

ВУГЛЕВОДНИЙ КОД АНТИГЕНПРЕЗЕНТУЮЧИХ КЛІТИН ПЛАЦЕНТИ

Дендритні клітини є важливою складовою імунної системи плаценти, що зумовлено їх численними регуляторними та ефекторними функціями. Плюрипотентність плацентарних дендритних клітин полягає, з одного боку, в презентації антигену лімфоцитам і активації імунної відповіді, а з іншого – в розвитку імунологічної толерантності материнського організму відносно плода. Антигенпрезентуючі клітини плаценти несуть рецептори до лектинів арахісу, сої, конконоваліну А, що відповідає їх антигенрозпізнаючій і антигенпрезентуючій функціям. На час пологів на цитоплазматичній мембрані антигенпрезентуючих клітин збільшується кількість рецепторів до лектинів арахісу, сої і конконоваліну А, що є маркером зростання їх функціональної активності й відміни стану імунологічної толерантності материнського організму до плода.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: антигенпрезентуючі клітини, плацента, лектини.

ВСТУП. Однією з центральних проблем імунології репродукції є визначення імунних процесів, що забезпечують нормальний розвиток вагітності та пологів [1]. Взаємодія між організмами матері та плода зводиться, в кінцевому результаті, до взаємодії їх клітин. Важливе й актуальне місце в імуноморфологічному вивченні системи мати–плацента–плід посідають антигенпрезентуючі дендритні клітини [4].

Дендритні клітини є важливою складовою імунної системи плаценти, що зумовлено їх численними регуляторними та ефекторними функціями [10]. Плюрипотентність плацентарних дендритних клітин полягає, з одного боку, в презентації антигену лімфоцитам і активації імунної відповіді, а з іншого – в розвитку імунологічної толерантності материнського організму відносно плода завдяки контролю над Th₁/Th₂ балансом і регуляції активації проліферативної відповіді аутологічних NK-клітин, що розпізнають клітини трофобласту [11].

На даний момент не визначено, в яких випадках дендритні клітини викликають індукцію імунної відповіді на антигени, а в яких вони забезпечують толерантність. Крім того, за даними Y.-L. Van і співавт., у децидуальному шарі існує 3 субпопуляції дендритних клітин: 2 типи мієлоїдних клітин (BDCA-1⁺CD19⁻CD14⁻ і BDCA-1⁺CD14⁻) та плазмацитоїдні дендритні клітини (BDCA-2⁺CD123⁺) [6]. Незважаючи на мієлоїд-

© О. Г. Куц, 2014.

ний фенотип, обом субпопуляціям дендритних клітин децидуальної оболонки притаманні властивості незрілих дендритних клітин, тобто не відбувалося стимулювання Th₁-типу імунної відповіді й таким чином забезпечувався фізіологічний перебіг вагітності. Аналогічні дані наведено в іншій роботі: дендритні клітини децидуальної оболонки з фенотипом CD14⁺CD4⁺CD68⁺HLADR⁺CD209⁺ перебували в тісному контакті з NK-клітинами, активно захоплювали антиген, але не були здатні стимулювати наївні Т-лімфоцити [9]. Після дії цитокінів – індукторів запального процесу дендритні клітини *in vitro* експресували маркери зрілих дендритних клітин (CD83 і CD25) і набували властивості активувати імунну відповідь [7].

На сьогодні недостатньо вивчено, як змінюється фенотип дендритних клітин за будовою вуглеводовмісних рецепторів протягом вагітності. Дослідження морфофункціонального стану дендритних клітин лектингістохімічним методом при патології вагітності дозволило б з'ясувати дисфункцію дендритних клітин і провести відповідну корекцію. Наприклад, як експериментальне лікування спонтанних викиднів запропоновано введення сингенних дендритних клітин, що супроводжується зростанням кількості TGF-β1 і PIBF на фетоплацентарному рівні й виношуванням вагітності [8].

Тому метою дослідження стало вдосконалення способу виявлення антигенпрезентуючих клітин із використанням двох лектинів у

гістологічних препаратах методом лектинової гістохімії, що забезпечило б ефективність додаткового високоспецифічного виявлення цих клітин.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом дослідження стали плаценти щурів на 18-ту, 20-ту, 22-гу доби вагітності та на час пологів. Забір плацент здійснювали в декапітованих щурів і під час пологів згідно із законодавчими правилами про гуманне ставлення до тварин (правилами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей). Виготовляли гістологічні препарати. Плаценти фіксували в розчині Буена, заливали в парафін. Для більш детального й ефективного виявлення антигенпрезентуючих клітин проводили лектин-гістохімічну реакцію, застосовуючи комбінацію з 2 лектинів і, відповідно, 2 системи візуалізації [3]. Використовували комерційний набір "Лектинтест" (м. Львів). Після постановки реакції кон'югації з першим лектином із проявленням продуктів реакції діамінбензидином (продукти реакції мали коричневий колір) на тому ж самому гістологічному препараті ставили другу реакцію кон'югації з іншим лектином із проявленням продуктів реакції α -нафтолом, дофарбованим кристалфіолетом (продукти реакції мали фіолетовий колір). Гістологічні препарати занурювали у гліцерин-желатин. Комбінацію лектинів підбирали емпіричним і теоретичним шляхами. З огляду на власні дослідження і дані інших дослідників, було підбрано найбільш вдалу комбінацію лектинів для вивчення антигенпрезентуючих клітин (соя і конконовалін А та арахіс і конконовалін А). Результати реакції оцінювали напівкількісним методом.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На 18-ту добу пренатального розвитку антигенпрезентуючі клітини виявляють на межі плодової і материнської частин плаценти. Вони тісно контактують із поодинокими гігантськими трофобластичними клітинами. Розміри їх соми – до 30 мкм, візуалізується декілька виходів відростків. Розміри ядер – 8–10 мкм, вони мають коричневе забарвлення, тобто по каріолемі накопичуються вуглеводи, що мають рецептори до лектинів арахісу та сої. Інтенсивність забарвлення, враховуючи напівкількісний метод, відбулася на +. Одночасно виявляють макрофаги з типовим ядром, у яких забарвленість більш інтенсивна і характеризується на ++++. В цитоплазмі антигенпрезентуючих клітин

накопичуються вуглеводовмісні сполуки, що проявляють спорідненість до лектину конконоваліну А, тому цитоплазма має фіолетовий колір (+++). У макрофагів цитоплазма слабофіолетового кольору (+), також присутній коричневий відтінок (+). На поверхні цитоплазматичної мембрани в антигенпрезентуючих клітин виявляють одиничні бісерні нашарування коричневих часточок.

Як відомо, найбільш ранньою, а пізніше центральною функцією імунної відповіді є антигенрозпізнаюча роль імунітету. Розпізнаються маркери "свого", загальні для всього організму, і такими маркерами є найбільш архаїчні молекули міжклітинної адгезії – кадгерини. Кадгерини – трансмембранні глікопротеїни. Кадгерини опосередковують гомо- і гетеротипічну адгезію, тому як антигенрозпізнаючі рецептори вони еволюційно закріпилися і збереглися на антигенпрезентуючих клітинах. Так, відомо, що в шкірі, плаценті, лімфатичних вузлах антигенпрезентуючі клітини мають на цитоплазматичній мембрані рецептори з вуглеводними залишками (D-Gal) і проявляють спорідненість до лектину арахісу (PNA). Оскільки вагітність в експериментальних тварин перебігала фізіологічно, на поверхні антигенпрезентуючих клітин не виявили значної кількості рецепторів до лектинів арахісу і сої, що свідчить про їх помірну функціональну активність, тобто про підтримку імунологічної толерантності в системі мати–плацента–плід.

Функція протокадгеринів тісно пов'язана з функцією протеосом. Протеосоми – мультикаталітичні високомолекулярні ендопротеази, які відіграють провідну роль у процесингу антигенів. Засіб процесування детермінується спектром протеаз і тим самим специфічним типом рецептора, активація якого ініціює синтез протеаз для презентації розпізаного імуногена. Рецептор-активатор протеаз має уніфіковану будову [13]. Рецептори-активатори функціонують паралельно з молекулами головного комплексу гістосумісності та з протеосомним апаратом.

Контроль над процесом підтримки постійності внутрішнього середовища багатоклітинного організму відбувається внаслідок процесування сингенів або гомоалогенів на протеосомах (ендогенним шляхом) в антигенпрезентуючих клітинах. Процесування антигенів сингенного або гомоалогенного походження призводить до утворення супрамолекулярних комплексів – частково розщеплених антигенів з молекулами I класу головного комплексу, що зіставляється антигенпре-

зентуючими клітинами з автохтонним варіантом організму. Процесування алогенів та сингенів, на відміну від ксеногенів, відбувається трансмембранними толлоподібними рецепторами (Toll-like receptors – TLR) [14]. Рецептори головного комплексу гістосумісності мають у своєму складі вуглеводну частину. Якщо вуглеводний ланцюг не редукований, він закінчується фукозою і сіаловою кислотою, які завжди перебувають у дистальному положенні до поліпептидного ланцюга, тоді як ацетилгалактозамін і галактоза – в проксимальному положенні й часто утворюють зв'язок з амінокислотами в молекулах білків, перш за все аспарагіном, серином, тріоніном, гідроксизиною і гідроксипроліном. Найбільшу концентрацію рецепторів головного комплексу гістосумісності відмічають на цитоплазматичній поверхні антигенпрезентуючих клітин, тому виявлення вуглеводних залишків галактози до і після десіалування можна вважати реакцією специфічною [12].

Яку ж роль відіграють вуглеводи, споріднені до конконоваліну А, яких так багато в цитоплазмі антигенпрезентуючих клітин? Антигенрозпізнаюча функція дендритних клітин не обмежується розпізнаванням лише свого, а й чужого. Тому активуються манозовмісні рецептори.

Рецептори до манози зв'язують залишки D-манози, D-N-ацетилглюкозаміну, L-фукози, D-N-ацетилманозоаміну. Специфічне зв'язування вуглеводних залишків визначається наявністю в останніх двох екваторіально розташованих гідроксильних груп у положеннях 3 і 4, що формують водневі зв'язки з парами амінокислот. Кожна з гідроксильних груп пов'язана з Ca^{2+} , що відіграє ключову роль у стабілізації ліганд-білкового комплексу. Галактоза, що має гідроксильну групу OH_4 в аксіальному положенні, не здатна утворювати подібні комплекси. Саме ця обставина перешкоджає зв'язуванню манозозв'язуючого лектину з глікопротеїнами клітин еукаріотів, термінальне положення в яких займають галактоза, сіалові кислоти та їх похідні. Тому в нормі залишки манози на клітинах багатоклітинного організму повинні бути екрановані, наприклад сіаловою кислотою, що є основою дискримінації "своє-чуже" [5].

Оголення залишків D-галактози і N-ацетил-D-галактозаміну лежить в основі молекулярного механізму розпізнавання ендogenous манозними лектинами, що розміщені на цитоплазматичній поверхні, мононуклеарних фагоцитів і дендритних клітин чужорідних макромолекул [4].

Манозний рецептор є трансмембранним білком I типу, N-кінцева частина якого локалізована поза клітиною, з коротким (45 кислотних залишків) цитоплазматичним фрагментом. Позаклітинна частина, що бере участь в детекції залишків термінально локалізованих маноз, представлена вісьма доменами, характерними для лектинів C-типу, короткого N-кінцевого фрагмента, збагаченого цистеїном і фібронектиновим повтором II типу. Фібронектинова частина має вуглеводну частину (Cal β 1-CalNac α), яка є спорідненою до лектину арахісу (PNA) [15].

На 20-ту, 22-гу доби вагітності й на час пологів, із стоншенням шару клітин, що несуть неklasичні рецептори головного комплексу гістосумісності, до повного їх зникнення, антигенпрезентуючі клітини починають контактувати з клітинами плідного походження, які експресують рецептори головного комплексу гістосумісності. Антигенпрезентуючі клітини активуються, і в них посилюється експресія рецепторів як до арахісу, сої, так і до конконоваліну А. Тому клітини мають інтенсивні хромогенні мітки (коричневого кольору – +++ і фіолетового – ++++). Візуалізуються відростки у клітин, можна дослідити їх довжину і товщину.

Подібні зміни в морфології дендритних клітин описали автори, які вивчали морфологічні зміни дендритних клітин у клітинних культурах і периферичній крові [16].

ВИСНОВКИ. 1. Антигенпрезентуючі клітини плаценти мають рецептори до лектинів арахісу, сої, конконоваліну А, що відповідає їх антигенрозпізнаючій і антигенпрезентуючій функціям.

2. На час пологів на цитоплазматичній мембрані антигенпрезентуючих клітин збільшується кількість рецепторів до арахісу, сої і конконоваліну А, що є маркером зростання їх функціональної активності й вказує на відміну стану імунологічної толерантності материнського організму до плода.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гаврилюк А. М. Сучасні напрямки розвитку імунології репродукції / А. М. Гаврилюк, М. Курпіш // Медицинские аспекты здоровья женщины. – 2011. – № 3 (42). – С. 5–12.
2. Кокряков В. Н. Очерки о врожденном иммунитете / В. Н. Кокряков. – СПб. : Наука, 2006. – 261 с.
3. Луцик А. Д. Лектины в гистохимии / А. Д. Луцик, Е. С. Детюк, М. Д. Луцик. – Львов : Выща школа, 1988. – 109 с.
4. Сельков С. А. Иммунологические механизмы контроля развития плаценты / С. А. Сельков, Д. И. Соколов // Журнал акушерства и женских болезней. – 2010. – В. 1. – Т. LIX. – С. 6–11.
5. Akira S. The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses / S. Akira, K. Hoshino, T. Kaisho // J. Endotoxin. Res. – 2000. – **6** (5). – P. 383–387.
6. BDCA-1+, BDCA-2+ and BDCA-3+ dendritic cells in early human pregnancy deciduas / Y.-L. Ban, B.-H. Kong, X. Qu [et al.] // Exp. Immunol. – 2008. – **151** (3). – P. 399–406.
7. CD83⁺dendritic cells in the decidua of women with recurrent miscarriage and normal pregnancy / K. Askelund, H. S. Liddell, A. M. Zanderigo [et al.] // Placenta. – 2004. – **25**. – P. 140–145.
8. Chen M.-L. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF- β signals in vivo / M.-L. Chen, L. Pittet, M. J. Gorelik // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – **102**. – P. 419–424.
9. Coulam C. D. Correlation of NK cell activation and inhibition markers with NK cytotoxicity among women experiencing immunologic implantation failure after in vitro fertilization and embryo transfer / C. D. Coulam, R. G. Roussev // J. Ass. Reprod. Gene. – 2003. – **20**. – P. 58–62.
10. Gardner L. Dendritic Cells in the Human Decidua / L. Gardner, A. Moffett // Biology of reproduction. – 2012. – **245**. – P. 1223–1234.
11. Identification of cytotoxic lymphocytes in decidua at term / K. Calazka, P. Basta, K. Piekutowski [et al.] // Archives of Perinatal Medicine. – 2010. – **16** (1). – P. 26–31.
12. Kadowaki N. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens / N. Kadowaki, S. Ho // J. Exp. Med. – 2001. – **194**. – P. 863–869.
13. Lipscomb M. F. Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease / M. F. Lipscomb, B. J. Masten // Physiol. Rev. – 2002. – **82**. – P. 97–130.
14. Opal S. M. Bench-to-bedside review: Toll-like receptors and their role in septic shock / S. M. Opal, C. E. Huber // Crit. Care. – 2002. – **6** (2). – P. 125–136.
15. Stahl P. D. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense / P. D. Stahl, R. A. Ezekowitz // Curr. Opin. Immunol. – 1998. – **10**. – P. 50–55.
16. Thiel S. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response / S. Thiel, U. Holmskov, L. Hviid // Clin. Exp. Immunol. – 2009. – **90**. – P. 31–35.

О. Г. Куц

ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

УГЛЕВОДНЫЙ КОД АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТОК ПЛАЦЕНТЫ

Резюме

Дендритные клетки являются важной составляющей иммунной системы плаценты, что обусловлено их многочисленными регуляторными и эффекторными функциями. Плюрипотентность плацентарных дендритных клеток состоит, с одной стороны, в презентации антигена лимфоцитам и активации иммунного ответа, с другой – в развитии иммунологической толерантности материнского организма по отношению к плоду. Антигенпрезентирующие клетки плаценты несут рецепторы к лектинам арахиса, сои, конконовалина А, что отвечает их антигенраспознающей и антигенпрезентирующей функциям. К родам на цитоплазматической мембране антигенпрезентирующих клеток увеличивается количество рецепторов к лектинам арахиса, сои, конконовалина А, что является маркером возрастания их функциональной активности и отмены состояния иммунологической толерантности материнского организма по отношению к плоду.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антигенпрезентирующие клетки, плацента, лектины.

CARBOHYDRATE CODE ANTIGEN PRESENTING CELLS OF PLACENTA

Summary

Dendritic cells are an important component of the immune system of the placenta, which causes them to numerous regulatory and effectors functions. Plyurypotentnist placental dendritic cells are, on the one hand, the presentation of antigen to lymphocytes and activation of the immune response, and the other in the development of immunological tolerance of the parent body in relation to the fetus. Antigen presenting placental cells have receptors for lectins peanut, soybean, konkonovalinu A that suits their antyhenrozpiznayuchiy and antyhenprezentuyuchiy function. At the time of delivery to the cytoplasm membrane antyhenprezentuyuchyh cells increases the number of receptors for peanut, soybean and konkonovalinu A, which is a marker for the growth of their functional activity and abolish the state of immunological tolerance maternal organism to the fetus.

KEY WORDS: antyhen presenting cells, placenta lectin.

Отримано 06.05.14

Адреса для листування: О. Г. Куц, вул. Тovarиська, 43, кв. 42, Запоріжжя, 69121, Україна, e-mail: sidorov0240@mail.ru.