejscowo wytworzonych przeciwciał klasy A i klasy M. Bierze on też udział w translokacji immunoglobulin przez nabłonek. Komponent wydzielniczy, w odróżnieniu od łańcucha J i monomerów IgA, jest wytwarzany przez komórki nabłonkowe układu pokarmowego, oddechowego, moczowo-płciowego oraz przewodów wyprowadzających gruczołów. SC może występować w formie niezwiązanej z przeciwciałami, wtedy ma zdolność ograniczania przylegania szczepów *Escherichia coli* do nabłonka gospodarza, oraz hamowania działania enterotoksyn bakteryjnych. Jednak głównym zadaniem tej glikoproteiny jest transport dimerów IgA przez nabłonek do wydzielin błon śluzowych i ich ochrona przed enzymami proteolitycznymi.

Wyróżnia się dwie podklasy: IgA1 i IgA2, różniące się między sobą budową i dystrybucją w organizmie. Podklasa IgA1 charakteryzuje się większą łatwością wiązania antygenów, a jednocześnie wyższą wrażliwością na działanie specyficznych proteaz produkowanych przez liczne

bakterie chorobotwórcze. Rozmieszczenie limfocytów B syntetyzujących i wydzielających podklasy IgA odzwierciedla rodzaj antygenów penetrujących błony śluzowe. Wykazano, że kwasy lipoteichojuowe bakterii Gram-dodatnich oraz lipopolisacharyd bakterii Gram-ujemnych aktywują limfocyty B do syntezy IgA2, a antygeny grasiczozależne powodują wzrost produkcji IgA1. Do czynników determinujących rodzaj podklasy wydzielanych przeciwciał, oprócz struktury chemicznej antygeny, należą miejsce indukcji odpowiedzi immunologicznej oraz cechy osobnicze i wiek gospodarza (9, 10).

S-IgA są produkowane przez komórki plazmatyczne błon śluzowych, przede wszystkim w jelicie krętym i okrężnicy. Mechanizmy regulujące powstawanie komórek plazmatycznych wytwarzających IgA w błonach śluzowych są ściśle kontrolowane. Przekształcanie limfocytów B w komórki wydzielające IgA zachodzi kilkusetapowo i jest uzależnione m.in. od obecności limfocytów T pomocniczych, gdyż wiele cytokin (IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-10, IL-6, IL-1) pośrednio i bezpośrednio reguluje ich różnicowanie się i proliferację. Powstanie IgA poprzedza proces przełączania klas, który odbywa się w kępkach Peyera i jest regulowany przez TNF- β . To właśnie tutaj, a dokładniej w kopolach kępek Peyera, limfocyty B IgA⁺ przeważają nad innymi populacjami limfocytów B (9).

Wydzielnicze IgA są transportowane przez ściany jelita, gdzie powstają, do światła przewodu pokarmowego na drodze transcytozy, za pomocą receptora dla polimerycznych form immunoglobulin (polymeryczny Ig receptor – pIgR; **ryc. 2A**). Jest on syntetyzowany w szorstkiej siateczce śródplazmatycznej. Receptory pIgR są wbudowane w błonę enterocyty, ale występują również na hepatocytach, pośredniczących w przenoszeniu dimerów IgA z krwi do żółci. Synteza polimerycznych postaci form immunoglobulin jest ściśle uzależniona od mikrośrodowiska cytokinowego. W badaniach *in vitro* wykazano wzmożoną syntezę pIgR w obecności cytokin prozapalnych, takich jak TNF α , IFN γ i IL-1. Natomiast *in vivo* wykazano ścisłą korelację pomiędzy obecnością regulatorowego czynnika transkrypcyjnego dla IFN-1 (IFN regulatory factor-1 – IRF) a syntezą pIgR, co potwierdza zależność tego receptora od IFN γ (11).

Skuteczność dimerów S-IgA w obronie przed zakażeniami jest związana z ich większą zdolnością do wiązania i neutralizowania antygenów. IgA mogą też blokować receptory bakteryjne, co zapobiega adhezji drobnoustrojów do komórek nabłonka i rozwojowi zakażenia. Możliwe jest to dlatego, że reszty mannozowe przyłączone do łańcuchów ciężkich α w IgA reagują

z receptorami o charakterze lektyn na fimbriach wielu bakterii. Dimery IgA wiążą też antygeny pokarmowe przedostające się ze światła jelita do błony podśluzowej. IgA uczestniczą w eliminowaniu antygeny, tworząc specjalne kompleksy: antygen – IgA – IgG. Kompleksy te za pomocą receptora pIgR są pochłaniane przez komórki nabłonkowe i transportowane wewnątrzkomórkowo w pęcherzykach i uwalniane od strony luminalnej nabłonka (11).

Dimeryczna postać IgA może też pełnić funkcję przeciwzapalną. Wiąże się to z neutralizowaniem antygenów bakteryjnych biorących udział w prozapalnej aktywacji komórek nabłonkowych jelita. Patogeny, stymulując miejscową odpowiedź immunologiczną w błonie śluzowej, jak również odpowiedź ogólną, oprócz IgA indukują syntezę innych klas przeciwciał: IgG i IgM (10).

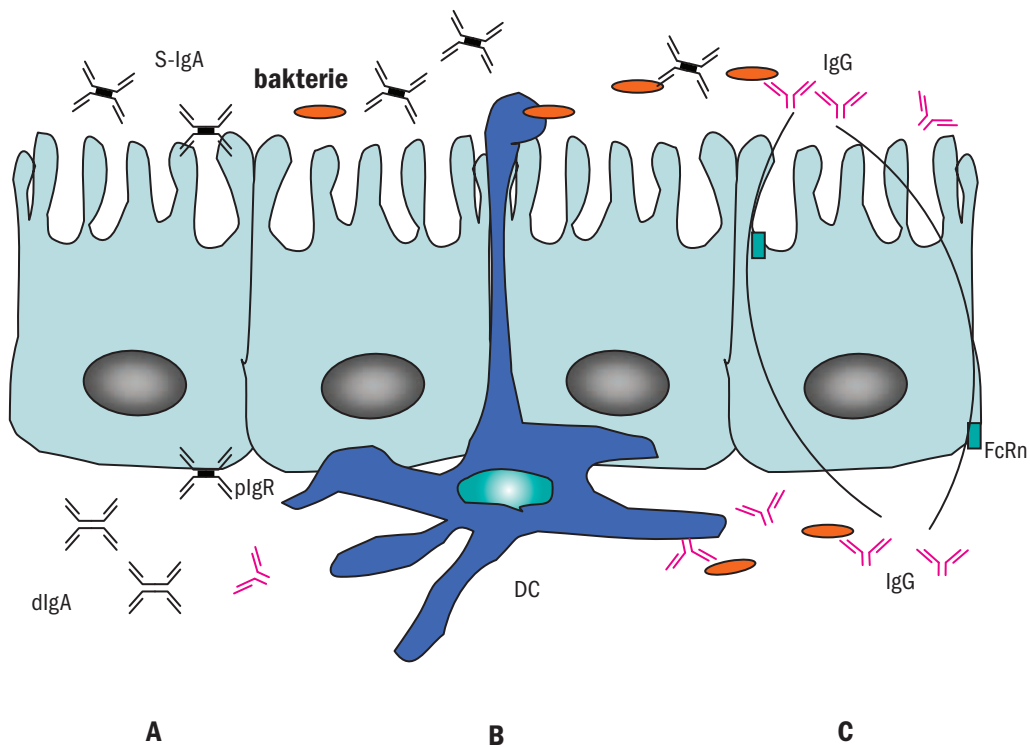
Relacja gospodarz-czynnik chorobotwórczy w kontekście błon śluzowych przewodu pokarmowego

W organizmie funkcjonuje szereg mechanizmów pozwalających na ochronę integralności błon śluzowych, sprawowanie kontroli nad mikroflorą symbiotyczną i uruchomieniem właściwej reakcji obronnej w przypadku pojawienia się bakterii chorobotwórczych. Jednak w wyniku koewolucji drobnoustrojów z organizmami wyższymi, bakterie posiadły zdolność skutecznego przenikania w głąb organizmu, jak również omijania swoistych i nieswoistych mechanizmów obronnych. Patogeny unikają rozpoznania przez komórki układu immunologicznego, wchodzą w interakcje z tymi komórkami, a nawet samodzielnie pobudzają reakcje odpornościowe i potrafią czerpać z tego faktu korzyści.

Drogi wnikania bakterii chorobotwórczych

Bakterie patogenne w różny sposób pokonują barierę nabłonkową i przedostają się w głąb organizmu. W przypadku błon śluzowych wyróżniamy dwie główne drogi wnikania. Pierwsza z nich polega na wykorzystaniu komórek M (6, 12). W komórkach M główną drogą transportowania antygenów jest endocytoza, w trakcie której bardzo mała ilość pobranego materiału jest kierowana do lizosomów, gdzie mogłyby być zniszczone pochłonięte bakterie. Chociaż endosomy komórek M mają niskie pH i zawierają katepsynę E, nie wiadomo czy pobrany materiał jest degradowany w trakcie transepitelialnego transportu i czy komórki te biorą udział w przetwarzaniu i prezentowaniu antygenów. Wiadomo na pewno, że wiele patogenów przeżywa transcytozę i mogą one zakażać

ŚWIATŁO JELITA



Ryc. 2. Stan gotowości immunologicznej błon śluzowych. A – Transport wydzielniczych IgA przy udziale receptora dla polimerycznych postaci immunoglobulin. B – Wiązanie wolnych bakterii przez komórkę dendrytyczną w świetle jelita i w strefie podnabłonkowej z wykorzystaniem przeciwciał klasy IgG. C – Przechodzenie drobnoustrojów opłaszczonych IgG przez ścianę jelita przy wykorzystaniu i receptora FcRn. Objasnienia: dIgA (dimeric IgA) – dimer IgA; S-IgA (secretory IgA) – wydzielnicze IgA; plgR (polymeric Ig receptor) – receptor dla polimerycznych form immunoglobulin; FcRn (neonatal Fc receptor) – k; DC (dendritic cell) – komórka dendrytyczna

komórki nabłonka i w ten sposób następuje rozprzestrzenianie zakażenia (6).

Penetracja błony śluzowej z wykorzystaniem komórek M wymaga wytwarzania przez bakterie białek, które umożliwiają im ścisłe przyleganie do powierzchni błony komórkowej, a następnie inwazję. Bakteryjne białka inwazyjne mogą być wstrzykiwane do komórki za pomocą systemu sekrecji typu III (type III secretory system TTSS). TTSS jest mechanizmem jednoetapowym, a substancje wydzielane przez bakterie za pomocą tego systemu nie są uwalniane do przestrzeni periplazmatycznej komórki bakteryjnej, ale dostają się bezpośrednio do cytozolu komórki gospodarza (13).

Drugą drogą wykorzystywaną przez patogeny są komórki dendrytyczne. Będąc strażnikami organizmu i profesjonalnymi komórkami prezentującymi antygen, komórki dendrytyczne mają liczne wypustki, które są w ciągłym ruchu. Na swojej powierzchni prezentują liczne receptory rozpoznające wzorce molekularne związane z patogenami (pattern recognition receptors – PRR) pozwalające na natychmiastową reakcję w razie rozpoznania patogenu. Konsekwencją pobudzenia DC jest zwiększenie ekspresji białek głównego

układu zgodności tkankowej (major histocompatibility complex – MHC) klasy I i II, oraz cząsteczek kostymulujących (CD40, CD80, CD86). Jelitowe komórki dendrytyczne stanowią heterogenną populację zdolną do uruchomienia zarówno stanu tolerancji, jak i reakcji zapalnej w odpowiedzi na antygeny wnikające z przewodu pokarmowego. Ta różnorodność odpowiedzi jest wynikiem aktywacji różnych subpopulacji DC, ale także efektem miejscowych czynników środowiskowych takich jak limfopoetyna zrębu grasicy (thymic stromal – derived lymphopoietin – TSLP), IL – 10, TGFβ lub kwas retinowy (retinoic acid – RA). Komórki dendrytyczne obecne pod nabłonkiem jelitowym mogą przeciskać swoje wypustki pomiędzy enterocytami i w ten sposób wychwytywać antygeny bezpośrednio z treści jelita (ryc. 2B; 14, 15). Wciskając swoje wypustki pomiędzy komórki nabłonka, nie uszkadzają ich ścisłych połączeń, a tym samym nie naruszają integralności warstwy nabłonkowej. Jelitowe DC potrafią syntetyzować białka okludynę i kładynę odpowiedzialne za istnienie ścisłych połączeń pomiędzy komórkami. Po związaniu patogennej bakterii przez komórkę dendrytyczną komponenty, takie jak

bakteryjny LPS, powodują reorganizację białek utrzymujących ścisłe połączenia komórkowe i powrót komórki dendrytycznej do warstwy podnabłonkowej. Po przeniesieniu bakterii poniżej warstwy nabłonka następuje endocytoza i jednoczesna migracja komórek dendrytycznych do krezkowych węzłów chłonnych, gdzie prezentują pochłonięte antygeny limfocytom efektorowym T. Dodatkowo komórki dendrytyczne wychwytyują te drobnoustroje, które dostały się do strefy podnabłonkowej wykorzystując komórki M. Patogeny umiające unikać fagocytozy wykorzystują komórki dendrytyczne jako drogę inwazyjną organizmu (ryc. 2B; 15).

Jeszcze innym sposobem inwazji wykorzystywanym przez bakterie jest tzw. inwazja bezpośrednia. Taki sposób przenikania przez barierę nabłonkową wykorzystuje np. *Listeria monocytogenes*. Inwazja dokonuje się nie poprzez nabłonek towarzyszący grudkom, czyli FAE (follicle associated epithelium), ale w innych miejscach błony śluzowej jelita. Sposób, jaki wykorzystują listerie przypomina nieco proces fagocytozy, ale dokonują go komórki normalnie nieposiadające tej zdolności, czyli komórki nabłonkowe.>Listerie przylegają do błony cytoplazmatycznej komórki

nabłonka dzięki produkcji i uwalnianiu InlA (12). InlA jest białkiem należącym do zróżnicowanej grupy intrinalizyn, do których należą również: InlB, InlC, InlC2, InlD, InlE, InlF, InlG i InlH. Białko InlA wraz z InlB jest prawdopodobnie głównym mediatorem zmian w komórce, które zapoczątkowują proces adhezji bakterii do nabłonka jelita. InlA ma silne powinowactwo do E-kadheryny, śródbłonowej glikoproteiny biorącej udział w tworzeniu połączeń pomiędzy komórkami (E-kadheryna-E-kadheryna). Następnie InlA wywołuje zmiany wewnątrz komórki polegające na zmianie konformacji cytoskieletu oraz struktury błony komórkowej, co prowadzi do endocytozy bakterii (16).

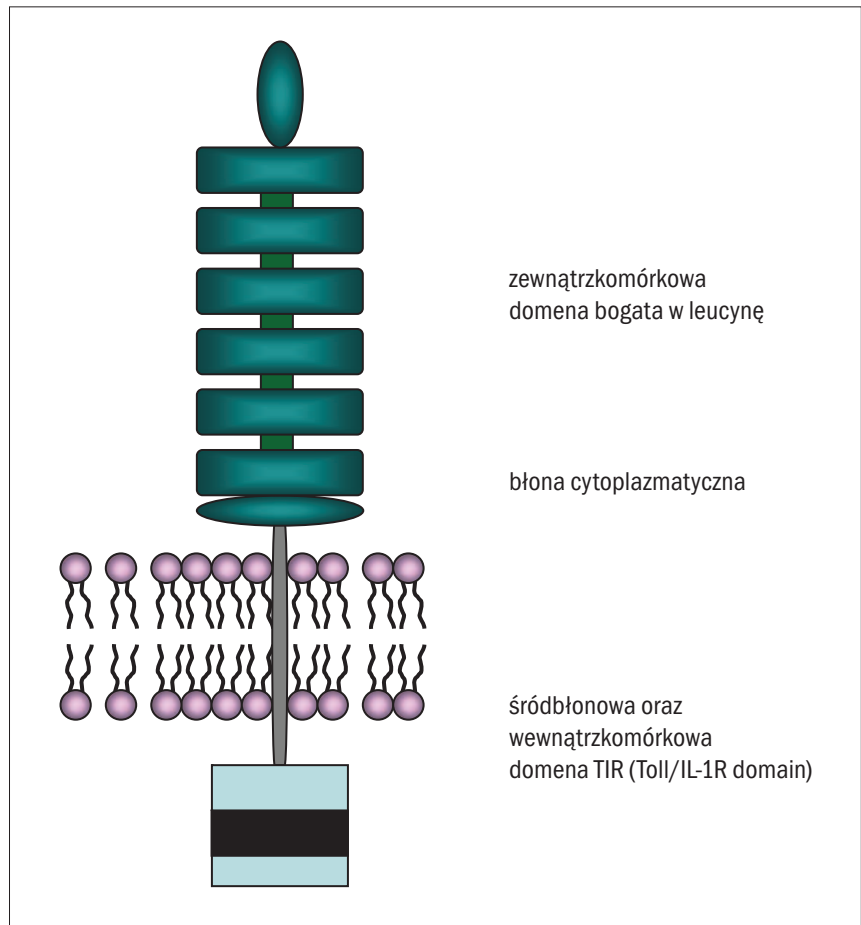
Jest jeszcze jedna, alternatywna, droga wnikania drobnoustrojów poprzez błonę śluzową. Polega ona na wykorzystaniu receptora dla fragmentu Fc przeciwciał. Receptor FcRn, który wykorzystują bakterie, różni się budową od innych receptorów z tej samej rodziny FcR. FcRn budową przypomina cząsteczkę MHC klasy I, występuje u człowieka na komórkach syncytiotrofoblastu i jest odpowiedzialny za wiązanie matczyne IgG i transport ich przez łożysko do krwi płodu. Receptor ten występuje również wewnątrz komórek śródbłonka, w komórkach nabłonkowych kanalików nerkowych, w hepatocytach i nabłonku jelit. W tych miejscach bierze udział w regulacji stężenia przeciwciał IgG we krwi dorosłych i może służyć również jako dodatkowe wrota zakażenia. Bakterie związane przez fragment Fab IgG mogą być transportowane przez receptor FcRn (ryc. 2C). Dzięki transportowi za pomocą FcRn patogeny nie ulegają degradacji w endosomach, gdyż endosomy zawierające FcRn nie podlegają fuzji z lizosomami. Drobnoustroje dostają się więc w niezmienionej postaci do błazki właściwej błony śluzowej (17, 18)

Zapewnienie integralności błon śluzowych

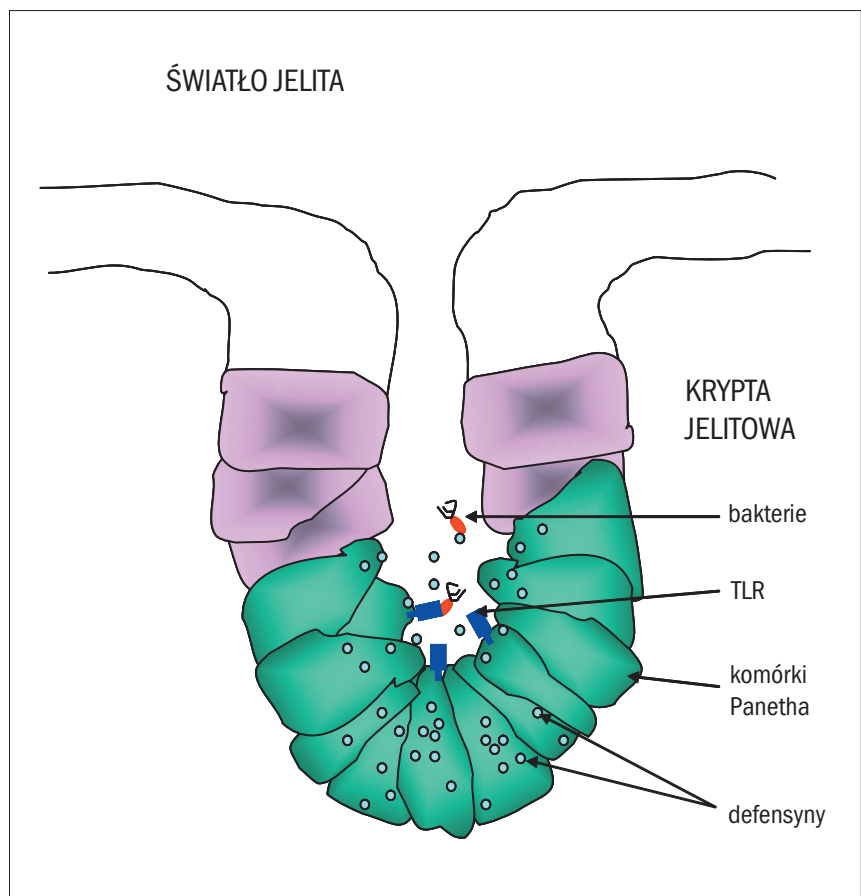
Utrzymanie homeostazy w przewodzie pokarmowym wiąże się z istnieniem mechanizmów pozwalających na tolerowanie naturalnej mikroflory, przy jednoczesnym zachowaniu stanu gotowości do zwalczania potencjalnego zakażenia. Jakikolwiek zaburzenia związane z niewłaściwym działaniem GALT niosą ze sobą szkodliwe dla całego organizmu powikłania.

Tolerancja pokarmowa

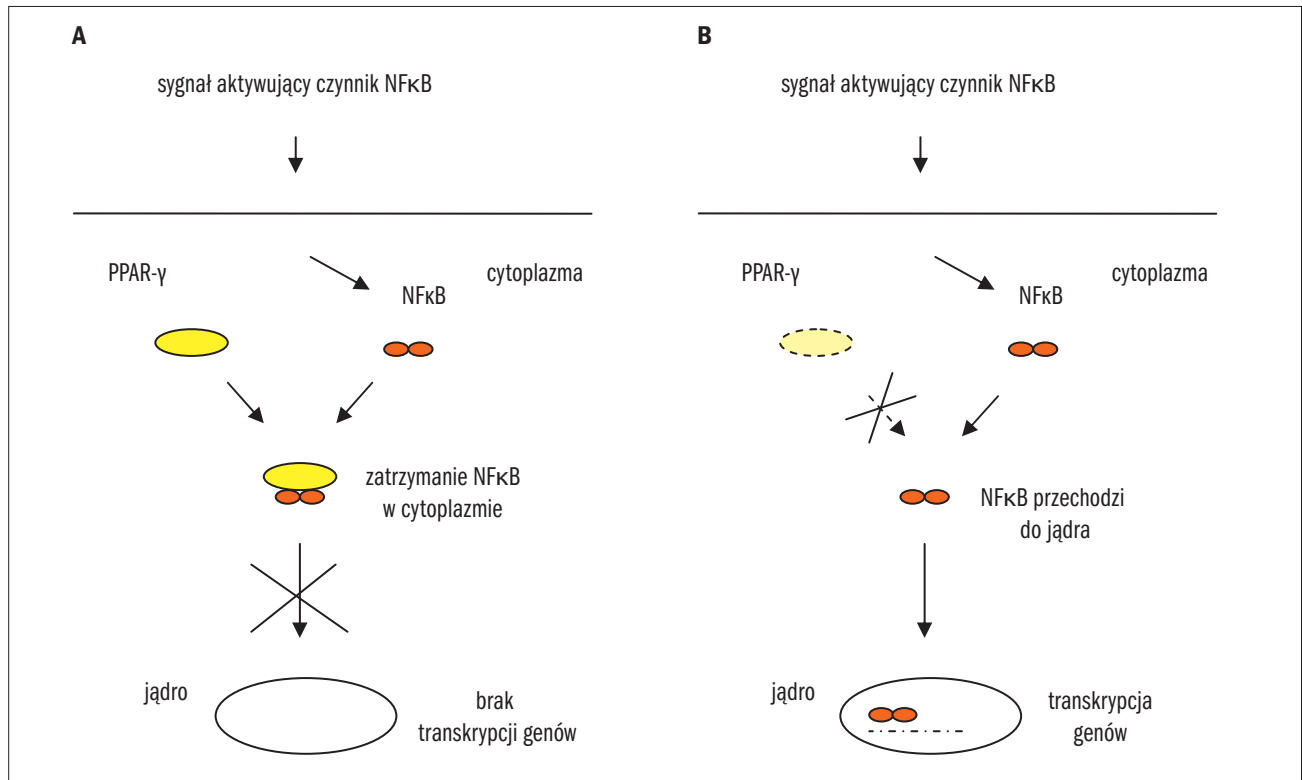
Na terenie GALT obowiązuje tolerancja pokarmowa, czyli brak reakcji układu odpornościowego na antygeny zawarte w pokarmie. Tolerancję pokarmową, która zapewnia zachowanie homeostazy błon śluzowych, umożliwiają stymulowane



Ryc. 3. Schemat budowy receptora Toll podobnego – TLR



Ryc. 4. Schemat budowy krypty jelitowej. TLR – receptor Toll-podobny



Ryc. 5. Mechanizm wstrzymania odpowiedzi immunologicznej (A) oraz mechanizm naturalnej drogi aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFκB (B). Objasnienia: PPAR-γ (peroxisome-proliferator-activated-receptor γ) – białkowy receptor jądrowy, NFκB (nuclear factor kappa B) – czynnik jądrowy κB

w GALT i migrujące z niej limfocyty. Limfocyty wędrują do innych tkanek, w szczególności do gruczołu mlekowego, gruczołów ślinowych i innych obszarów układu pokarmowego, chroniąc je przed powtórzną inwazją danym antygenem, podanym niekiedy drogą pokarmową. Ustalono, że u ludzi powstawanie tolerancji pokarmowej jest zależne od wieku, a dokładniej od dojrzałości układu immunologicznego.

Za cel tolerancji pokarmowej uznaje się zapobieganie uogólnionej odpowiedzi immunologicznej na antygeny pokarmowe, które przedostały się do krążenia w wyniku utraty szczelności bariery jelitowej. Tolerancja na antygeny, uzyskana drogą pokarmową, jest utrzymywana w organizmie po powtórny podaniu danego antygeny drogą pozajelitową i charakteryzuje się brakiem odpowiedzi immunologicznej.

Na rozwój tolerancji pokarmowej ma wpływ sprawność czynników anatomicznych i fizjologicznych warunkujących prawidłową barierę ochronną jelita – szczelność nabłonka, obecność śluzu, enzymy trawienne, odpowiednia mikroflora symbiotyczna. Natomiast za powstanie i utrzymanie tolerancji pokarmowej odpowiedzialne są trzy procesy: anergia, delecja klonalna i supresja komórek układu odpornościowego. Mechanizmy tolerancji pokarmowej są złożone i wymagają udziału wielu populacji komórek układu immunologicznego (12, 14).

Brak odpowiedzi immunologicznej na mikroflorę symbiotyczną

Analizując wpływ bakterii symbiotycznych na organizm gospodarza, nasuwa się pytanie, dlaczego drobnoustroje naturalnie zasiedlające przewód pokarmowy nie wywołują odpowiedzi immunologicznej, mimo że posiadają na swojej powierzchni te same wzorce molekularne co bakterie chorobotwórcze. Aby odpowiedzieć na to pytanie, należy omówić główne zasady działania mechanizmów obronnych organizmu.

Mechanizmy odporności nieswoistej mają związek z identyfikacją określonych związków występujących u drobnoustrojów i innych czynników zakaźnych. Częściki rozpoznawane, czyli tzw. molekularne wzorce związane z patogenami (pathogen – associated molecular patterns – PAMP), są charakterystyczne i wspólne dla grup mikroorganizmów. Są to: manny, składniki ścian komórkowych bakterii (LPS, lipopeptydy, peptydoglikany, kwasy teichojowe), niemetylowane sekwencje CpG bakteryjnego DNA, czy wirusowy dsRNA. Częściki PAMP pełnią ważne funkcje fizjologiczne, a ich budowa jest konserwatywna i nie ulega zmianom w wyniku ewolucji. Do identyfikacji PAMP służą odpowiednie receptory rozpoznające te wzorce – PRR. Znanych jest kilka typów receptorów PRR. Są to tzw. receptory wydzielane, najczęściej o właściwościach opsonin ułatwiających fagocytozę,

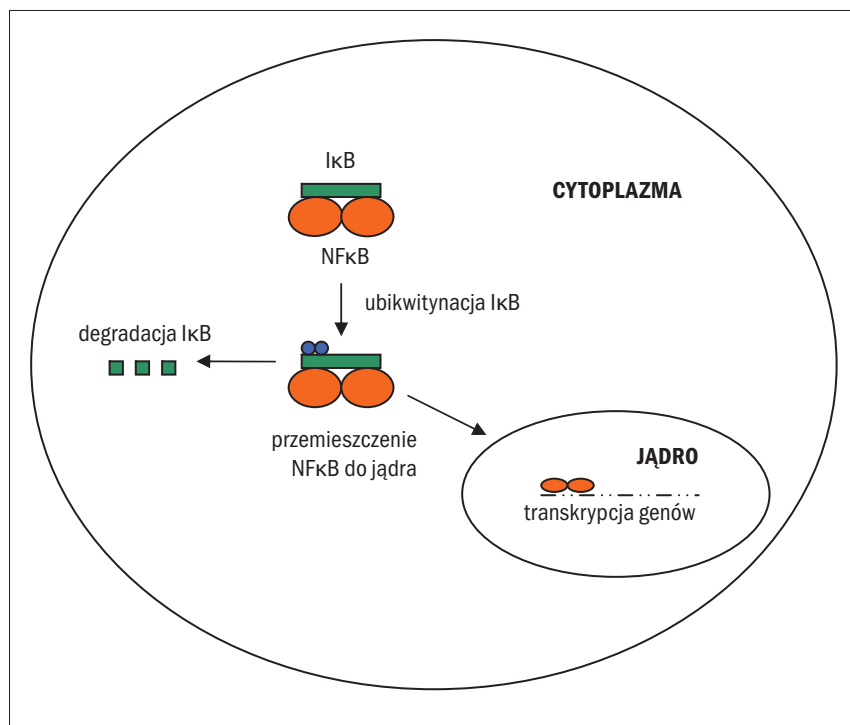
receptory uczestniczące w fagocytozie znajdujące się na powierzchni komórek prezentujących antygeny i receptory aktywujące komórki. Ostatni typ receptorów znajduje się na komórkach układu odpornościowego, a także na komórkach nabłonkowych. Dzięki lokalizacji w jamie ustnej, przewodzie pokarmowym, układzie oddechowym, w skórze i w drogach moczowo-płciowych receptory te reagują na zagrożenia ze strony czynnika zakaźnego już we wrotach zakażenia. PRR są bardzo starą, silnie zakonserwowanym elementem obrony nieswoistej organizmu, inicjując, po stymulacji, złożoną kaskadę przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych powodującą aktywację czynników transkrypcyjnych, takich jak czynnik jądrowy κB (nuclear factor κB, NF – κB), co w efekcie prowadzi do syntezy i uwolnienia cytokin prozapalnych. Najlepiej poznanymi PRR są receptory Toll-podobne, czyli TLR (Toll-like receptors). Receptory TLR zbudowane są z części zewnątrzkomórkowej bogatej w leucynę i części cytoplazmatycznej, czyli tzw. fragmentu TIR (Toll/IL-1 receptor; ryc. 3).

Większość receptorów TLR znajduje się na powierzchni, ale są też receptory znajdujące się wewnątrz komórek na błonach, np. pęcherzyków wewnątrzcytoplazmatycznych (TLR9). Dotychczas zidentyfikowano 13 typów receptorów TLR, ale nie dla wszystkich receptorów określono naturalny ligand (TLR 10, 12, 13). Rozpoznanie PAMP następuje po bezpośrednim

związaniu ligandu z receptorem. Niektóre TLR wymagają właściwego rozpoznania tzw. białek towarzyszących, dzięki czemu wiele receptorów TLR potrafi identyfikować niespokrewnione ze sobą strukturalnie ligandy (19).

Brak reakcji organizmu na bakterie stanowiące mikroflorę naturalną przewodu pokarmowego tłumaczy się właściwościami błony śluzowej i komórek układu immunologicznego oraz cechami samych komórek bakteryjnych. Mikroflora symbiotyczna nie wytwarza czynników chorobotwórczości, jakimi są adhezyny i inwazyjny. Adhezyny patogenów swoiście łączą się z molekularnymi elementami nabłonka jelita. Adhezja do komórek nabłonkowych ułatwia ich uszkodzenie przez toksyny bakteryjne, a tym samym umożliwia rozmnażanie i wnikanie bakterii w głąb tkanek. Brak odpowiedzi immunologicznej na bakterie symbiotyczne wynika z wiązania ich cząsteczek PAMP przez mucynę znajdującą się w śluzie. Bakterie patogenne dzięki wydzielaniu mucynaz potrafią uniknąć związania przez mucynę i usunięcia wraz z ruchami perystaltycznymi jelita. Innym przykładem braku pobudzenia PAMP jest specyficzna budowa lipidu A (składnik LPS) w postaci pentameru u beztlenowych bakterii z rodzaju *Bacteroides*. U bakterii chorobotwórczych natomiast lipid A jest heksamerem i w tej formie wykazuje wysokie właściwości immunostymulujące, działa aktywująco na limfocyty B, makrofagi i nieco słabiej na limfocyty T (12).

Funkcja błon śluzowych w kształtowaniu tolerancji mikroflory naturalnej opiera się na mechanizmie tzw. niezauważania. Objawia się to poprzez zmniejszoną liczbę i efektywność receptorów TLR, a co za tym idzie ograniczoną możliwość wykrywania cząsteczek PAMP. Lokalizacja receptorów TLR na komórkach ściany jelita jest ściśle określona. W obszarach reaktywnych immunologicznie, jakimi są krypty jelitowe, znajdują się TLR2 i TLR4, a dojrzale komórki nabłonkowe prezentują na powierzchni mającej bezpośredni kontakt ze światłem jelita receptory TLR3. Receptory TLR2 na komórkach krypt jelitowych odpowiadają za rozpoznanie peptydoglikanów, lipoprotein bakteryjnych, a TLR4 lipopolisacharydów i kwasu lipoteichojuowego. Lokalizacja tych receptorów na komórkach znajdujących się na dnie krypt sprawia, że nie mają one kontaktu z bakteriami symbiotycznymi i nie są przez nie stymulowane, natomiast są pobudzane po przedostaniu się do wnętrza krypt bakterii patogennych, w następstwie czego dochodzi do natychmiastowej stymulacji odpowiedzi immunologicznej (ryc. 4). Fakt ten zmniejsza czy wręcz uniemożliwia wywołanie odpowiedzi immunologicznej przez



Ryc. 6. Schemat ubikwitinacji IκB – stymulacja wydzielania cytokin prozapalnych. Objasnienia: NFκB (nuclear factor kappa B) – czynnik jądrowy κB; IκB (inhibitor NFκB) – inhibitor czynnika jądrowego κB

bakterie fizjologicznie zasiedlające jelita. Natomiast TLR3 wiążący dwuniciowy RNA (dsRNA) bierze udział w rozpoznawaniu zakażeń wirusowych (20).

Receptory TLR mogą być też tak rozmieszczone, aby bakterie symbiotyczne nie miały bezpośrednio możliwości ich stymulacji, jak jest to w przypadku TLR5, rozpoznającego flagelinę bakterii z rodzaju *Salmonella* spp. Receptor ten znajduje się w błonie komórkowej od strony warstwy podnabłonkowej, tzw. lokalizacja spolaryzowana. Rozpoznanie białka przez TLR5 jest więc możliwe tylko w przypadku naruszenia ciągłości nabłonka lub gdy flagelina zostanie przetransportowana na drodze transcytozy na drugą stronę komórki nabłonkowej. Dodatkowo flagelina bakterii komensalnych ma mniejszą zdolność stymulowania TLR5 (12).

Innym sposobem uniknięcia odpowiedzi immunologicznej przez bakterie symbiotyczne jest wstrzymanie syntezy cytokin. Rozpoznanie wzorca molekularnego przez TLR jest sygnałem pobudzającym kaskadę aktywującą czynnik jądrowy NFκB, który przechodzi z cytoplazmy do jądra komórkowego i wywołuje transkrypcję genów cytokin prozapalnych. Niepatogenne bakterie wywołują ekspresję i aktywację receptora białkowego PPAR-γ (peroxisome-proliferator-activated-receptor-γ). Jest to negatywny regulator czynnika NFκB. PPAR-γ łączy się z REL-A, podjednostką NFκB, zatrzymuje go w cytoplazmie i tym samym zapobiega zapoczątkowaniu transkrypcji genów kodujących cytokiny prozapalne (ryc. 5; 12).

Jest jeszcze jedna ścieżka oddziaływania bakterii symbiotycznych z NFκB, mianowicie droga ubikwitinowa. Niepatogenne (atenuowane) szczepy salmoneli oddziałują na komórki nabłonkowe zapobiegając ubikwitinacji podjednostki α inhibitora NFκB (IκBα). IκBα jest normalnie indukowany przez patogenne szczepy *Salmonella* spp. lub TNF γ. Ubikwitinacja IκBα prowadzi do zniszczenia tego białka w proteasomach. Nieubikwitynowany, czyli niezniszczony inhibitor NFκB, wstrzymuje przemieszczanie tego czynnika do jądra (ryc. 6; 12).

Należy więc uznać, że brak reakcji zapalnej w odpowiedzi na bakterie symbiotyczne stanowi wypadkową złożonych mechanizmów regulatorowych i nie jest wyłącznie przejawem ignorowania niepatogennych drobnoustrojów przez układ odpornościowy w ścianie jelita. GALT spełnia bowiem pozornie przeciwstawne funkcje: utrzymuje stałą tolerancję wobec naturalnej mikroflory i zachowuje stan pełnej gotowości do odpowiedzi immunologicznej w stosunku do patogenów.

Rolą bakterii symbiotycznych jest więc także oddziaływanie na komórki GALT, którego następstwem jest stan aktywnej tolerancji na antygeny pokarmowe i na same drobnoustroje. Prowadzi to do ograniczenia odpowiedzi lub stymulacji braku odpowiedzi na terenie błony śluzowej.

Komórki układu odpornościowego: komórki dendrytyczne, makrofagi i limfocyty Treg w odpowiedzi na mikroflorę symbiotyczną produkują cytokiny przeciwzapalne IL10 i TGF-β co stymuluje miejscową

odpowiedź angażującą limfocyty Th2 i powoduje wytwarzanie przeciwciał klasy IgA. Wydzielnicze IgA wiążą antygeny i w konsekwencji te usuwane są wraz ze śluzem. Jednocześnie IL-10 i TGF- β , tłumią działanie limfocytów Th1, zapobiegając uruchomieniu przez organizm miejscowej odpowiedzi angażującej komórki biorące udział w zapaleniu i syntezie przeciwciał IgG (12).

Brak odpowiedzi ze strony GALT na bakterie symbiotyczne jest mechanizmem złożonym, a granica pomiędzy zachowaniem homeostazy i reakcją zapalną może być przekroczona dość łatwo, gdy występują określone uwarunkowania genetyczne. Przykładem wady genetycznej mającej swoje odzwierciedlenie w działaniu układu immunologicznego, jest choroba Leśniowskiego-Crohna (21). W chorobie Leśniowskiego-Crohna mutacja dotyczy genu CARD15/NOD. Gen ten koduje białko NOD2, będące wewnątrzkomórkowym receptorem dla dipeptydu muramylowego. Razem z działającymi zewnątrzkomórkowo cytokinami TNF α i IFN γ powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego NF κ B. Deficyt NOD2 spowodowany mutacją w genie CARD15/NOD prowadzi do zmniejszenia wytwarzania kryptodyn przez komórki Panetha, co powoduje wzrost liczby bakterii w końcowym odcinku jelita cienkiego i usposabia do rozwoju zapalenia. U osób z chorobą Leśniowskiego-Crohna proces usuwania bakterii na poziomie nabłonka jelitowego przebiega nieprawidłowo. Deficyt w zakresie NOD2 powoduje, że u osób z tą chorobą obserwuje się podwyższone stężenie TNF α , który działa miejscowo i systemowo, nasilając i stymulując reakcje zapalne. W efekcie dochodzi do aktywacji limfocytów T i nadmiernej produkcji cytokin, prowadząc do długotrwałego zapalenia jelita cienkiego, głównie czcze- go (12, 21).

Podsumowanie

Błony śluzowe stanowią barierę oddzielającą zrównoważone środowisko wewnętrzne organizmu od, ulegającego dynamicznym zmianom, środowiska zewnętrznego. Będąc najważniejszymi wrotami zakażenia, są wyposażone w skuteczne mechanizmy obronne, gwarantujące utrzymanie homeostazy. Dzięki lokalnie działającemu układowi odpornościowemu (MALT) zapewniona jest zarówno ochrona błon śluzowych, jak i ochrona ogólna przed wnikającymi patogenami. Odpowiednie działania swoistych i nieswoistych mechanizmów obronnych w przewodzie pokarmowym gwarantuje jednocześnie tolerancję w stosunku do naturalnej mikroflory symbiotycznej.

Układ odpornościowy przewodu pokarmowego musi pozostawać w stanie równowagi pozwalającym na identyfikację antygenów i uniknięcie uszkodzeń błony śluzowej w przebiegu ostrej reakcji zapalnej, a jednocześnie gwarantującym natychmiastowe wzbudzenie odpowiedzi immunologicznej w celu eliminacji czynnika zakaźnego i aktywne utrzymanie stanu tolerancji w stosunku do naturalnej mikroflory. W związku z tym układ odpornościowy błon śluzowych musi być w stałej gotowości do podjęcia walki i zachowywać najdalej idącą wstrzemięźliwość w kontakcie z antygenami pokarmowymi i symbiotycznymi drobnoustrojami.

Piśmiennictwo

- Kalinowska-Gacek E., Gieryńska M.: Błony śluzowe – stan gotowości immunologicznej. Część I. *Życie Wet.* 2009, **84**, 77–81.
- Mowat A. McJ.: Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 2003, **3**, 331–340.
- Sun Ch.-M., Hall J., Blanck R.B., Bouladoux N., Oukka M., Mora J.R., Belkaid Y.: Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 Treg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* 2007, **204**, 1774–1785.
- Van Houten N., Mixter P. E., Wolfe J., Budd R.C., 1993. CD2 expression on murine intestinal intraepithelial lymphocytes is bimodal and defines proliferative capacity. *Int. Immunol.* 1993, **5**, 665–672.
- Yamamoto M., Fujihashi K., Kawabata K., McGhee J.R., Kiyono H.: A mucosal intranet: intestinal epithelial cells down – regulate intraepithelial but not peripherical, T lymphocytes. *J. Immunol.* 1998, **160**, 2188–2196.
- Neutra M.R., Mantis, N.J., Kraehenuh, J.P.: Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* 2001, **2**, 1004–1009.
- Taylor C.T., Murphy A., Kelleher D., Baird A.W.: Changes in barrier function of a model intestinal epithelium by intraepithelial lymphocytes require new protein synthesis by epithelial cells. *Gut* 1997, **40**, 634–640.
- Kroese F.G.M., de Waard R., Bos N.A.: B-1 cells and their reactivity with the murine intestinal microflora. *Sem. Immunol.* 1996, **8**, 11–18.
- Mestecky J., Moro I., Underdown B.J.: Mucosal immunoglobulins. W: *Mucosal Immunology*, Ogra P.L., Lamm M.E., Bienenstock J., Mestecky J., Strober W., McGhee J.R. (edit.), 2nd ed., Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney Tokyo, Toronto 1999, s. 133–162.
- Czyżewska-Buczyńska A., Lewandowicz-Uszyńska A., Jankowski A.: IgA istotny element układu odporności – wybrane zagadnienia. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2007, **61**, 38–47.
- Blanch V.J., Piskurich J.E., Kaetzel C.S.: Coordinate regulation of IFN regulatory factor-1 and the polymeric Ig receptor by proinflammatory cytokines. *J. Immunol.* 1999, **162**, 1232–1235.
- Sansonetti, P.J.: War or peace at mucosal surfaces. *Nat. Rev. Immunol.* 2004, **4**, 953–964.
- Hueck Ch. J.: Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animal and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Res.* 1998, **62**, 379–433.
- Coombes J.L., Powrie F.: Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 2008, **8**, 435–446.
- Rescigno M., Urbano M., Valzasina B., Francolini M., Gianluca R., Bonasio R., Granucci F., Kraehenbuhl J.P., Ricciardi-Castagnoli P.: Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2001, **2**, 361–367.
- Bergmann B., Raffelsbauer D., Kuhn M., Goetz M., Hom S., Goebel W.: In1A but not In1B – mediated internalization *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian needs the support of other internalins. *Mol. Microbiol.* 2002, **43**, 557–570.
- Yoshida M., Claypool S.M., Wagner J.S., Mizoguchi E., Mizoguchi A., Roopenian D.C., Lencer W.I., Blumberg R.S.: Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG

into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity* 2004, **20**, 769–783.

- Jang M.H., Kweon M.N., Iwatanik K., Yamamoto M., Terahara K., Sasaki C., Suzuki T., Nochi T., Yokota Y., Rennert P.D., Hiroi T., Tamagawa H., Iijima H., Kuni-sawa J., Yuki Y., Kiyono H.: Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, **101**, 6110–6115.
- Pasare C., Medzhitov R.: Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2004, **6**, 1382–1387.
- Furrie E., Macfarlane S., Thomson G., MacFarlane G.T.: Toll-like receptors – 2, – 3, and –4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology* 2005, **115**, 565–574.
- Pieścik M., Pawlik M., Rydzewska G.: Infekcyjne zapalenie jelita a choroba Leśniowskiego-Crohna – problemy diagnostyczne i terapeutyczne. *Przeł. Gastroentrol.* 2006, **1**, 88–91.

Dr Małgorzata Gieryńska, Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa, e-mail: malgorzata_gierynska@sggw.pl