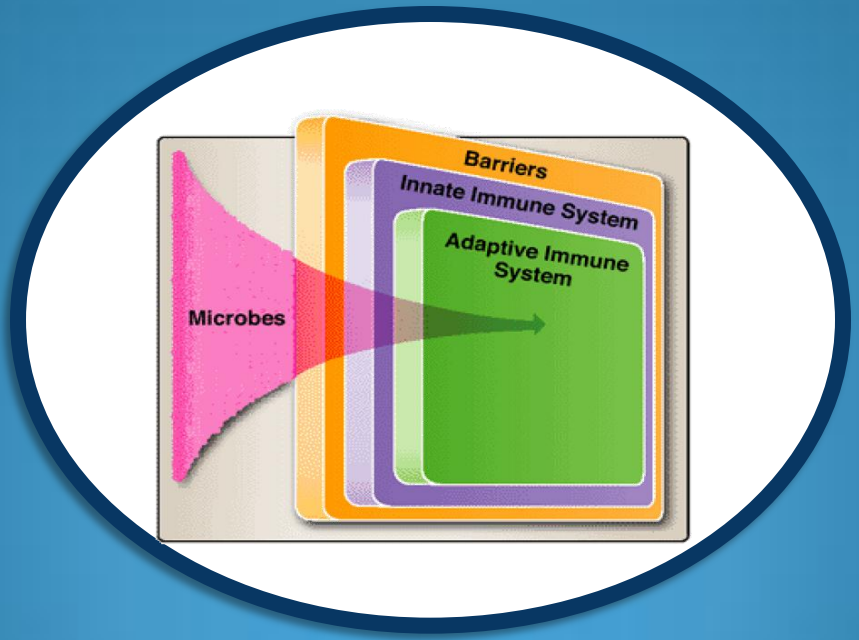
เอกสารประกอบการสอนวิชาจุลชีววิทยาทั่วไป (01419211)
เรื่อง ระบบภูมิคุ้มกัน (immune system)

โดย อ.ดร. อิงอร กิมกง
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค

1. ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม (environmental factors)

- เชื้อก่อโรค (pathogens) เช่น แบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา ปรสิต
- สารเคมี สารพิษ
- สภาพภูมิอากาศ ที่อยู่อาศัย สถานะภาพทางครอบครัว

2. ปัจจัยทางด้านโฮสต์ (host factors)

- กลไกการป้องกันตัวของโฮสต์ (host defense mechanism)**
- อายุ เพศ การศึกษา โภชนาการ พันธุกรรม

**ระบบภูมิคุ้มกัน (immune system)

แอนติเจน (antigen; Ag) หรือ อิมมูโนเจน (immunogen)

มีความเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร?

- แอนติเจน คือ สารใดๆ ก็ตามที่สามารถจับกับโมเลกุลของแอนติบอดี (antibody) หรือตัวจับจำเพาะของ T cell (T cell receptor) ได้

  เรียกคุณสมบัตินี้ว่า “antigenicity”

- อิมมูโนเจน คือ สารใดๆ ก็ตามที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity ได้

  เรียกคุณสมบัตินี้ว่า “immunogenicity”

****All immunogens are antigens, but not all antigens are immunogens!!**

คุณสมบัติของ immunogen ที่ดี

1. Foreigness

- เป็นสิ่งแปลกปลอมของร่างกาย
- sequestered antigens ใน immunological privileged sites เช่น เชื้ออสุจิ (sperm), กระจกตา (cornea) และเนื้อสมอง ?

2. Molecular size

- สารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ (>10 kDa) จะมี immunogenicity ดีกว่าสารที่มีขนาดเล็ก

คุณสมบัติของ immunogen ที่ดี (ต่อ)

3. Chemical composition

- โปรตีน, คาร์โบไฮเดรต, ไขมัน และกรดนิวคลีอิก

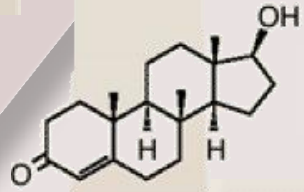
4. Complexity

- สารที่มีสูตรโครงสร้างซับซ้อนจะเป็นอิมมูโนเจนที่ดีกว่าสารที่มีสูตรโครงสร้างง่าย ๆ เช่นพวก polymer จะกระตุ้นได้ดีกว่าพวก monomer

Complex proteins

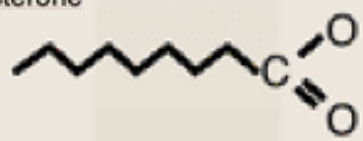
Simple peptides / proteins

Carbohydrate

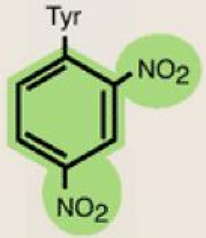


Testosterone

Steroids

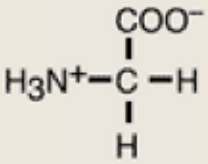


Lipids



2,4-dinitrophenyl-tyros

Haptens



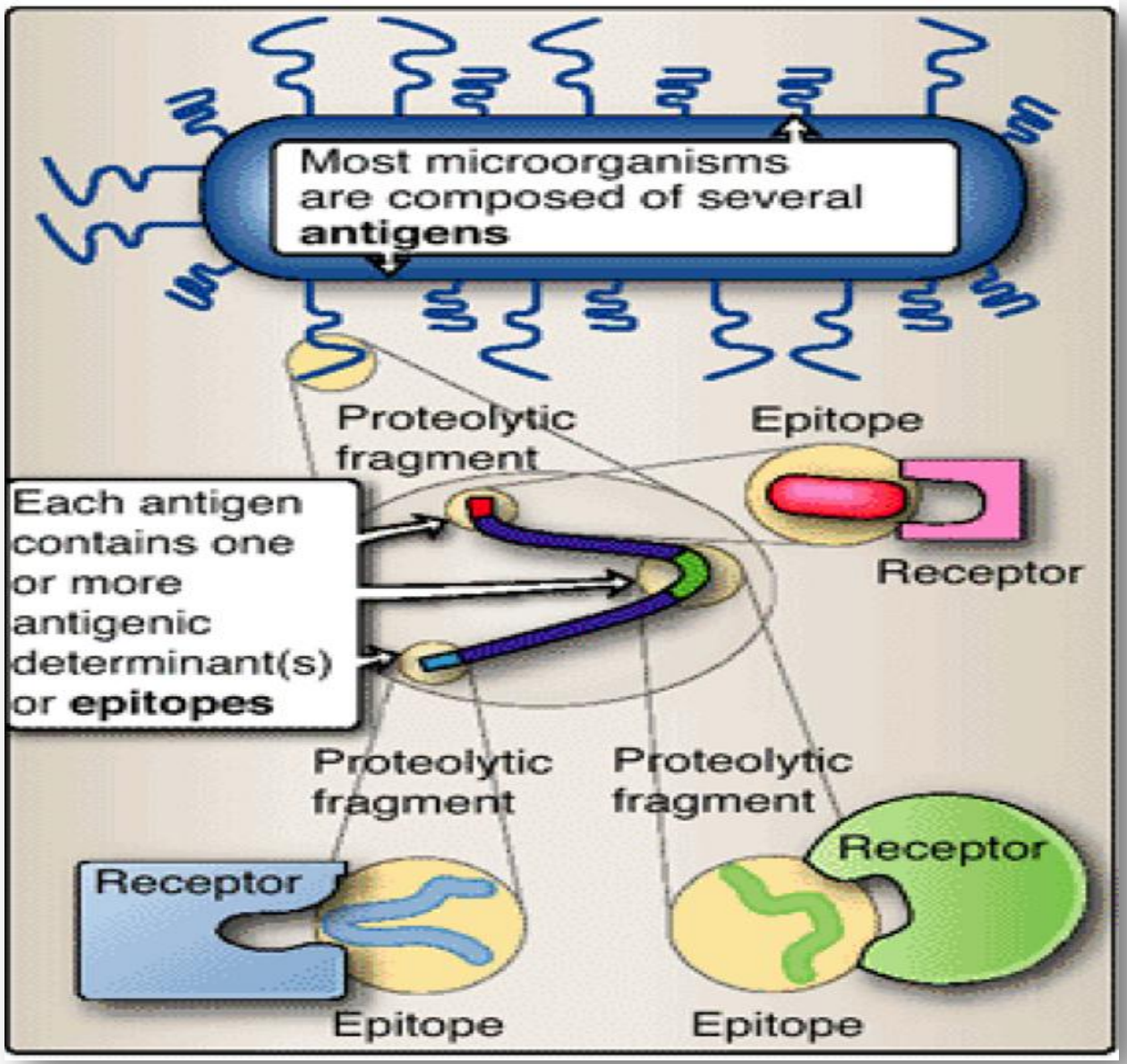
Glycine

Amino acids

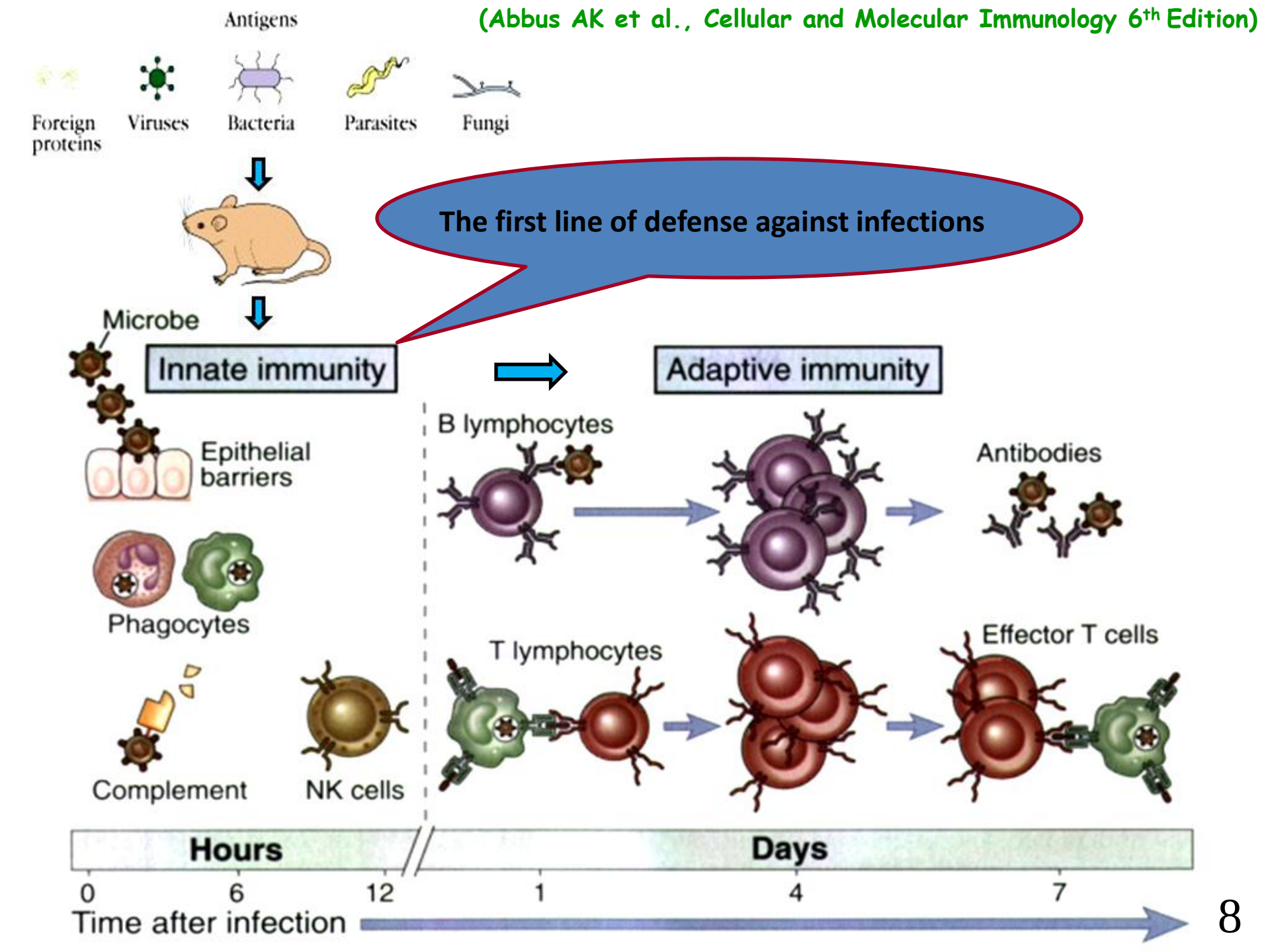
Increasing Immunogenicity

Epitopes (Antigenic or immunogenic determinants)

- ตำแหน่งย่อยบนโมเลกุลของแอนติเจนที่กระตุ้น immune response



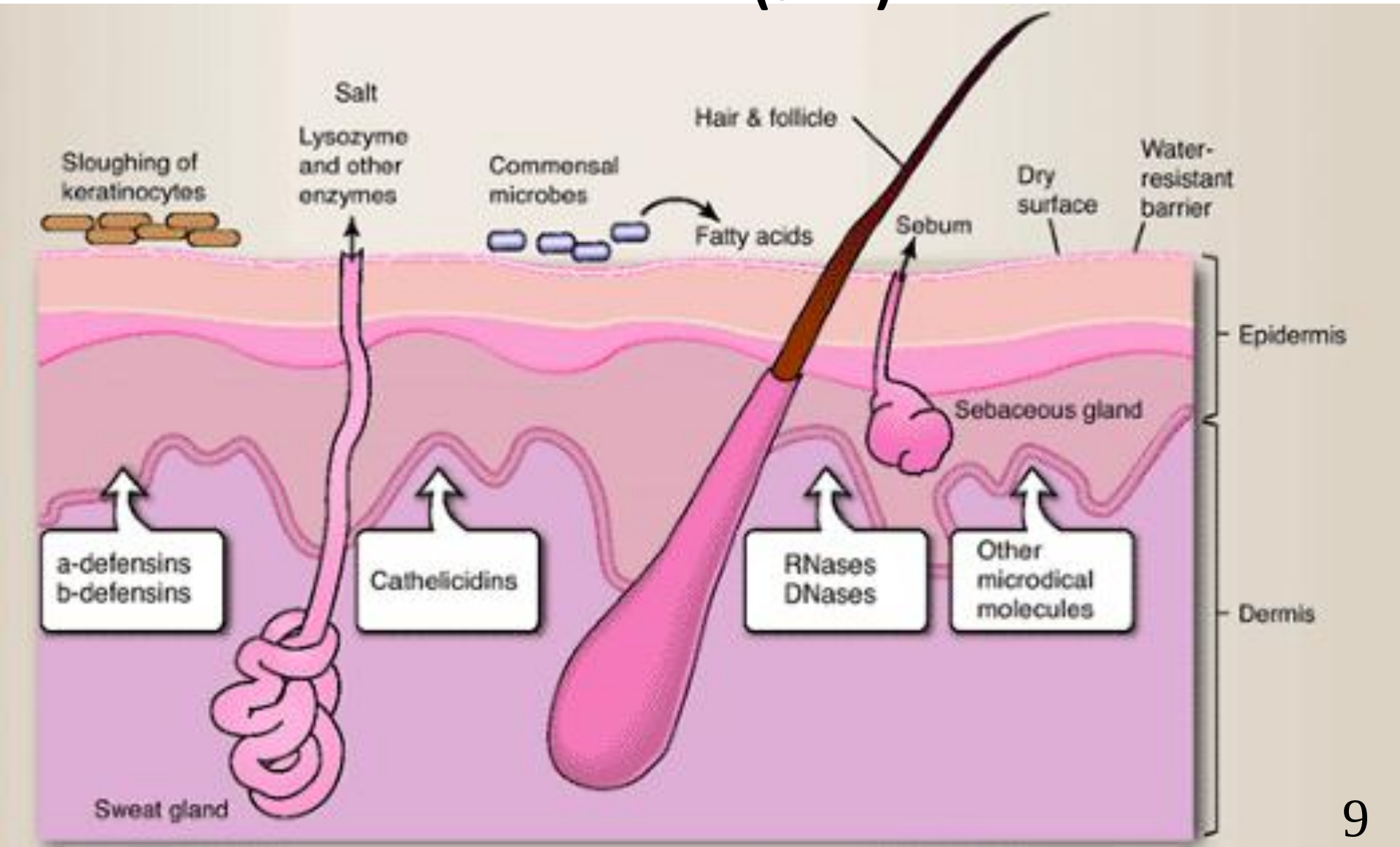
(Abbus AK et al., Cellular and Molecular Immunology 6th Edition)



Components of innate immunity and their functions

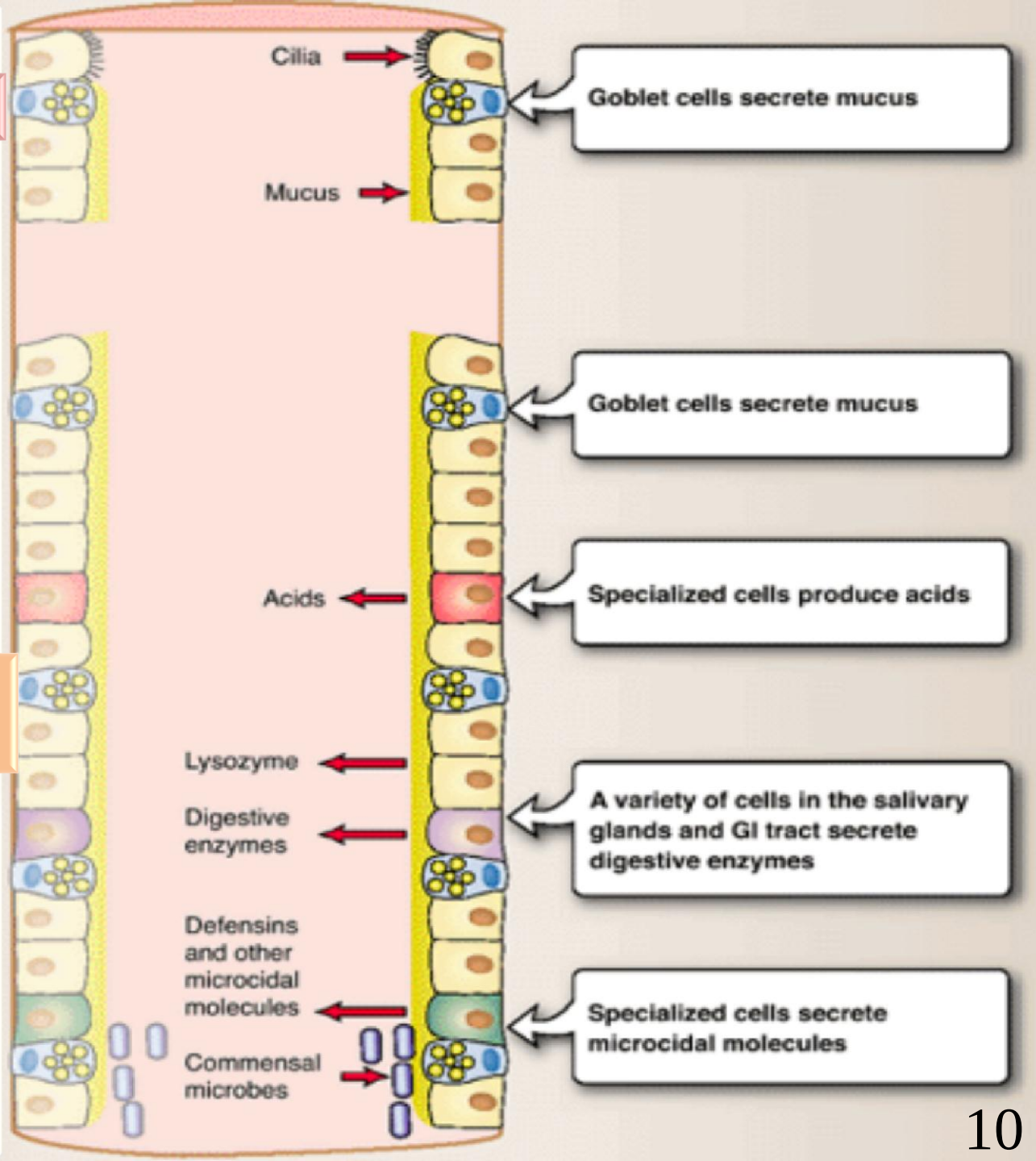
1. Barriers

ผิวหนัง **(skin)**

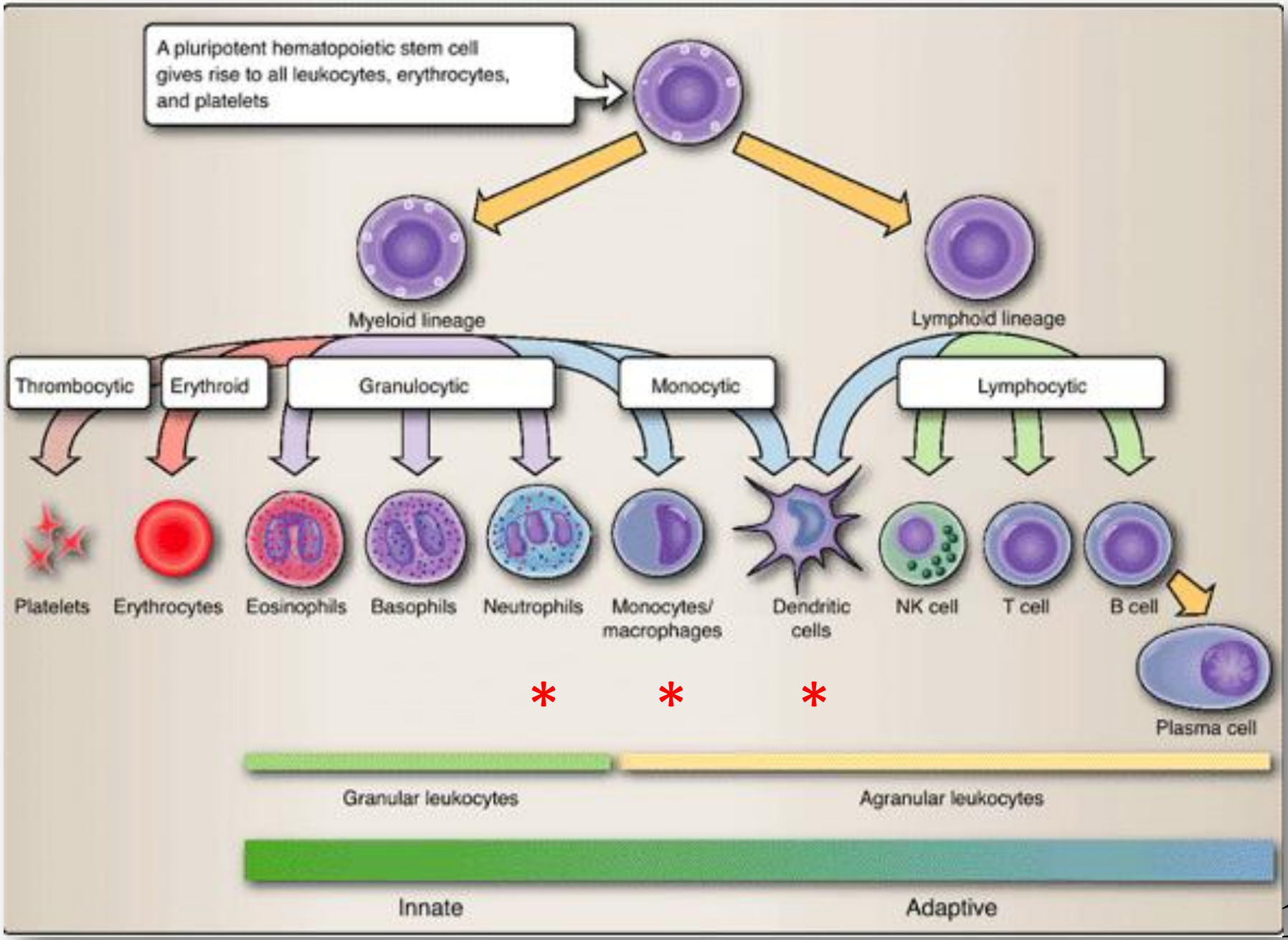


Respiratory epithelium

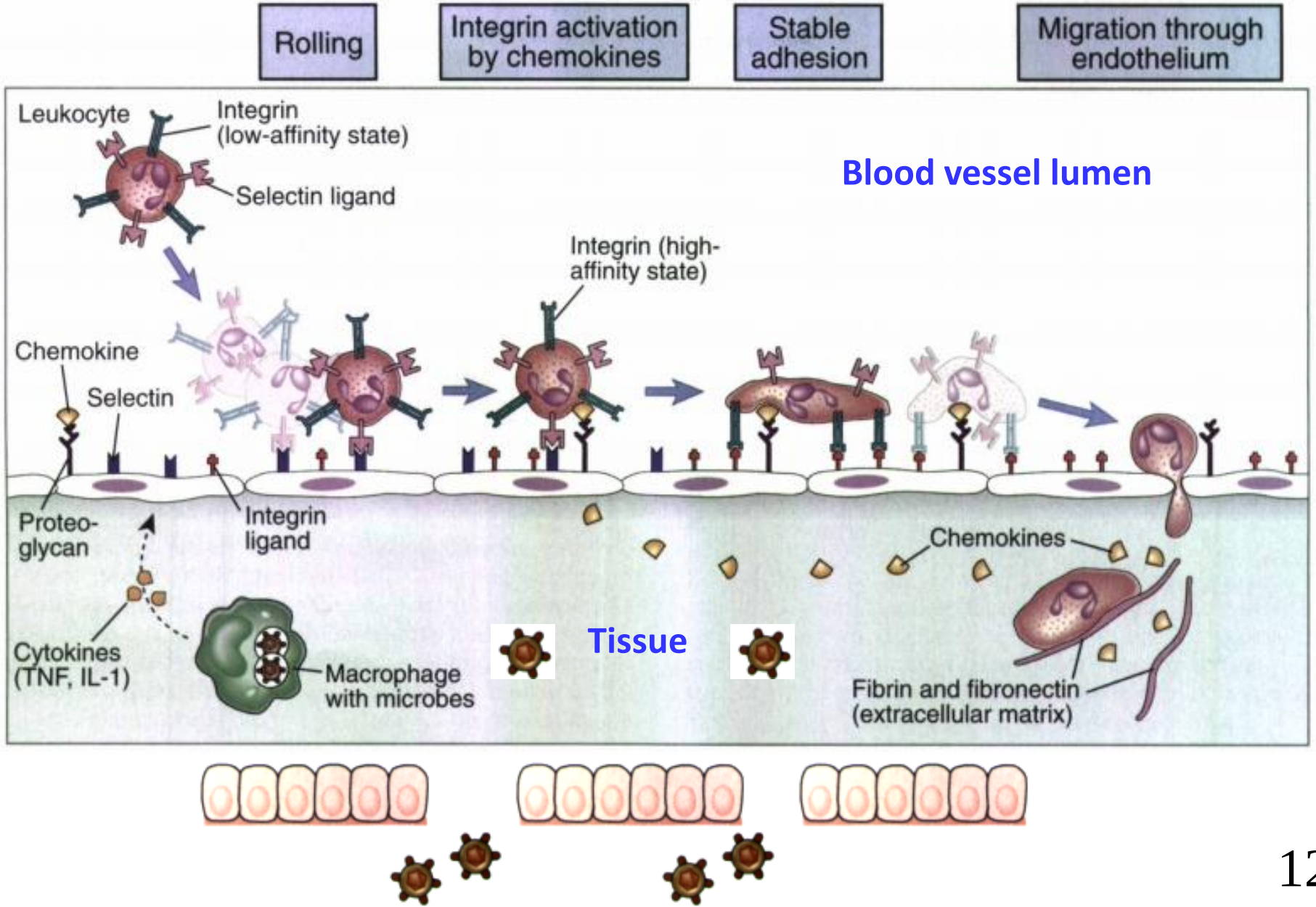
Gastrointestinal and urogenital epithelium



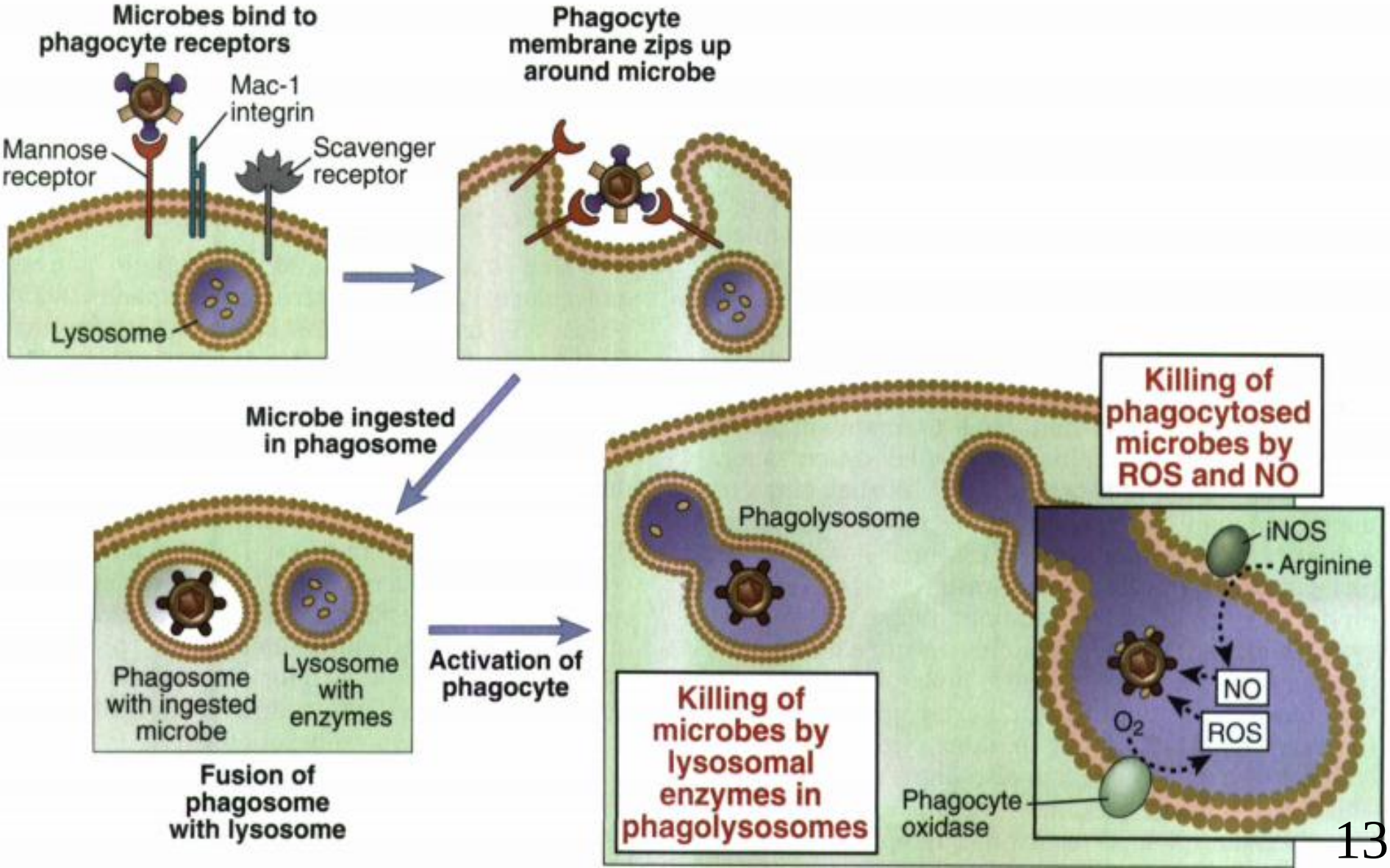
2. Phagocytes -> white blood cells (leukocytes)



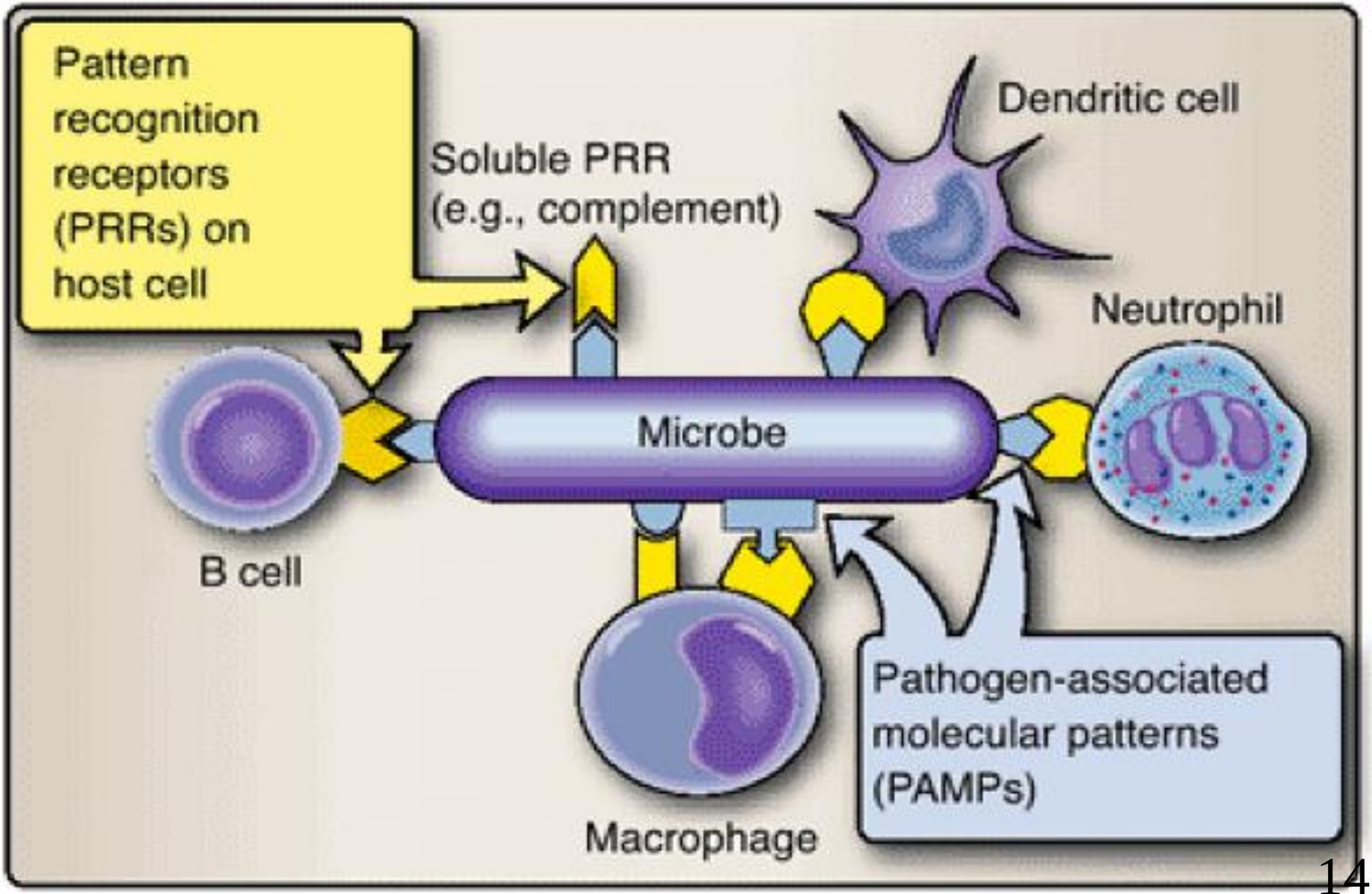
Recruitment of leukocytes



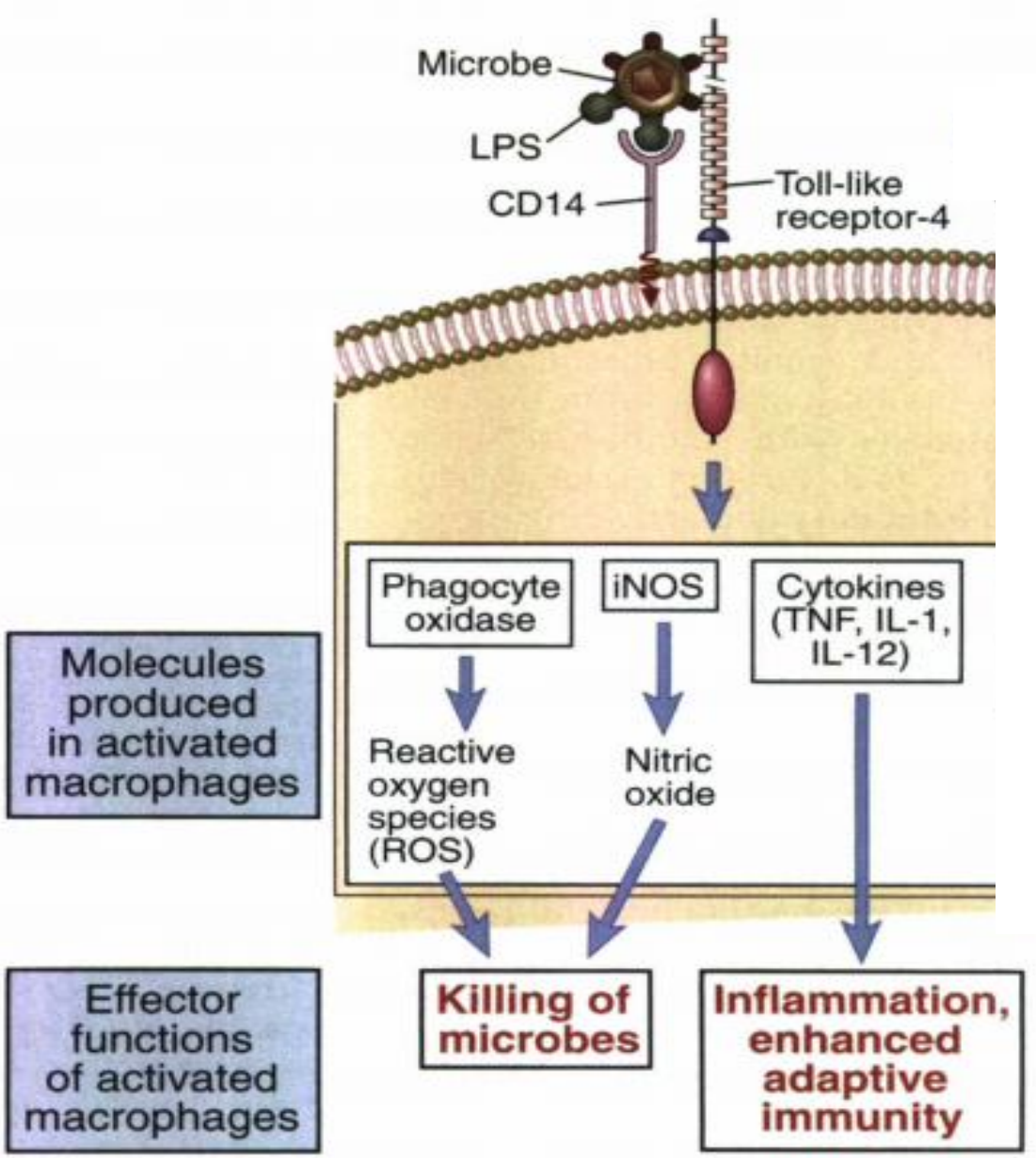
Phagocytosis & intracellular destruction of microbes



Pattern recognition in innate immune system



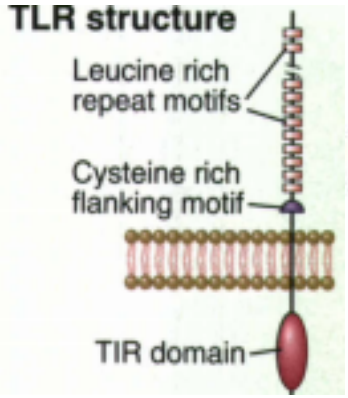
Other Functions



Toll-like receptor s(TLRs)

- are an evolutionarily conserved family of pattern recognition receptors expressed on many cell types.
- play essential roles in innate immune responses to microbes.
- Toll was originally identified as a Drosophila gene involved in establishing the dorsal-ventral axis during embryogenesis of the fly.
- Subsequently, it was discovered that the Toll protein also mediated antimicrobial responses.

Toll-like receptor (TLR)



PAMPs	Bacterial triacylated lipopeptides	Bacterial peptidoglycan, lipoprotein, lipotechoic acid, and porins; Viral hemagglutinin	Gram negative bacterial LPS; Fungal mannans; Parasitic phospholipids; Viral envelope proteins; Host heat shock proteins	Bacterial flagellin	Bacterial diacylated lipopeptides and lipotechoic acid
Receptors	TLR1:TLR2	TLR2	TLR4	TLR5	TLR2:TLR6

Plasma membrane

Recruitment of adapter proteins

Recruitment and activation of protein kinases

Activation of transcription factors

Gene transcription

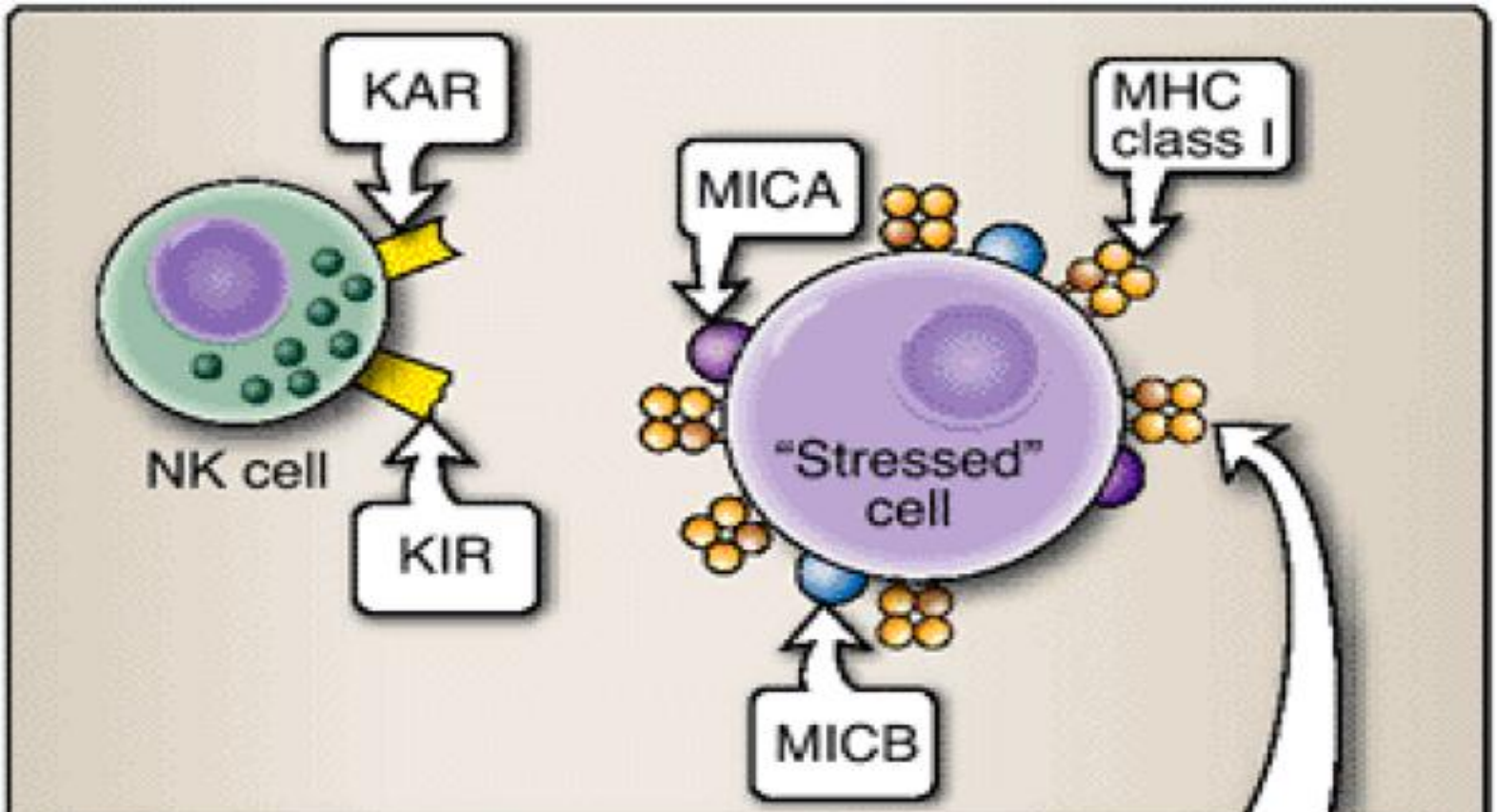
Expression of
Inflammatory cytokines (TNF, IL-1, IL-12)
Chemokines (IL-8, MCP-1, RANTES)
Endothelial adhesion molecules (E-selectin)
Costimulatory molecules (CD80, CD86)
Antiviral cytokines (IFNα/β)

Receptors	PAMPs
TLR3	Viral DS RNA
TLR7	Viral single stranded RNA
TLR8	Viral single stranded RNA
TLR9	Viral and bacterial unmethylated CpG DNA

Endosomal membrane

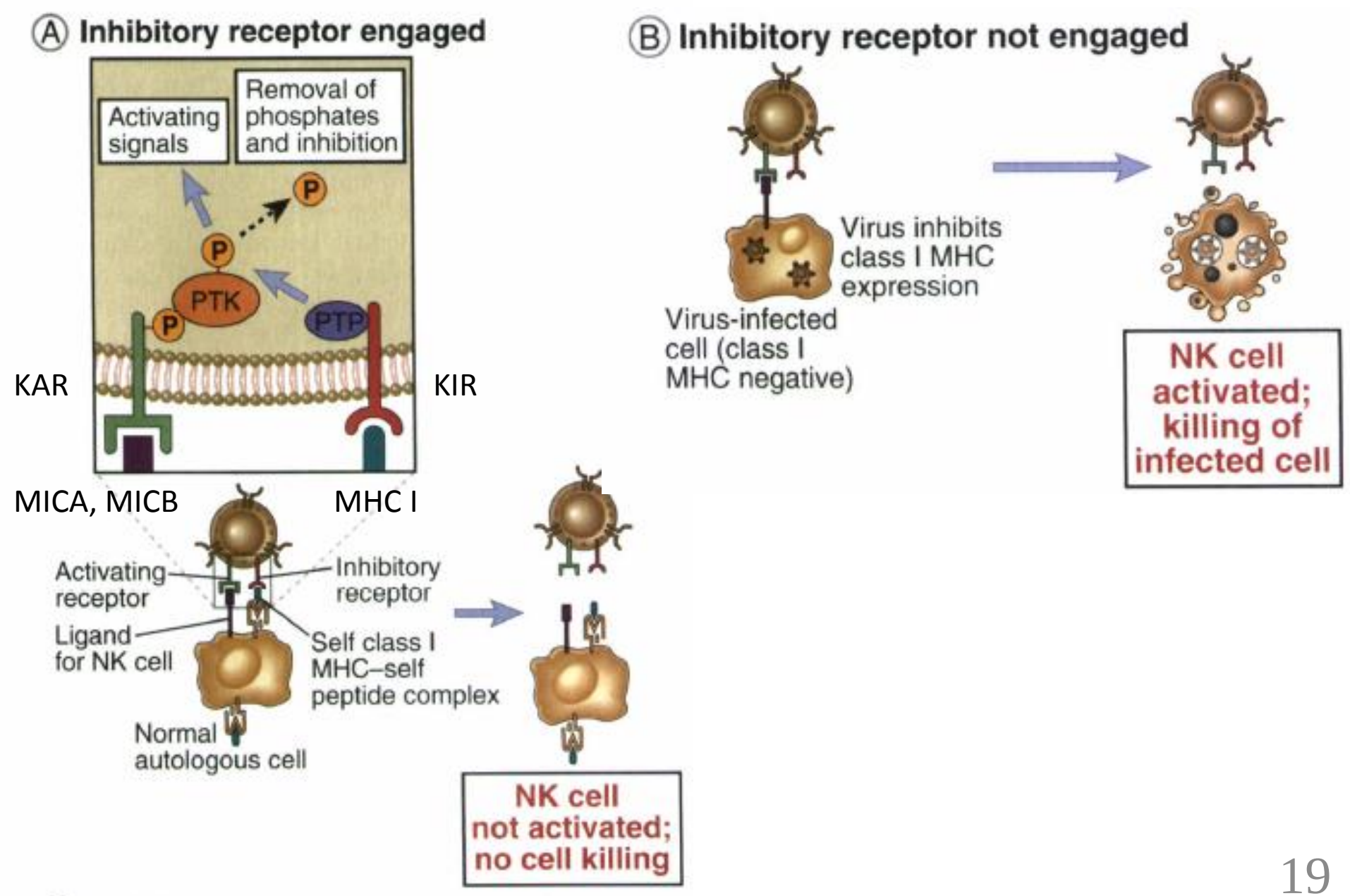
3. Natural Killer (NK) Cells

Virus infected & tumor cells



Natural killer (NK) cells bear killer activation receptors (KARs) that detect stress-related molecules, MICA and MICB, and killer inhibition receptors (KIRs) that detect MHC class I molecules on nucleated cells in the body.

Functions of NK cells



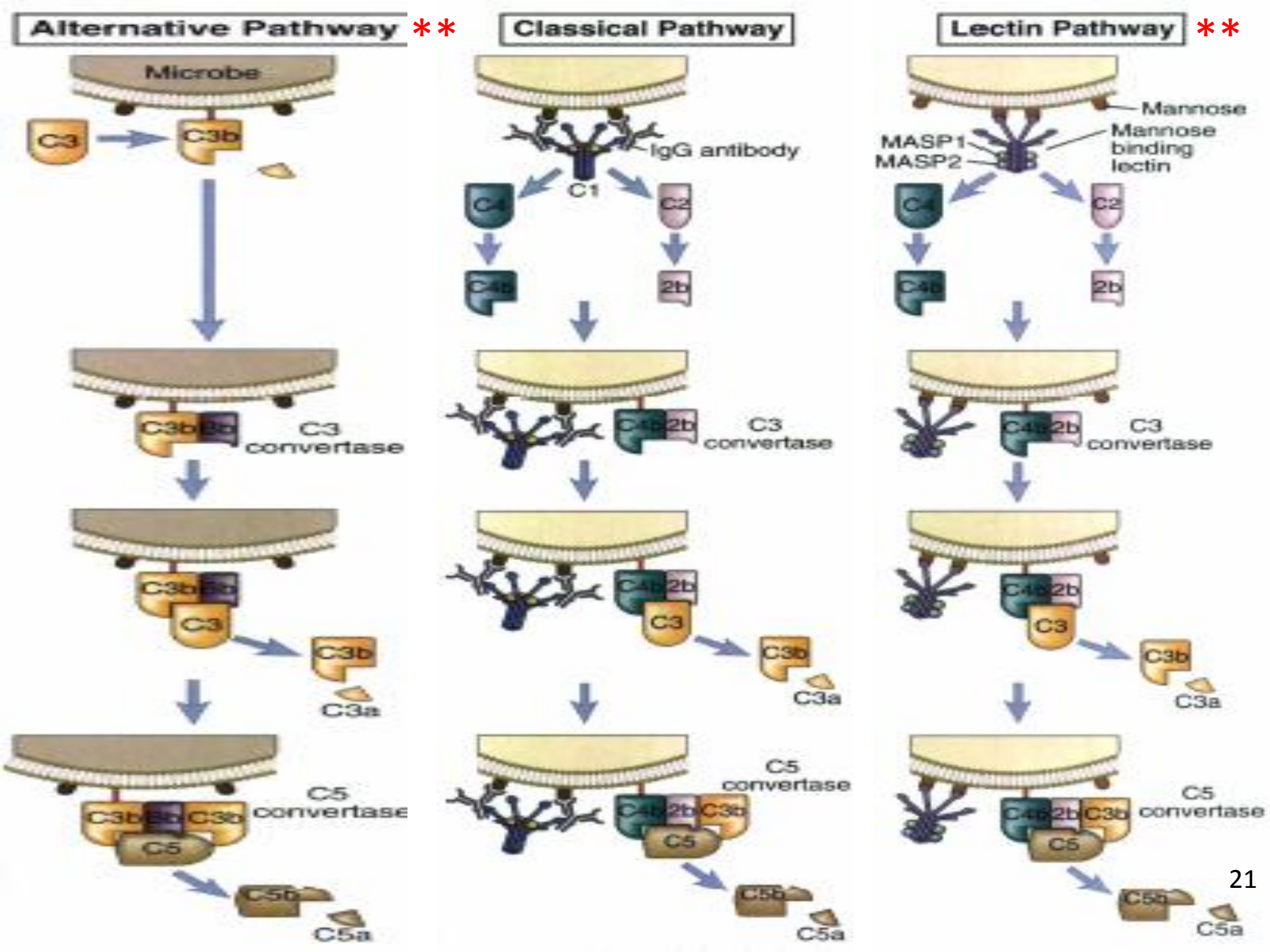
4. The Complement System

- คอมพลีเมนต์เป็นโปรตีนที่อยู่ในเลือด
- ทำหน้าที่ในการป้องกันตัวของโฮสต์ (host defense)
- มีความสำคัญในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกับทั้งแบบ innate และ adaptive immunity
- การกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์แบ่งออกเป็น 3 pathways:

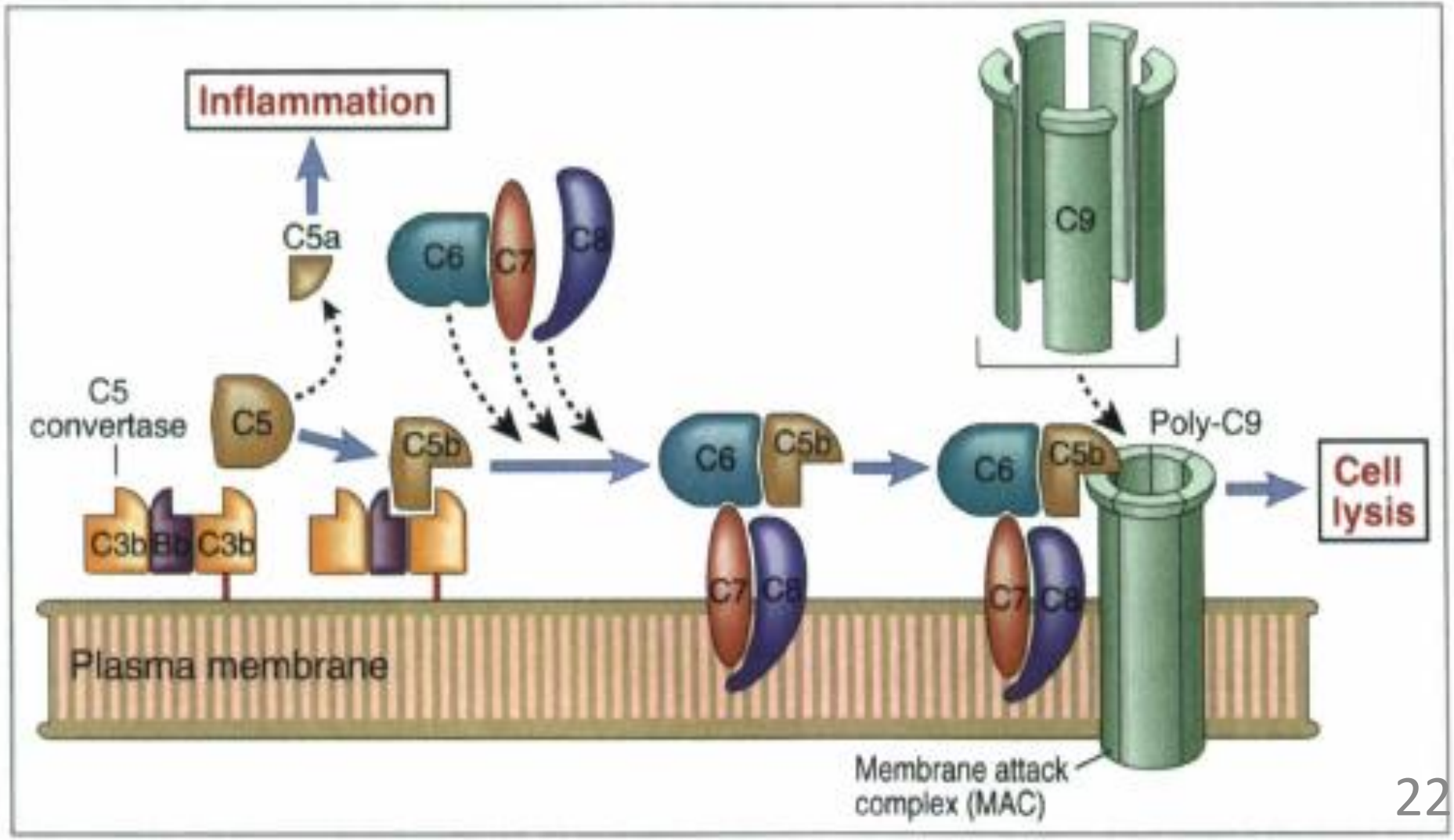
1. Classical pathway

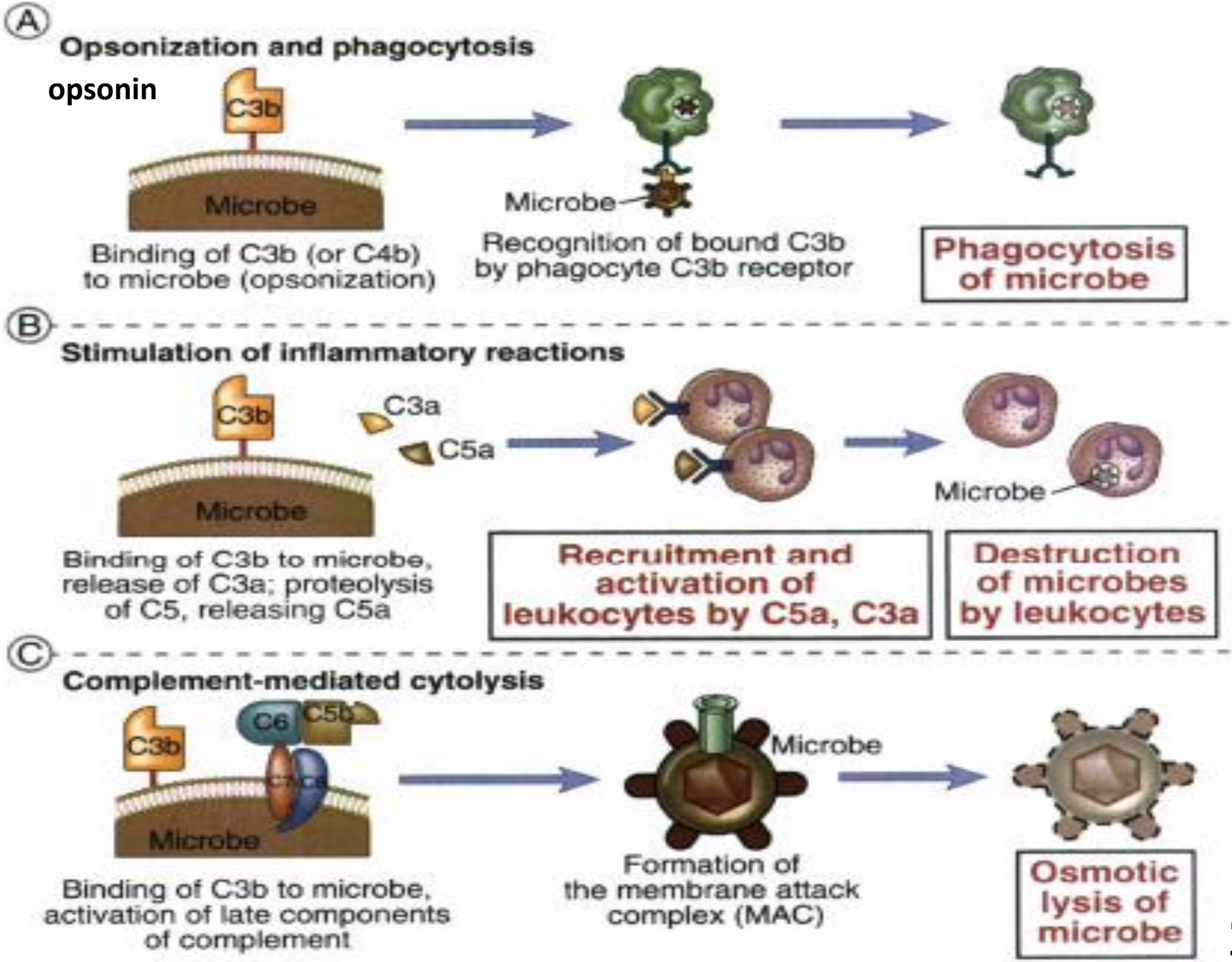
2. Alternative pathway*

3. Lectin pathway*


Alternative Pathway **
Classical Pathway
Lectin Pathway **
Microbe
C3
C3b
IgG antibody
C1
C2
C4
2b
Mannose
Mannose binding lectin
MASP1
MASP2
C3 convertase
C3b
C3a
C5 convertase
C5
C5b
C5a

late steps of complement activation and formation of MAC



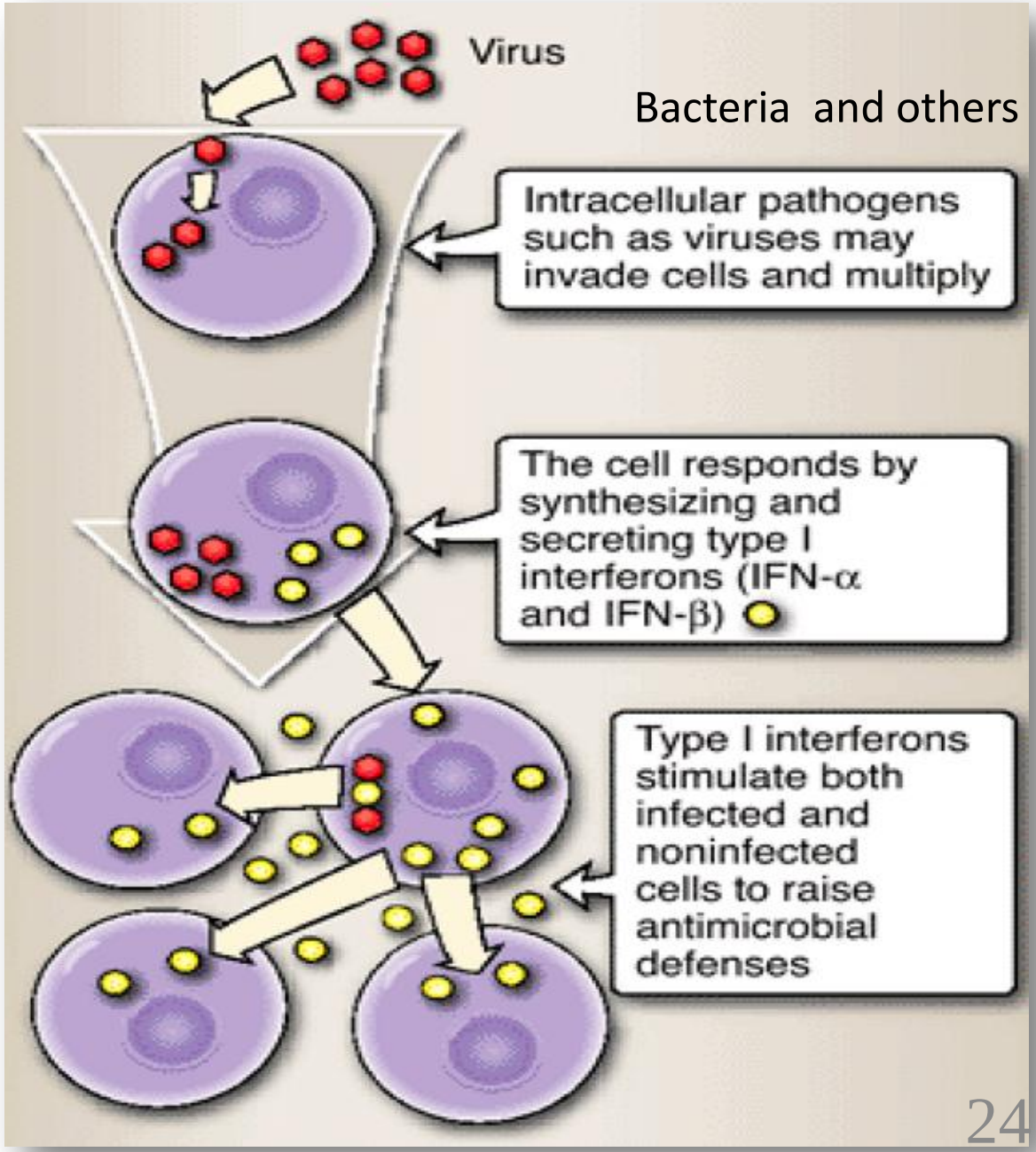

A
Opsonization and phagocytosis
opsonin
C3b
Microbe
Binding of C3b (or C4b) to microbe (opsonization)
Microbe
Recognition of bound C3b by phagocyte C3b receptor
Phagocytosis of microbe
B
Stimulation of inflammatory reactions
C3b
Microbe
Binding of C3b to microbe, release of C3a; proteolysis of C5, releasing C5a
C3a
C5a
Recruitment and activation of leukocytes by C5a, C3a
Microbe
Destruction of microbes by leukocytes
C
Complement-mediated cytolysis
C3b
C6
C5b
Microbe
Binding of C3b to microbe, activation of late components of complement
Microbe
Formation of the membrane attack complex (MAC)
Osmotic lysis of microbe

Components of innate immunity and their functions

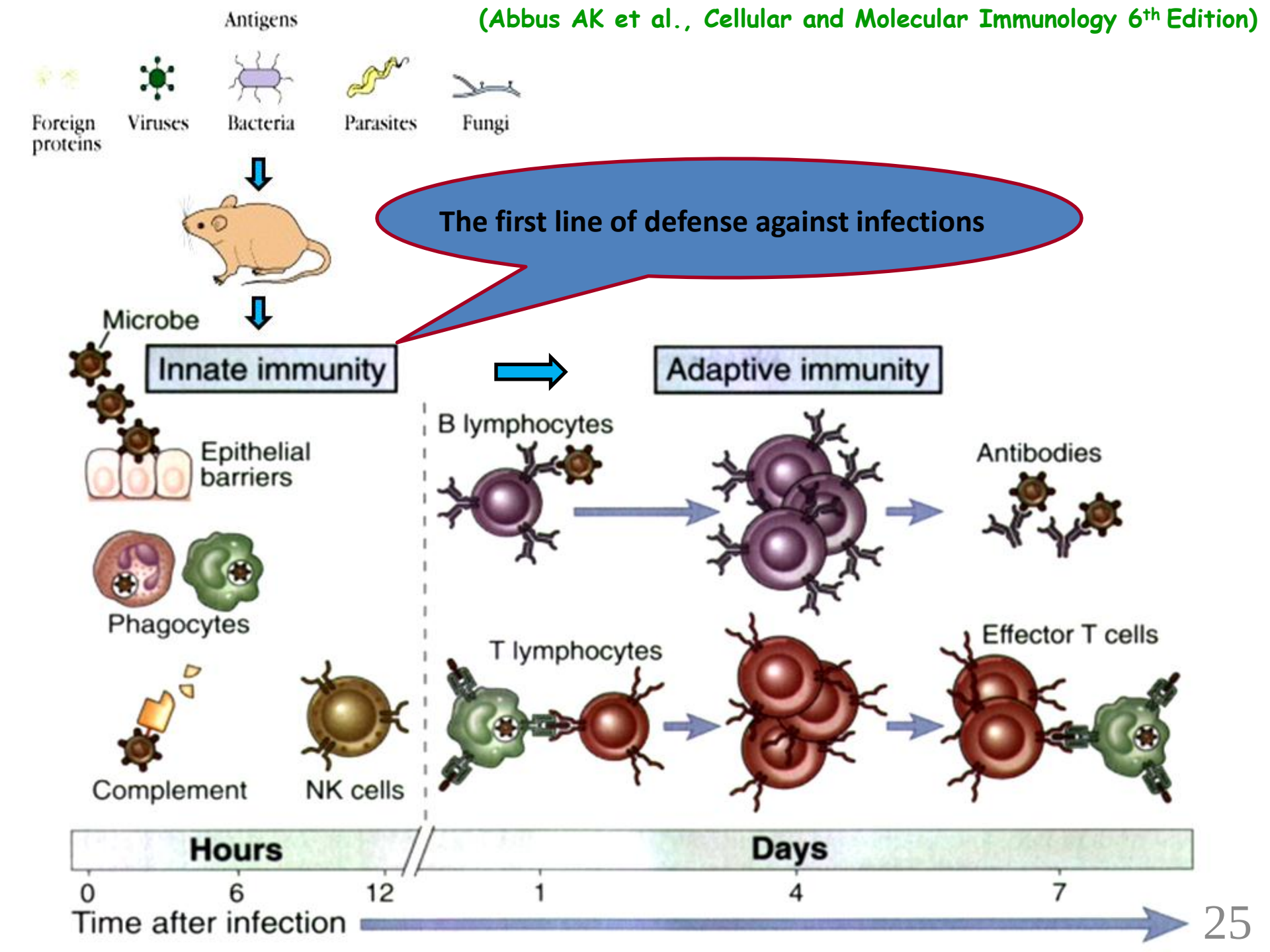
5. Interferon (IFN)

->Type I (α, β)**
-IFN-α สร้างจาก WBC
-IFN-β สร้างจาก fibroblast

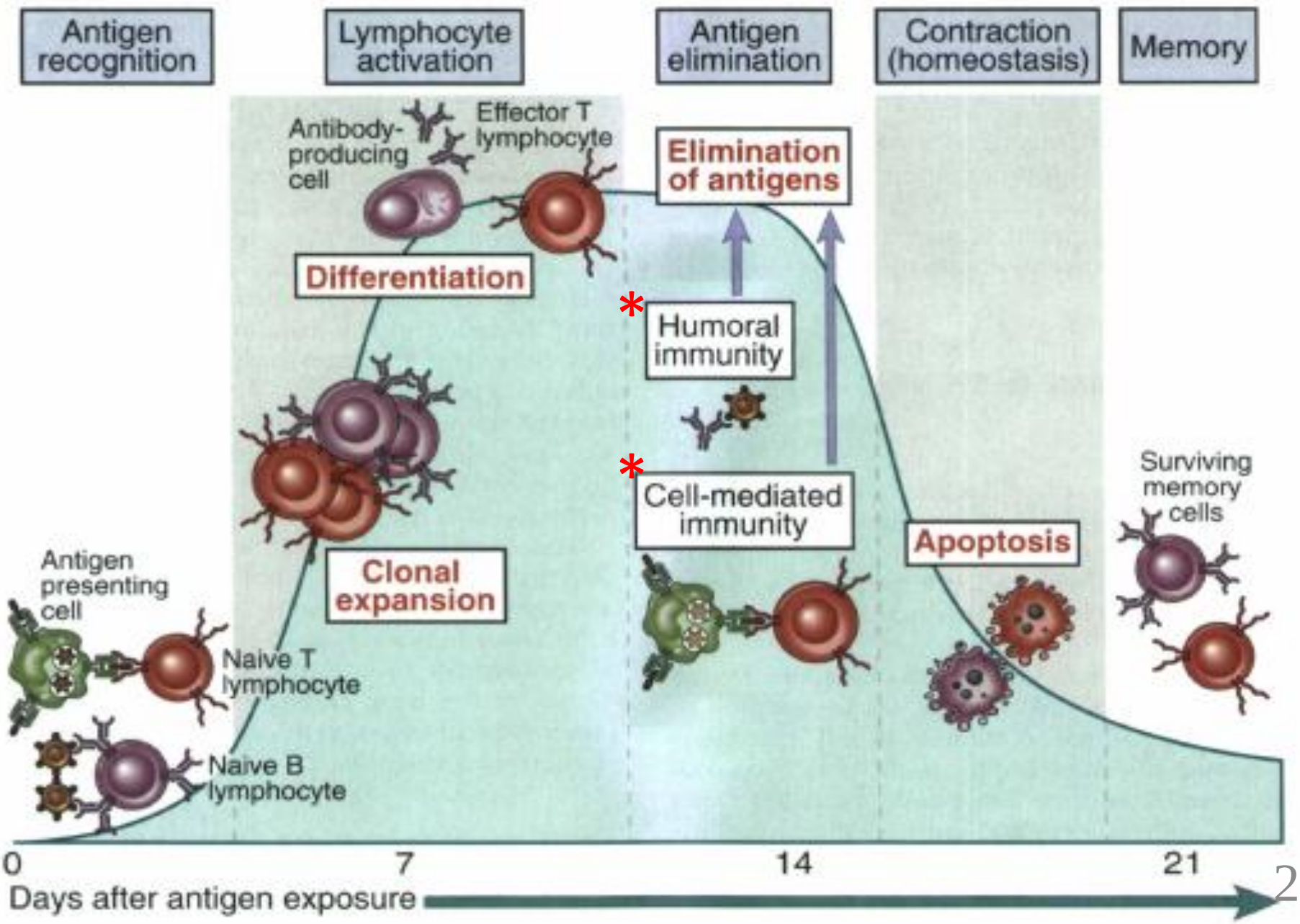
->Type II (γ)
-IFN-γ สร้างจาก T cell

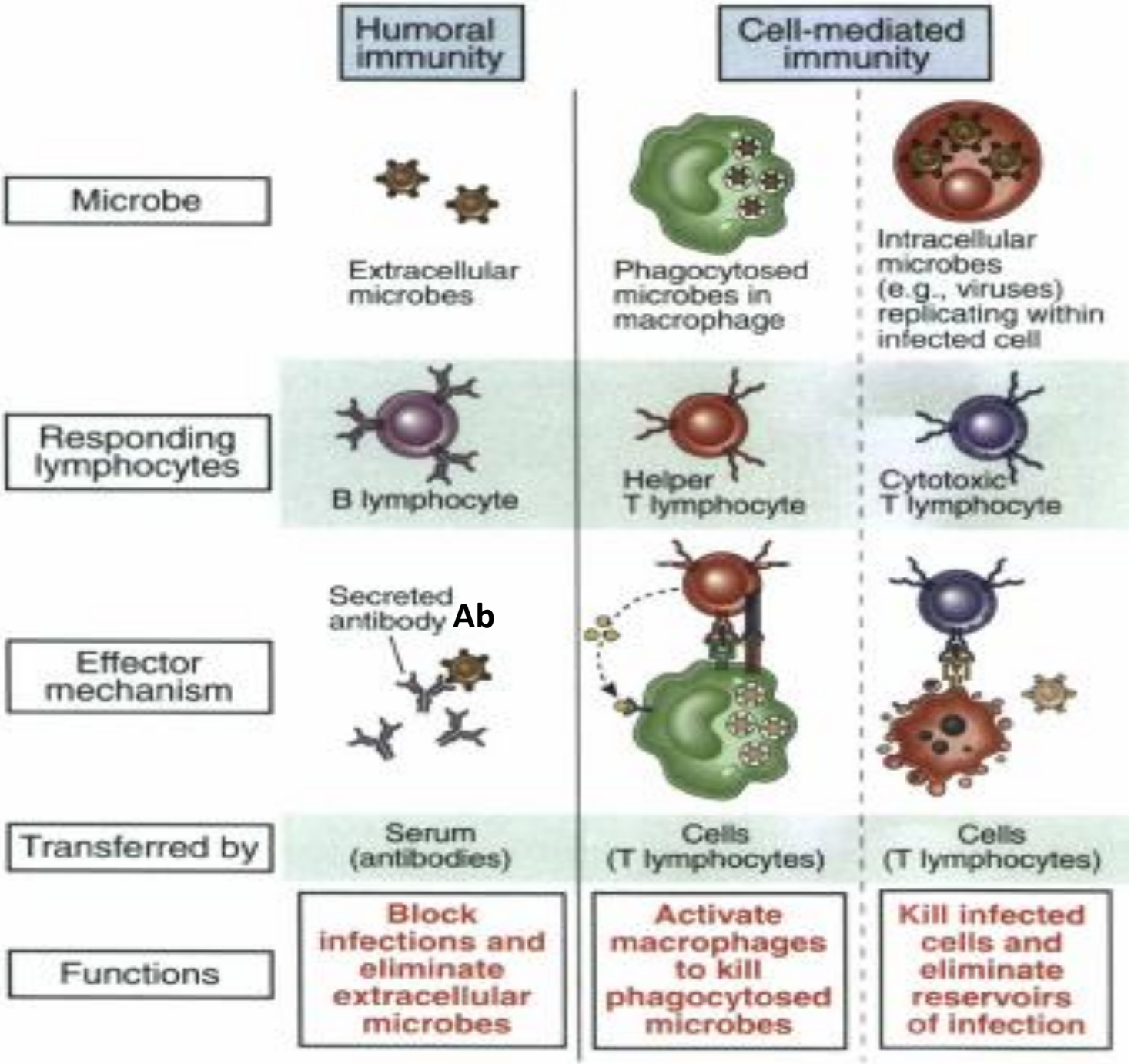


(Abbus AK et al., Cellular and Molecular Immunology 6th Edition)

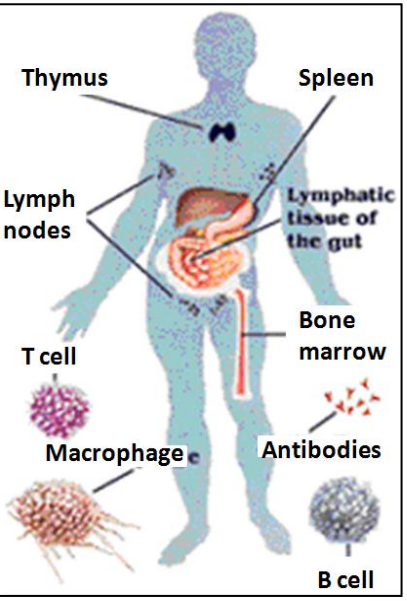


Adaptive immunity




Humoral immunity
Cell-mediated immunity
Microbe
Extracellular microbes
Phagocytosed microbes in macrophage
Intracellular microbes (e.g., viruses) replicating within infected cell
Responding lymphocytes
B lymphocyte
Helper T lymphocyte
Cytotoxic T lymphocyte
Effector mechanism
Secreted antibody Ab
Transferred by
Serum (antibodies)
Cells (T lymphocytes)
Cells (T lymphocytes)
Functions
Block infections and eliminate extracellular microbes
Activate macrophages to kill phagocytosed microbes
Kill infected cells and eliminate reservoirs of infection

Lymphocyte development



Primary (generative) lymphoid organs

- Source of lymphocyte progenitors
- Maturation of B lymphocytes
- Site of residence of long lived plasma cells

Bone marrow

Lymphocyte progenitor

Naive lymphocytes

B cells

T cells

Thymus

Maturation of T lymphocytes

Antigen presenting cell

Antigens/ microbes

Entry of infectious agents and/or environmental antigens

Lymphatic/ blood vessel

Mucosa/skin

Secondary (peripheral) lymphoid organs

Activation of lymphocytes and initiation of adaptive immune responses

Collection of antigens from tissues via lymph

Collection of antigens via blood

Lymph node

Spleen

Activation of lymphocytes and initiation of adaptive immune responses

Effector T lymphocytes and antibodies

Immunoglobulin (Ig)

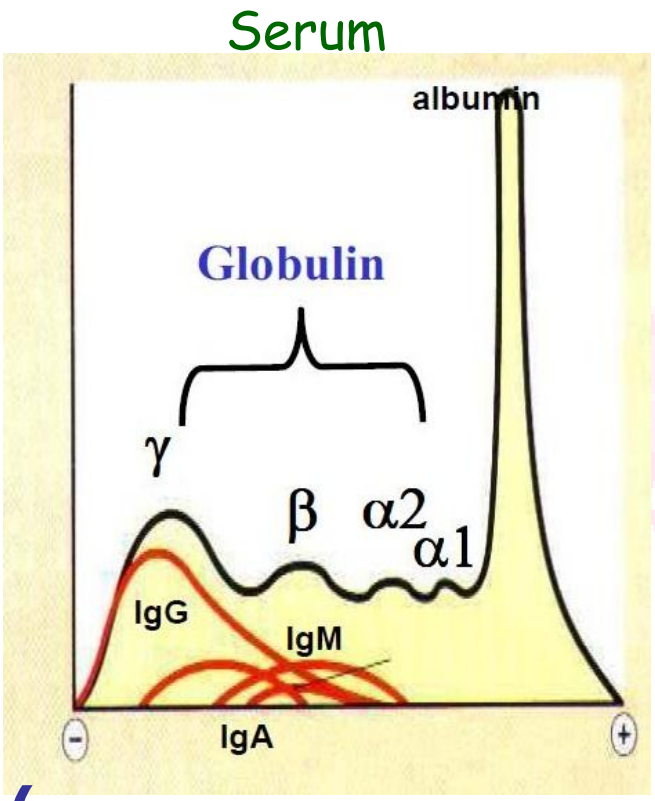
Antigens/ microbes

Mucosa/skin

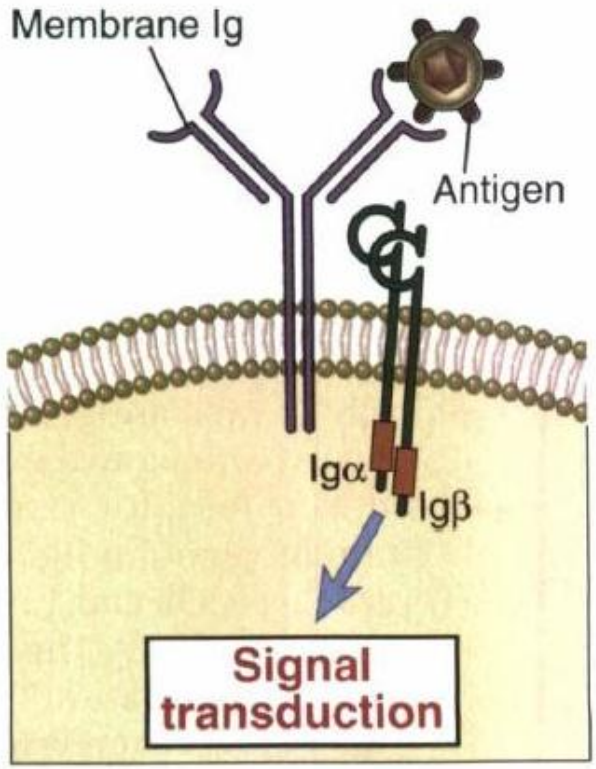
Humoral immunity (HMI) -> อาศัยแอนติบอดี

Antibody (Ab)/immunoglobulins (Ig) ??

- They are glycoproteins that are found in blood or other bodily fluids.
- There are 2 forms of Ig: secreted and membrane-bound forms.



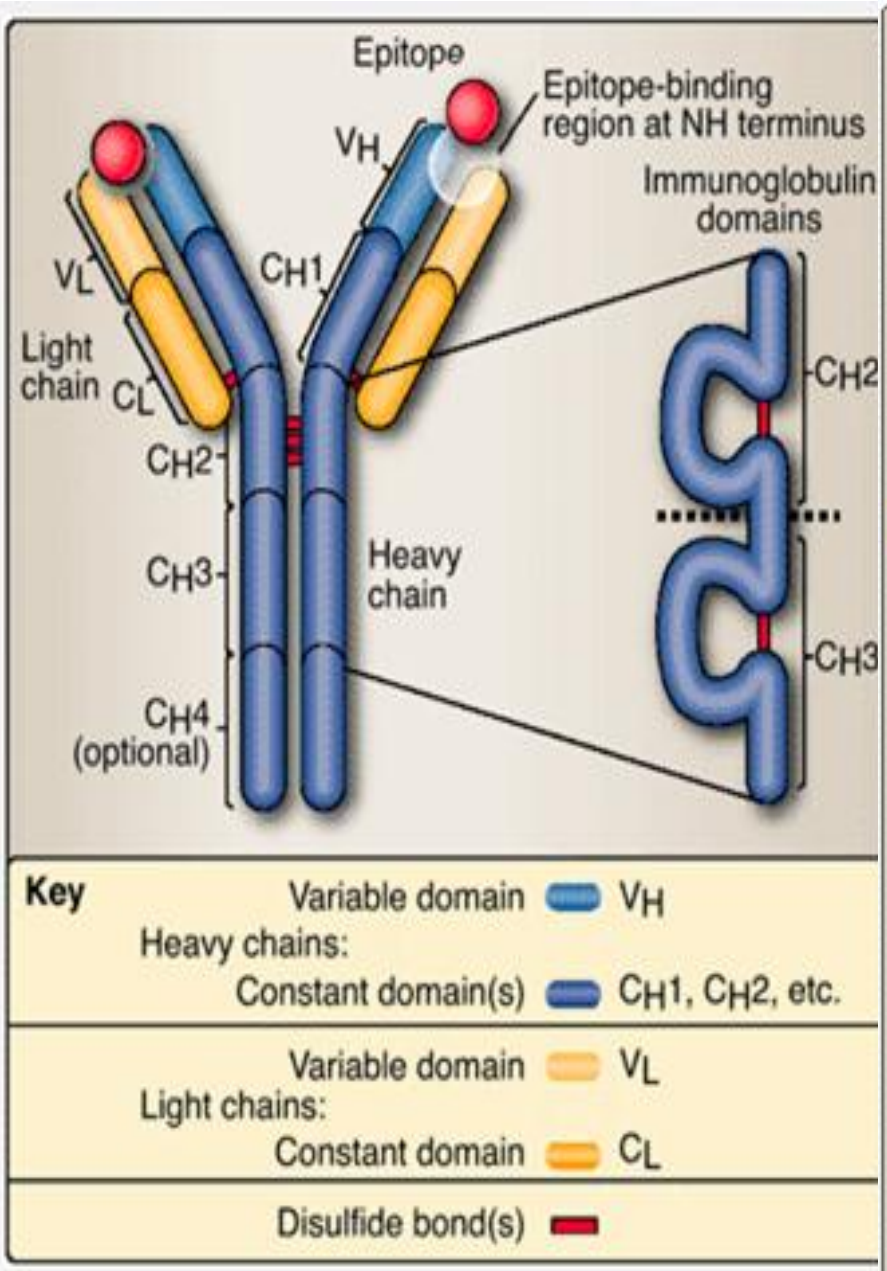
(A. Tiselius and E. A.Kabat, in 1939)

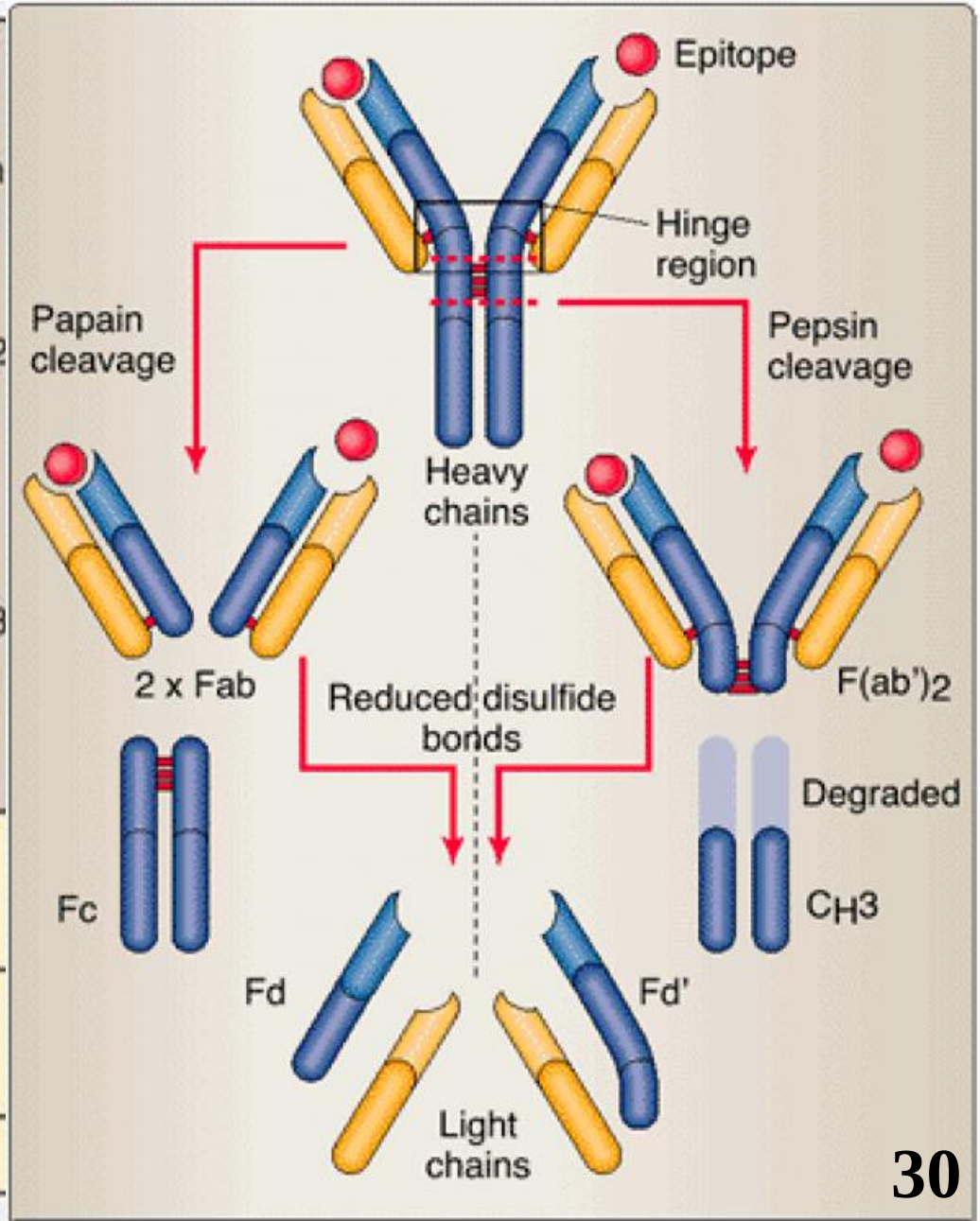


B cell

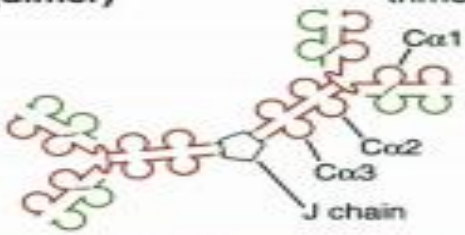
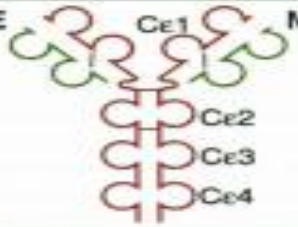
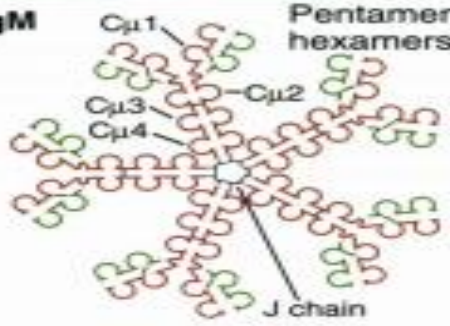
(Abbus AK; 6th ed, p138)

โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน

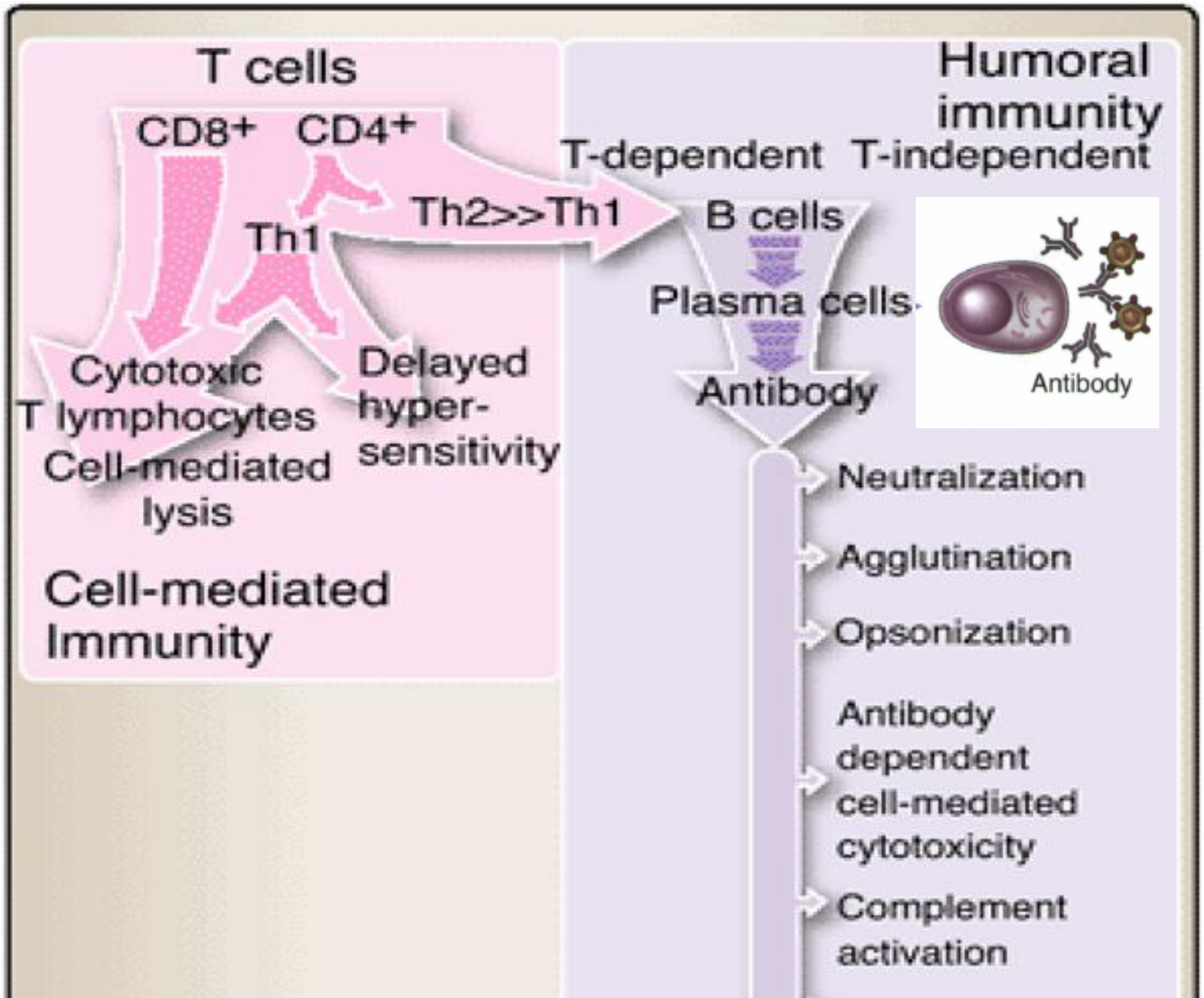




ชนิดของอิมมูโนโกลบูลินและความแตกต่าง

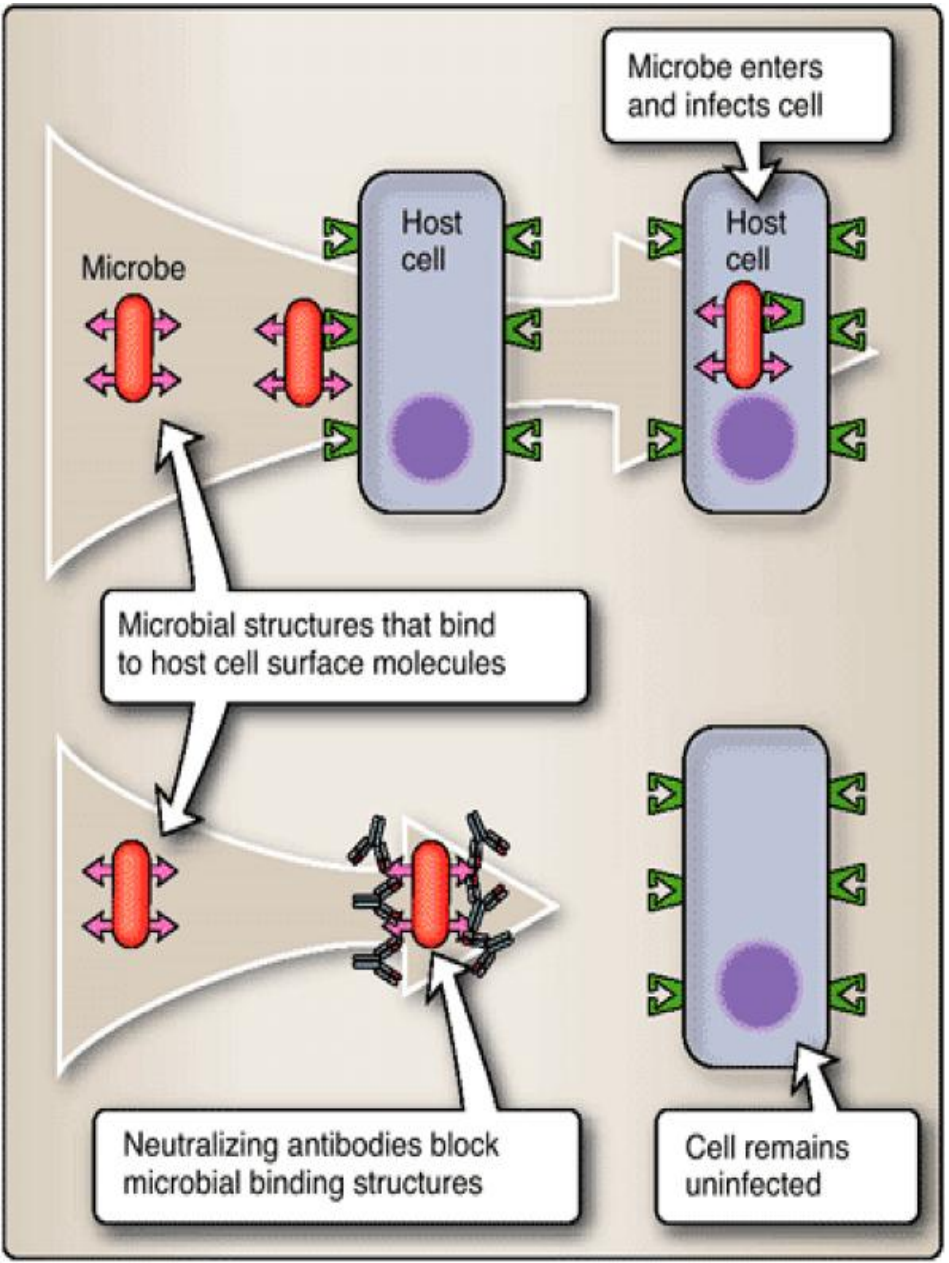
Isotype of antibody	Subtypes	H chain	Serum concentr. (mg/mL)	Serum half-life (days)	Secreted form	Functions
IgA	IgA1,2	α(1 or 2)	3.5	6	IgA (dimer) Monomer, dimer, trimer 	Mucosal immunity พบมากในสารคัดหลั่ง
IgD	None	δ	Trace	3	None	Naive B cell antigen receptor
IgE	None	ε	0.05	2	IgE Monomer 	Defense against helminthic parasites, immediate hypersensitivity สำคัญในการติดเชื้อพยาธิ และภาวะภูมิแพ้
IgG *	IgG1-4	γ(1,2,3 or 4)	13.5	23	IgG1 Monomer	Opsonization, complement activation, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, neonatal immunity, feedback inhibition of B cells
IgM	None	μ	1.5	5	IgM Pentamers, hexamers 	Naive B cell antigen receptor, complement activation

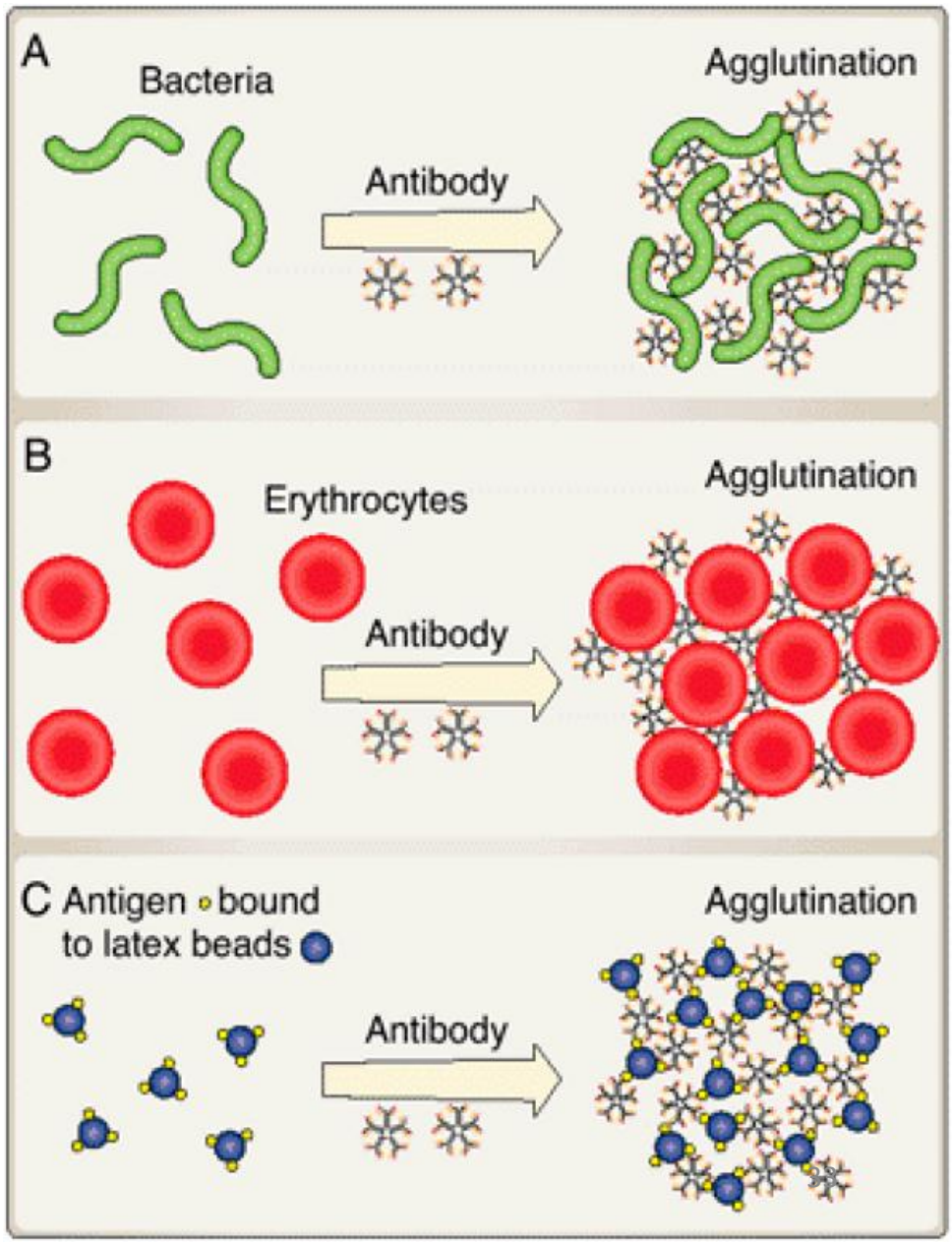
หน้าที่ของอิมมูโนโกลบูลิน



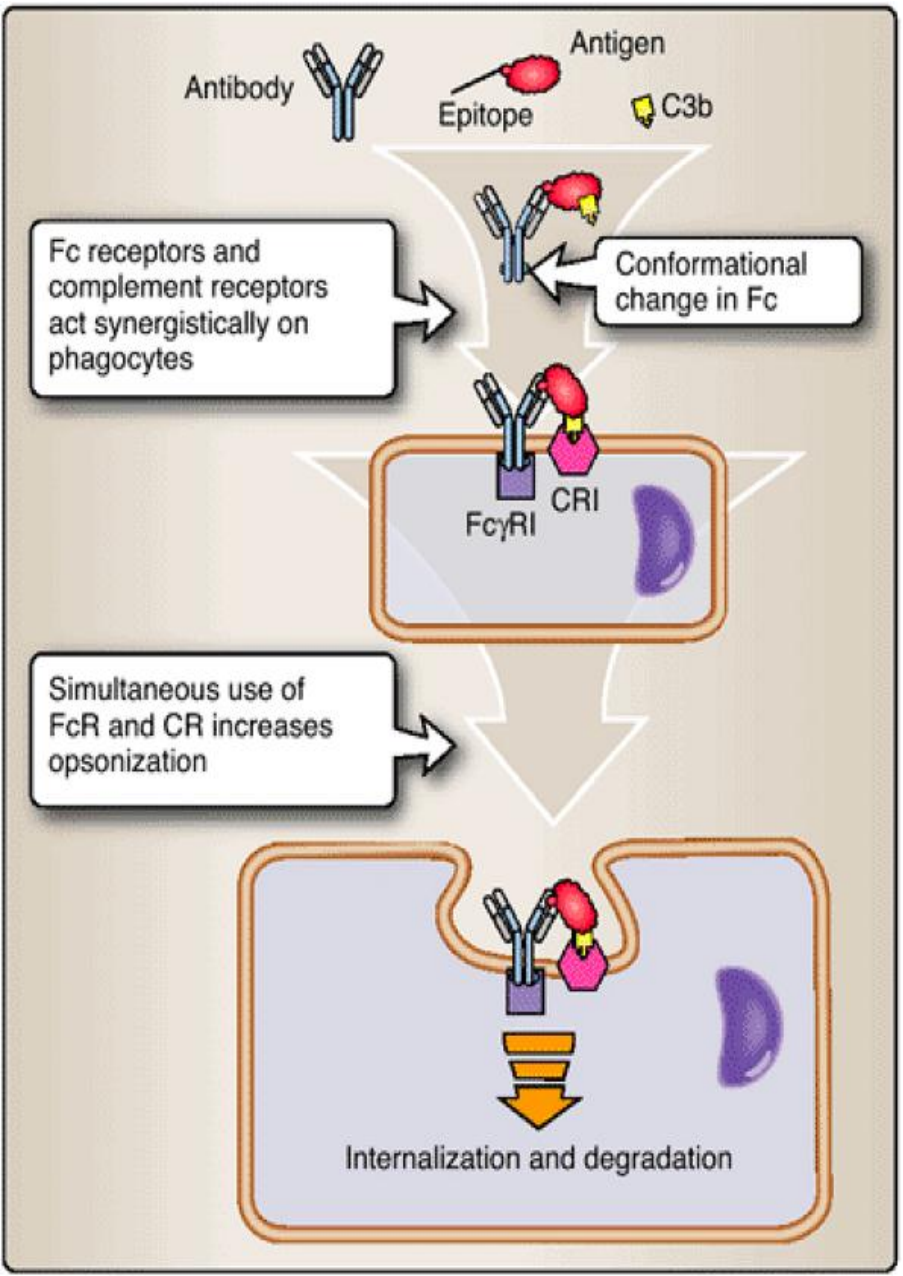
1. Neutralization

2. Agglutination

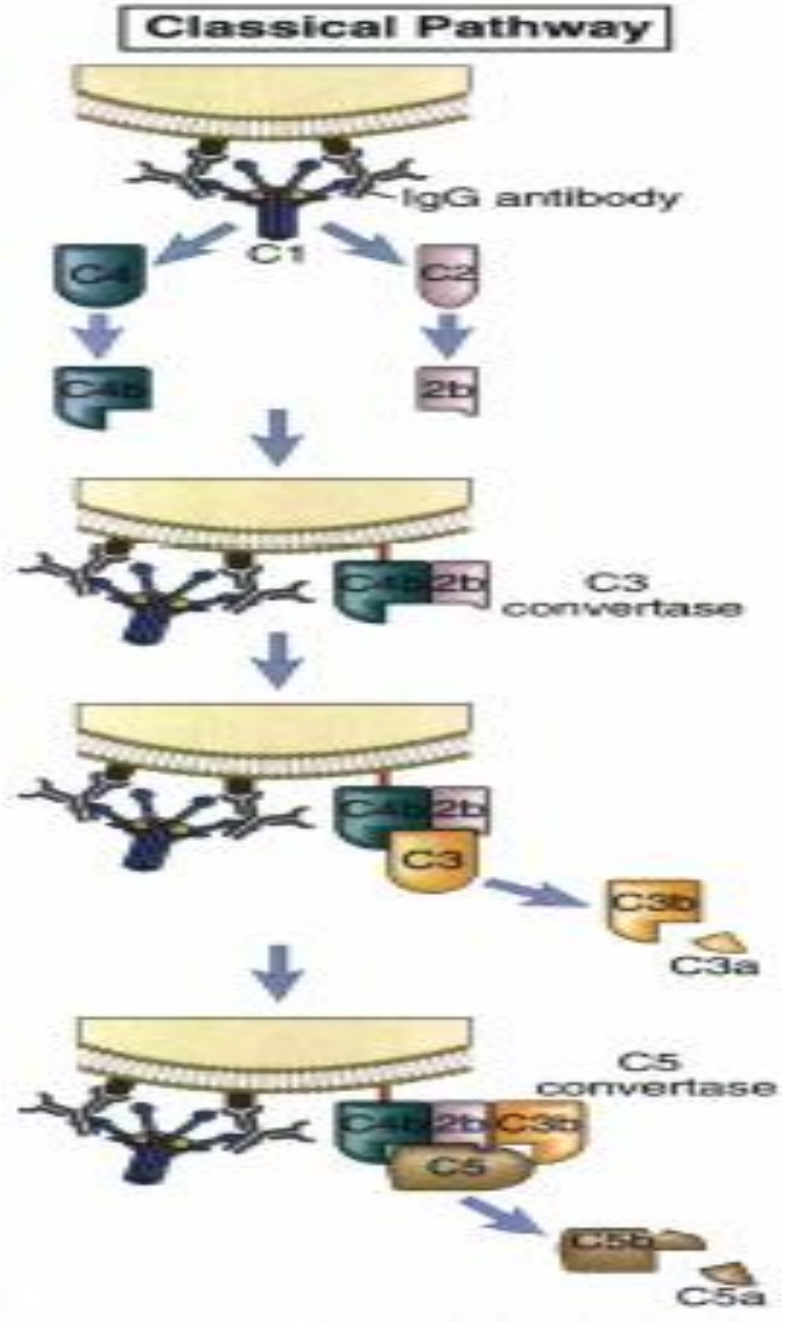




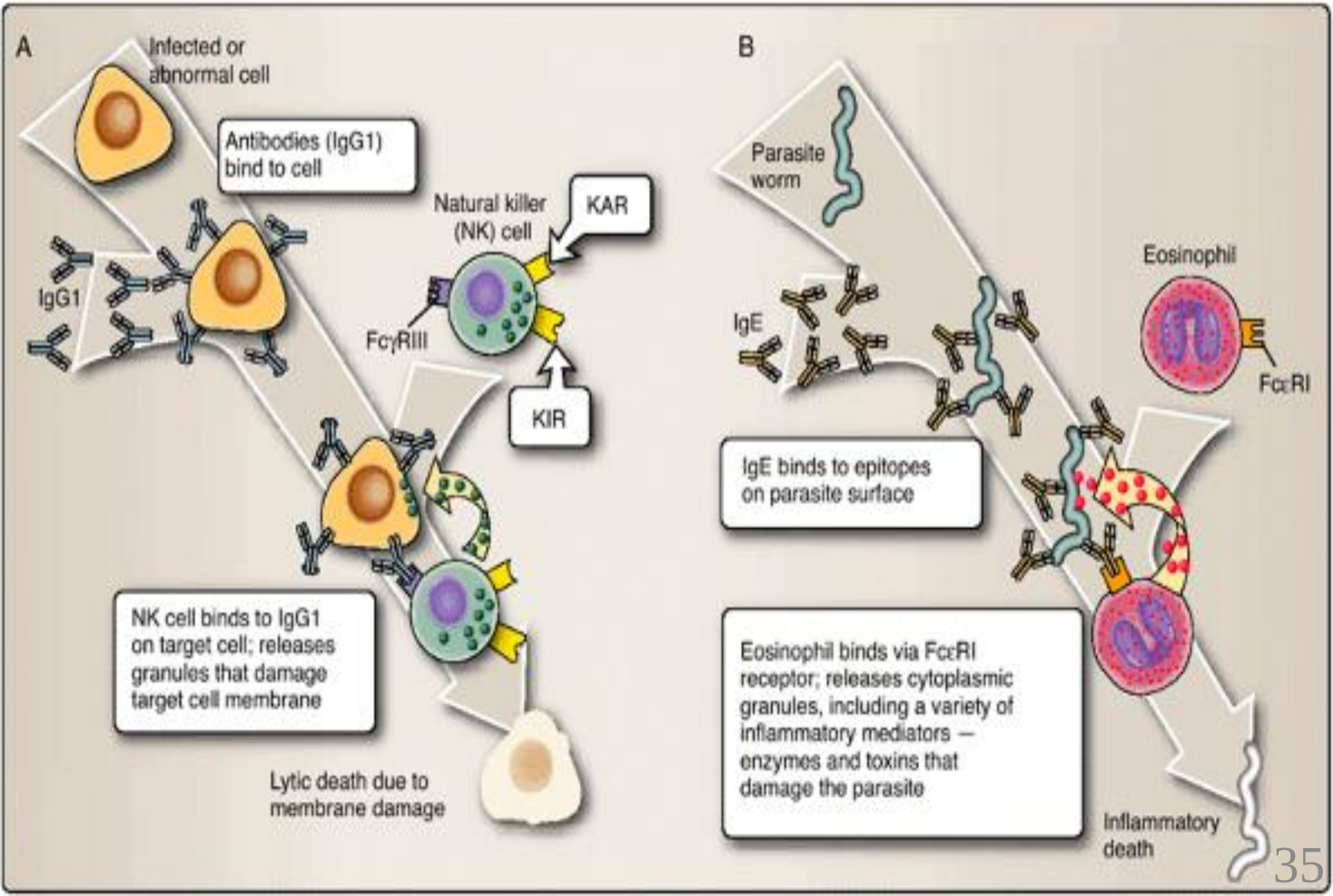
3. Opsonization



4. Complement activation



5. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)



Cell-mediated immunity (CMI)->อาศัยเซลล์

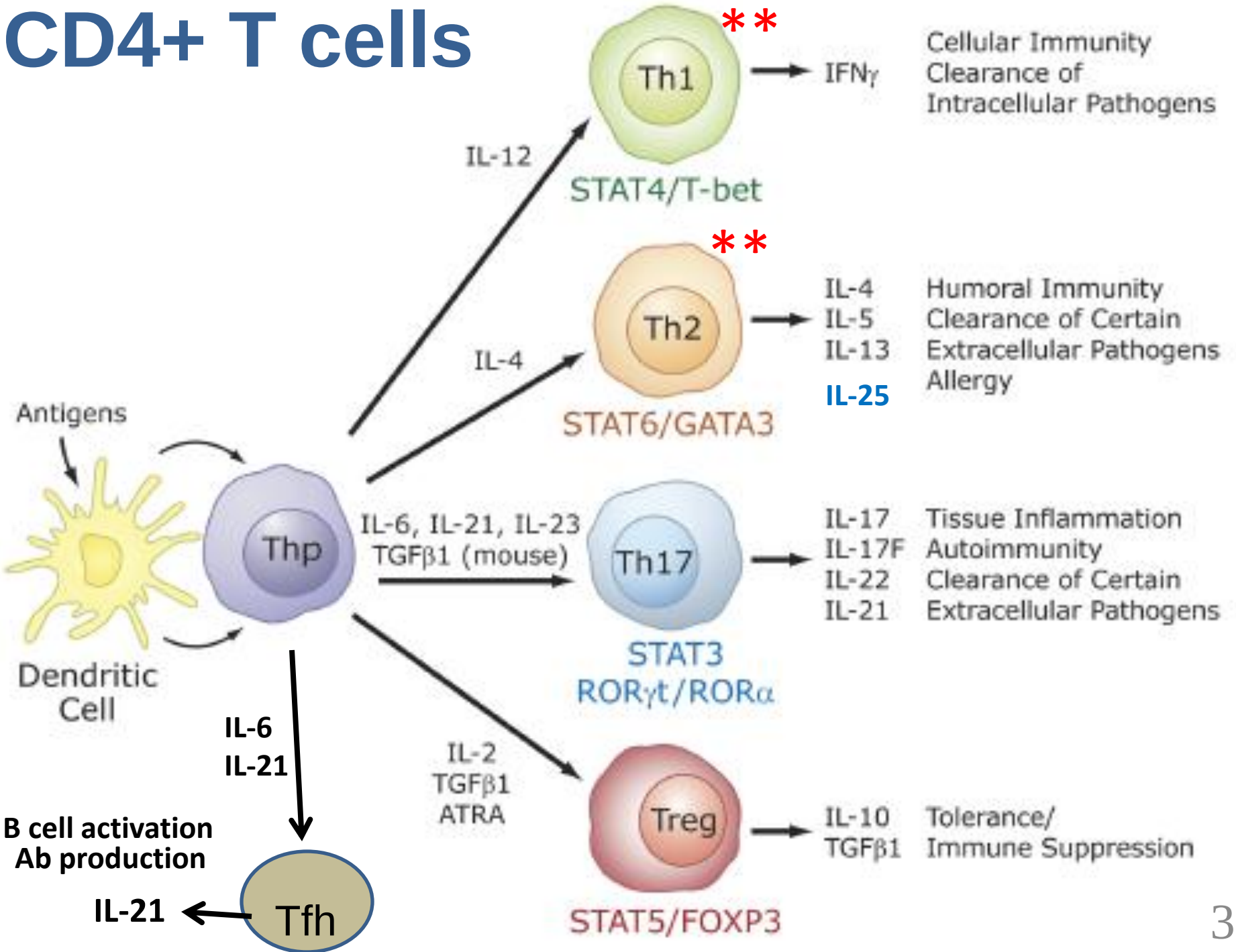
- การทำงานของ CMI จะเกี่ยวข้องกับ T cells เป็นหลัก
- Subpopulation ของ T cells แบ่งตามหน้าที่ได้ดังนี้

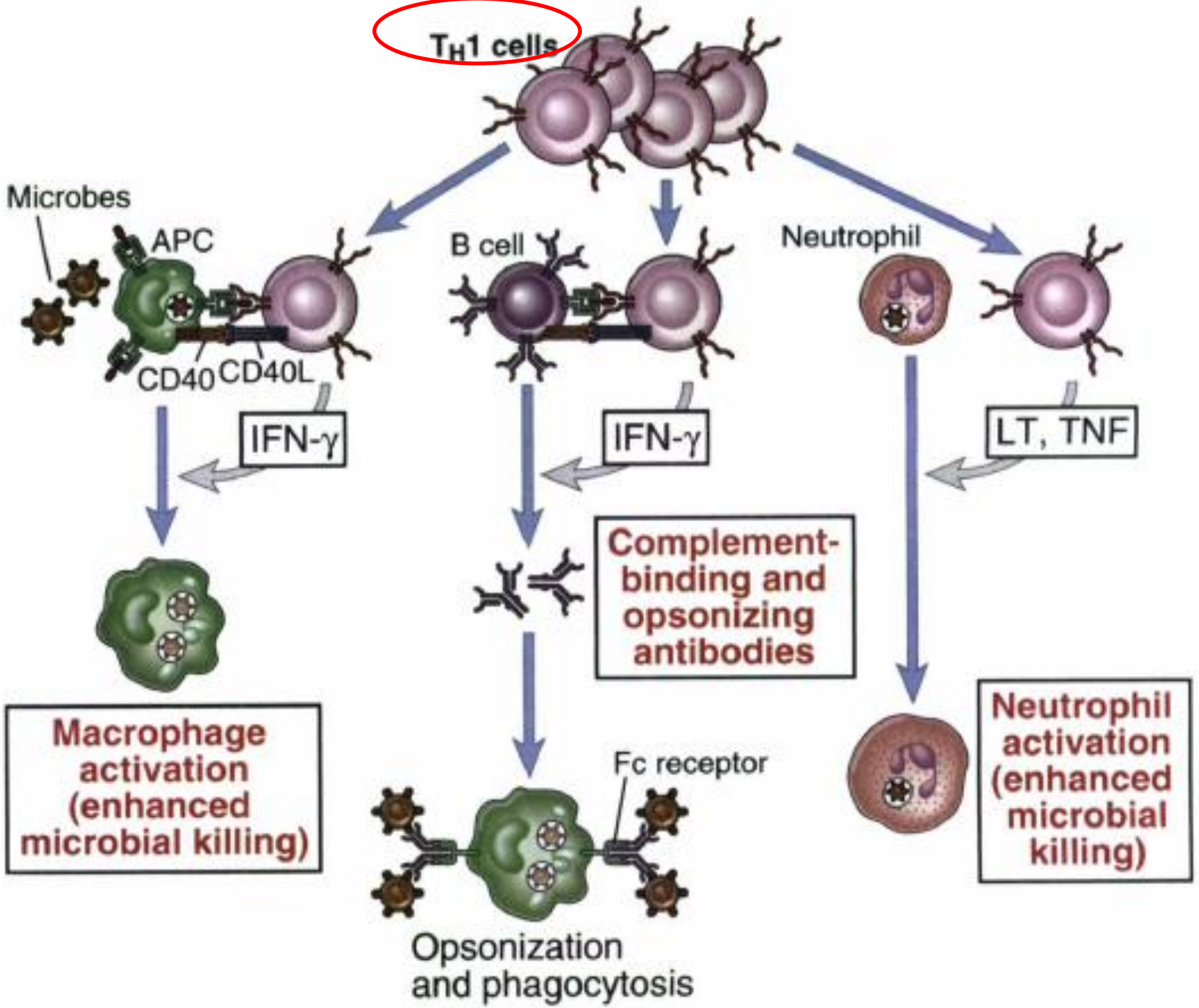
  1. T helper cells (Th cells) ->ช่วยกระตุ้น HMI และ CMI
  2. Cytotoxic T cells (Tc cells or CTLs) -> ฆ่าเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสและเซลล์มะเร็ง
  3. Regulatory T cells (Treg cells) -> ควบคุมการทำงานของ Th cells และ CTLs

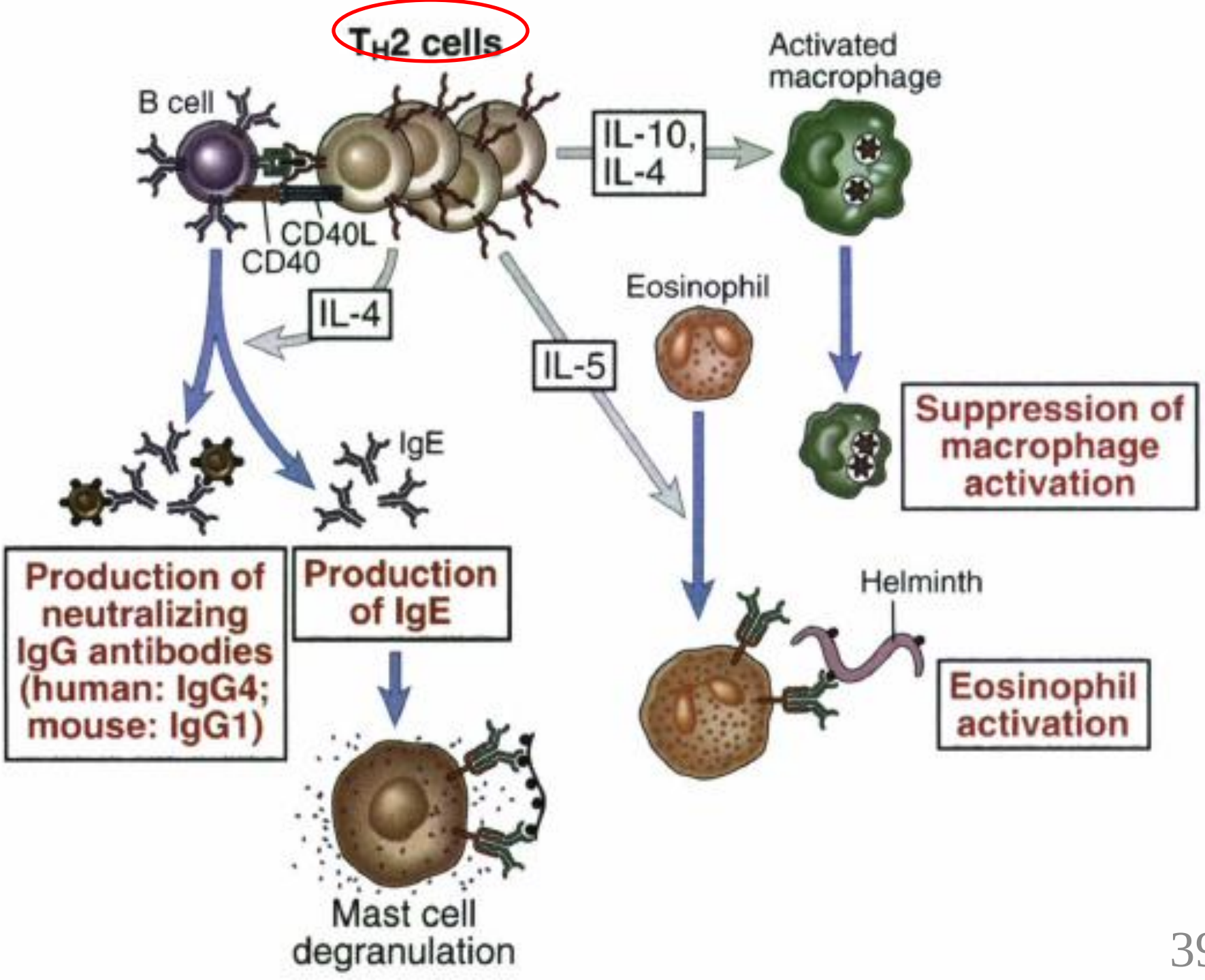
- T cells สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์ ได้แก่ CD4+ T cells และ CD8+ T cells

  (CD = cluster of differentiation/cluster of designation)

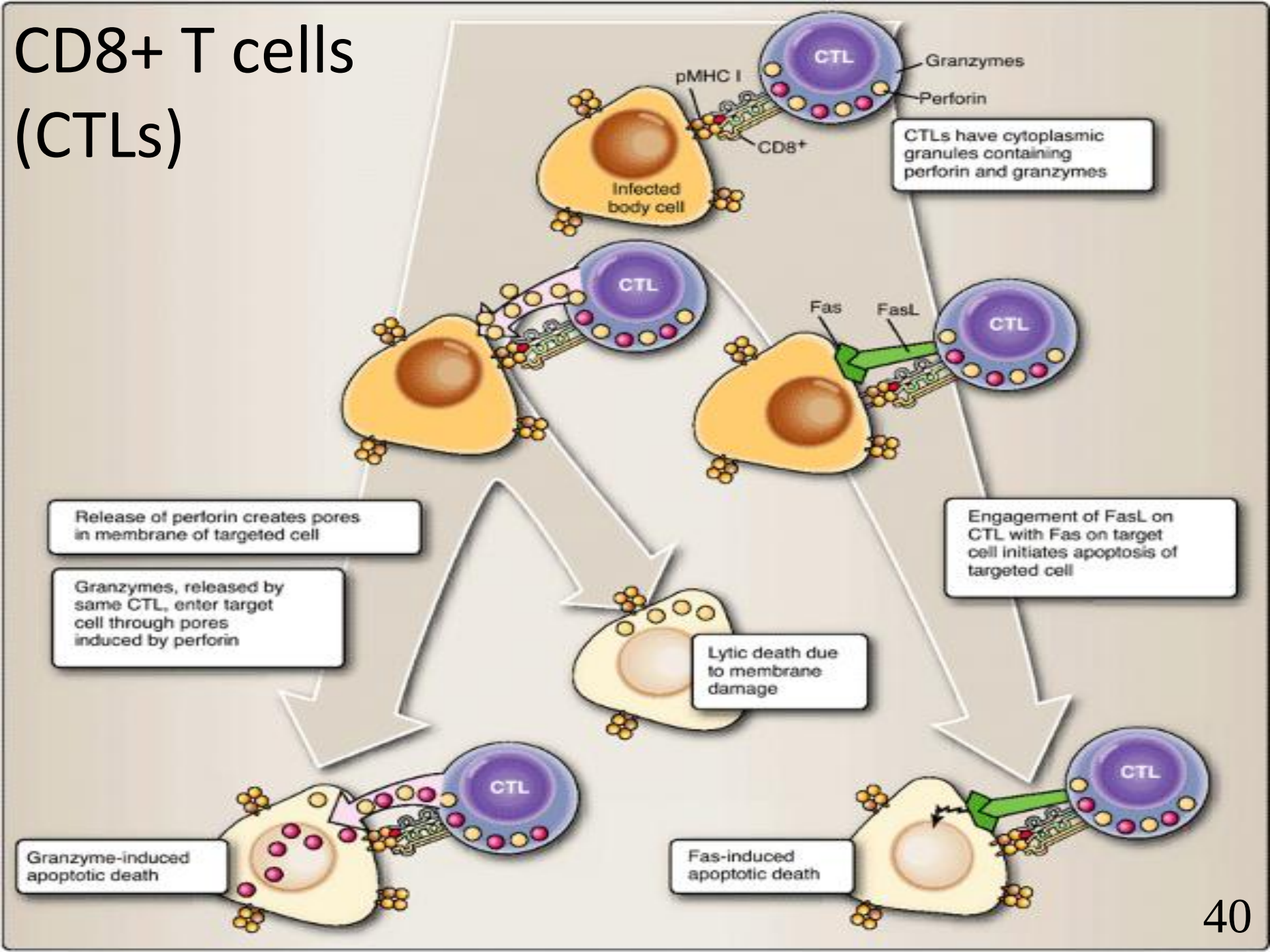
CD4+ T cells


**
Th1
IFNγ
Cellular Immunity
Clearance of
Intracellular Pathogens
IL-12
STAT4/T-bet
**
Th2
IL-4
IL-5
IL-13
Humoral Immunity
Clearance of Certain
Extracellular Pathogens
Allergy
IL-25
IL-4
STAT6/GATA3
Antigens
Thp
IL-6, IL-21, IL-23
TGFβ1 (mouse)
Th17
IL-17
IL-17F
IL-22
IL-21
Tissue Inflammation
Autoimmunity
Clearance of Certain
Extracellular Pathogens
STAT3
RORγt/RORα
Dendritic
Cell
IL-6
IL-21
IL-2
TGFβ1
ATRA
Treg
IL-10
TGFβ1
Tolerance/
Immune Suppression
B cell activation
Ab production
IL-21
Tfh
STAT5/FOXP3

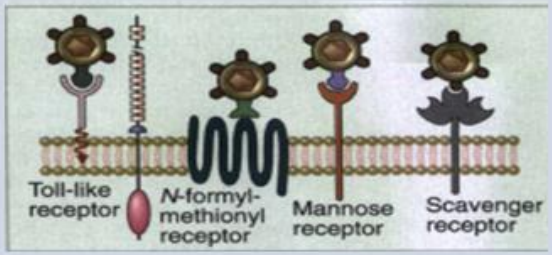
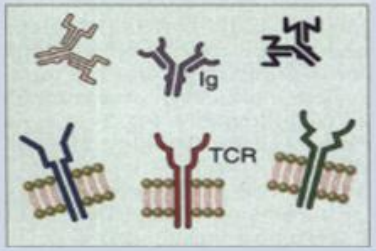

TH1 cells
Microbes
APC
CD40
CD40L
IFN-γ
B cell
IFN-γ
Neutrophil
LT, TNF
Complement-binding and opsonizing antibodies
Macrophage activation (enhanced microbial killing)
Fc receptor
Opsonization and phagocytosis
Neutrophil activation (enhanced microbial killing)


T_H2 cells
B cell
CD40L
CD40
IL-10,
IL-4
Activated
macrophage
IL-4
Eosinophil
IL-5
IgE
Suppression of
macrophage
activation
Production of
neutralizing
IgG antibodies
(human: IgG4;
mouse: IgG1)
Production
of IgE
Helminth
Eosinophil
activation
Mast cell
degranulation

CD8+ T cells (CTLs)

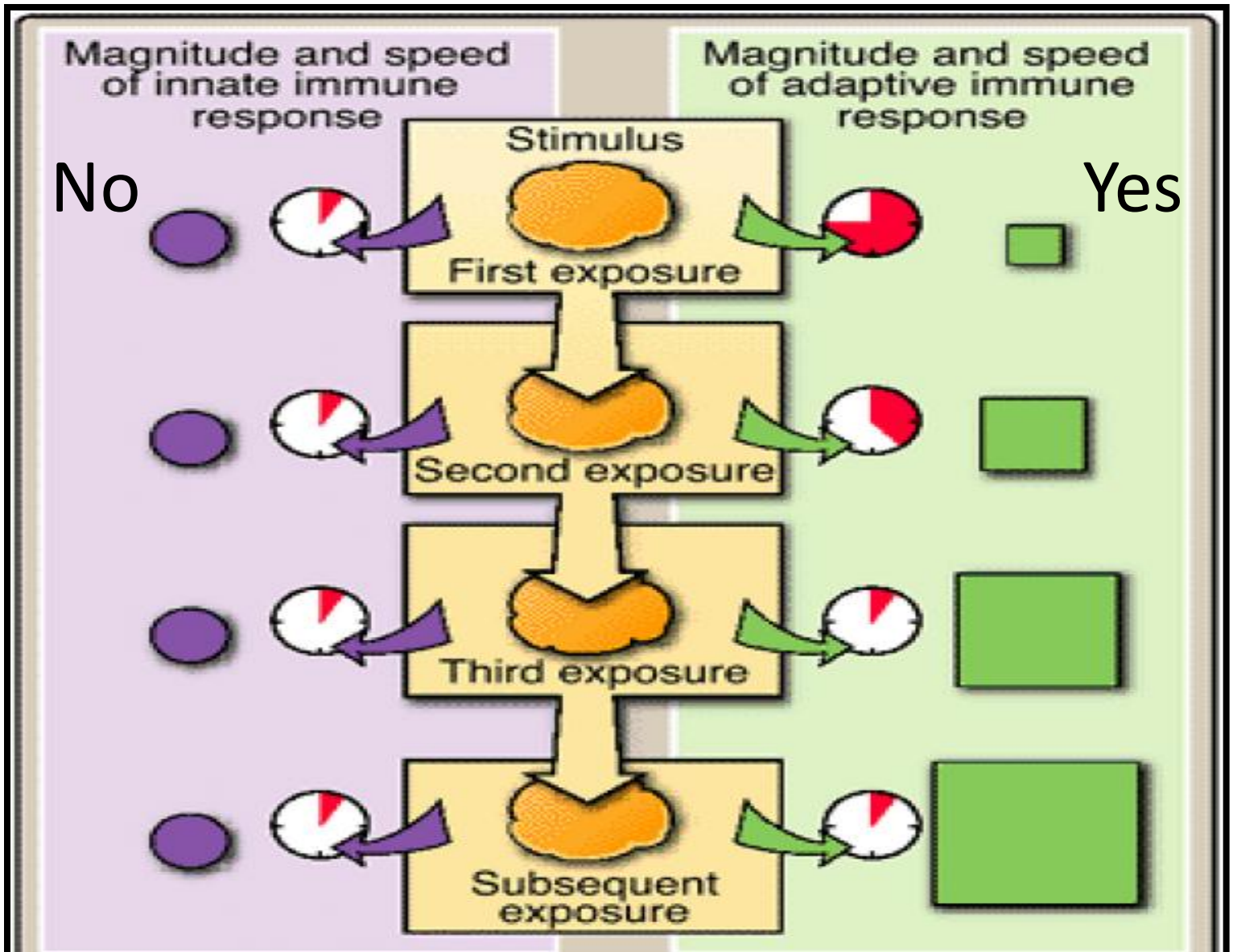


ตาราง 2 การเปรียบเทียบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

Characteristics	Innate immunity	Adaptive immunity
1. การทำงาน	มีติดตัวมาแต่กำเนิด สามารถทำงานได้ทันที	ต้องได้รับการกระตุ้นถึงจะทำงานได้
2. ความจำเพาะ (specificity)	มีความจำเพาะกับ pathogen-associated molecule pattems (PAMPs) ซึ่งเป็นโมเลกุลของจุลินทรีย์	มีความจำเพาะทั้งกับ โมเลกุลของจุลินทรีย์และที่ไม่ใช่จุลินทรีย์
3. ความหลากหลายของ receptor (diversity)	ไม่มีความหลากหลาย 	มีความหลากหลาย 
4. ความจำ (memory)	ไม่มีความจำ เพราะเมื่อได้รับแอนติเจนชนิดเดิมเข้ามาครั้งที่ 2 หรือ 3 การตอบสนองจะเท่าเดิม	มีความจำ เนื่องจากเมื่อได้รับแอนติเจนชนิดเดิมเข้ามาครั้งที่ 2 หรือ 3 จะเกิดการตอบสนองที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพดีกว่าเดิม
5. ความสามารถในการแยกแยะระหว่าง self กับ non-self	มีความสามารถในการแยกแยะระหว่าง self กับ non-self ได้ เซลล์ของโฮสท์จะไม่ถูก recognize	มีความสามารถในการแยกแยะระหว่าง self กับ non-self ได้ แต่เซลล์ของโฮสท์อาจถูก recognize ได้ซึ่งขึ้นอยู่กับขั้นตอน lymphocyte selection

ตารางเปรียบเทียบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (ต่อ)

Memory (ความจำ)

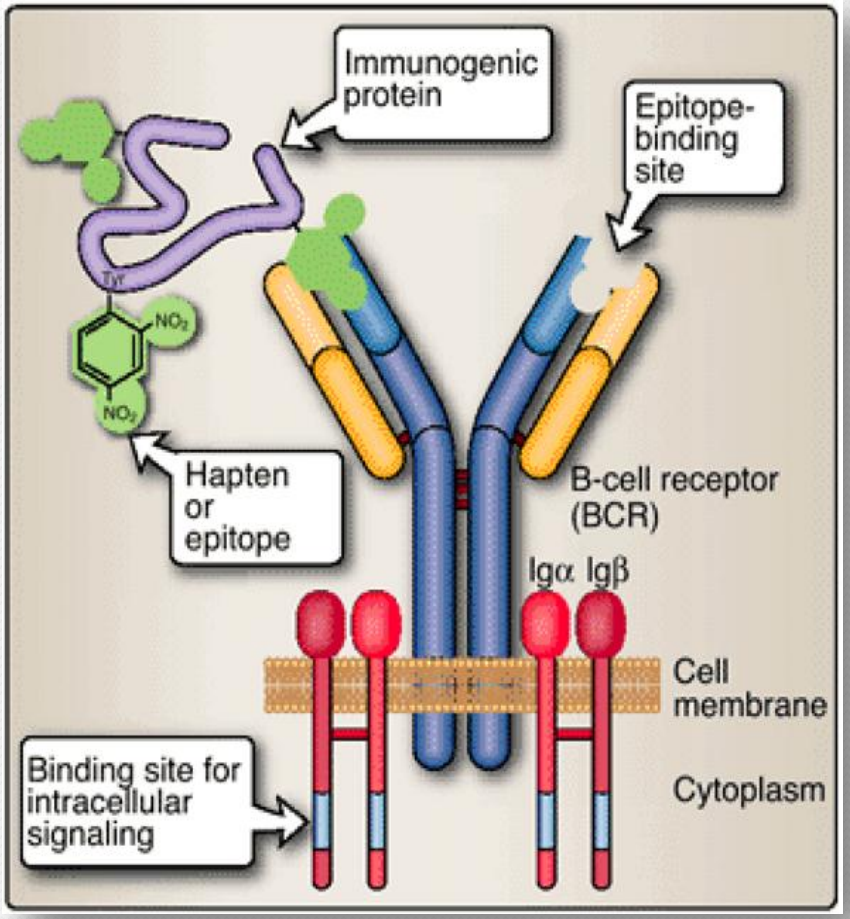


ตารางเปรียบเทียบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (ต่อ)

	Innate	Adaptive
Characteristics		
Specificity	For structures shared by groups of related microbes	For antigens of microbes and for nonmicrobial antigens
Diversity	Limited; germline-encoded	Very large; receptors are produced by somatic recombination of gene segments
Memory	None	Yes
Nonreactivity to self	Yes	Yes
Components		
Cellular and chemical barriers	Skin, mucosal epithelia; antimicrobial chemicals	Lymphocytes in epithelia; antibodies secreted at epithelial surfaces
Blood proteins	Complement, others	Antibodies
Cells	Phagocytes (macrophages, neutrophils), natural killer cells	Lymphocytes

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี

(Antigen-antibody reaction)

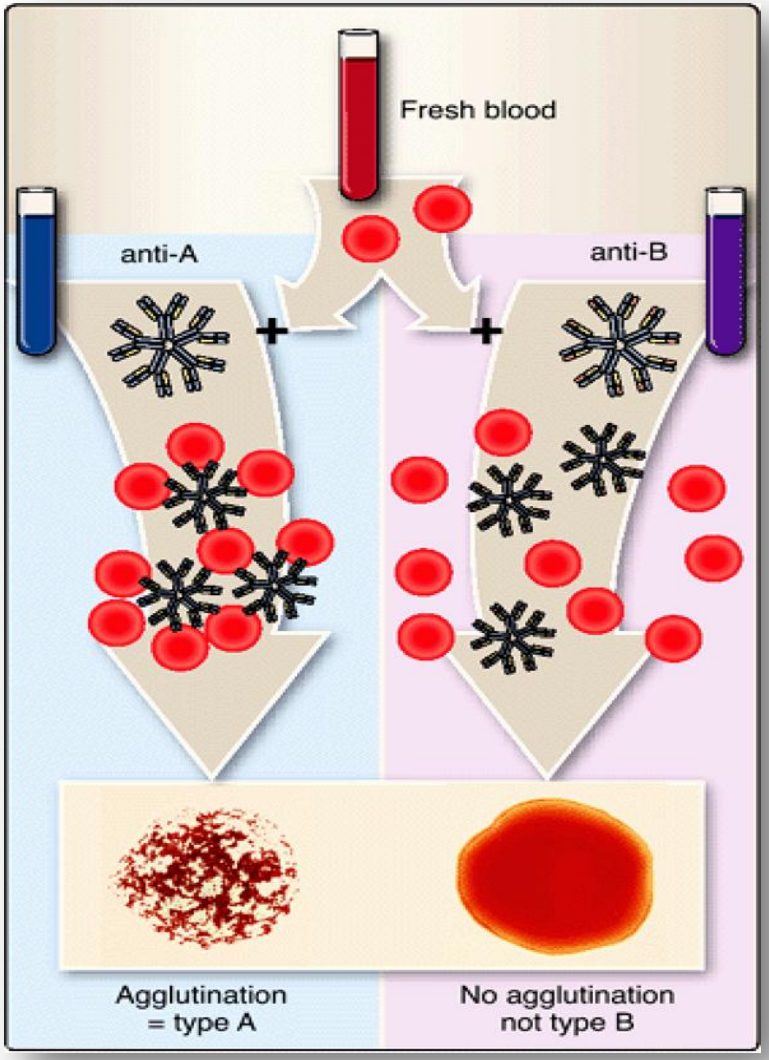


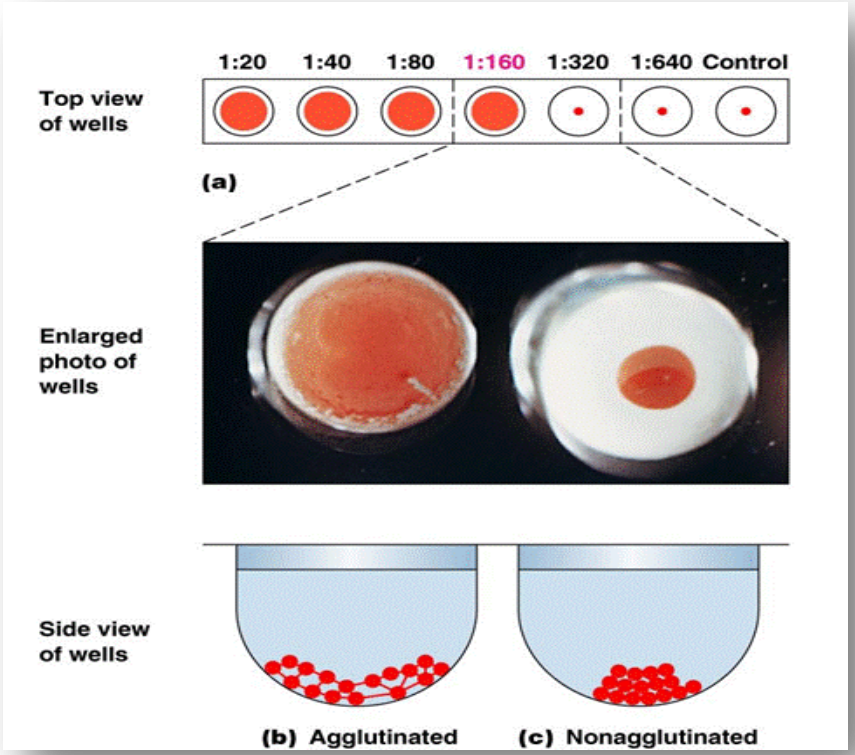
ประโยชน์

1. ตรวจวินิจฉัยโรค (ตรวจหา Ag หรือ Ab)
2. ตรวจหมู่เลือด (A, B, O และ AB)
3. ช่วยในการจำแนกชนิดของจุลชีพ

1. ปฏิกิริยาจับกลุ่ม (Agglutination)

➢ เป็นปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนที่เป็นอนุภาคหรือเป็นเซลล์ (particulate or cellular antigen) เช่น เซลล์แบคทีเรีย หรือ เซลล์เม็ดเลือดแดง





ประโยชน์

1. ตรวจหาหมู่เลือด (blood group typing)
2. ตรวจหา Ab ต่อเชื้อ Samonella ตรวจเพื่อวินิจฉัยโรคไทฟอยด์

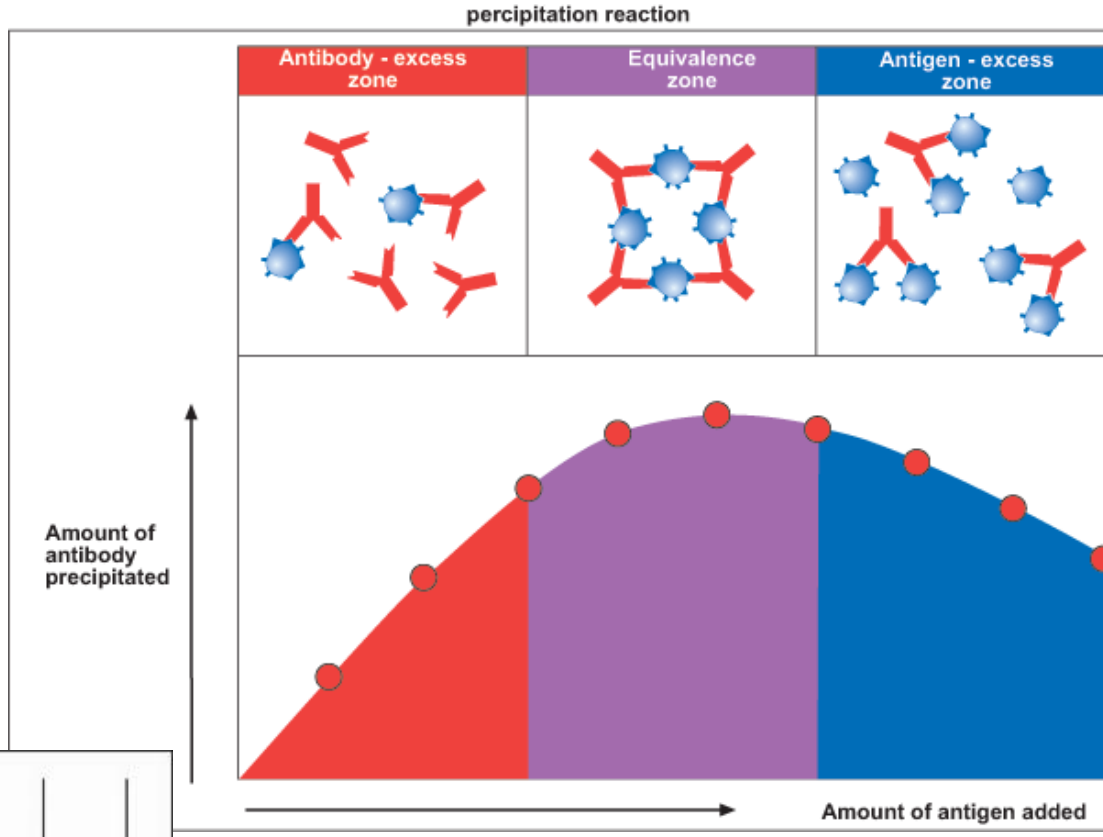
2. ปฏิกิริยาตกตะกอน (Precipitation)

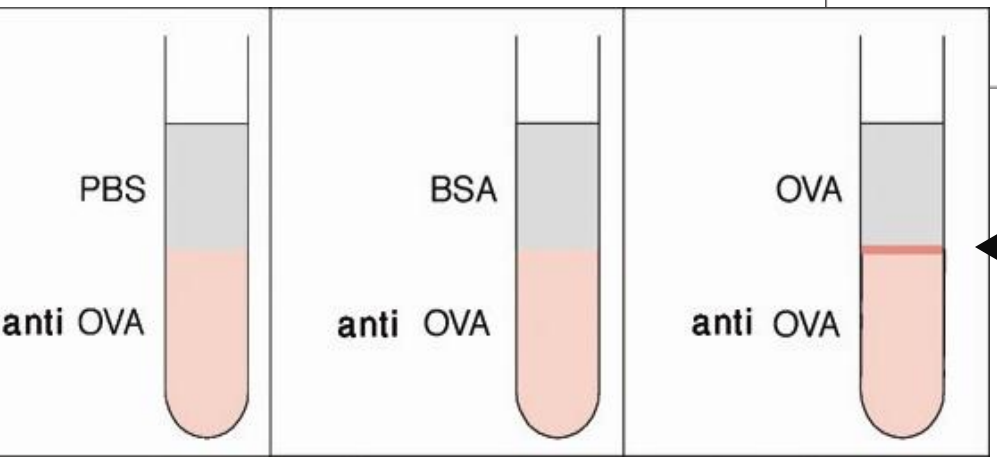
➢เป็นปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนที่อยู่ในรูป

สารละลาย (soluble antigen)

- tube precipitation
- agar diffusion

(immunodiffusion)



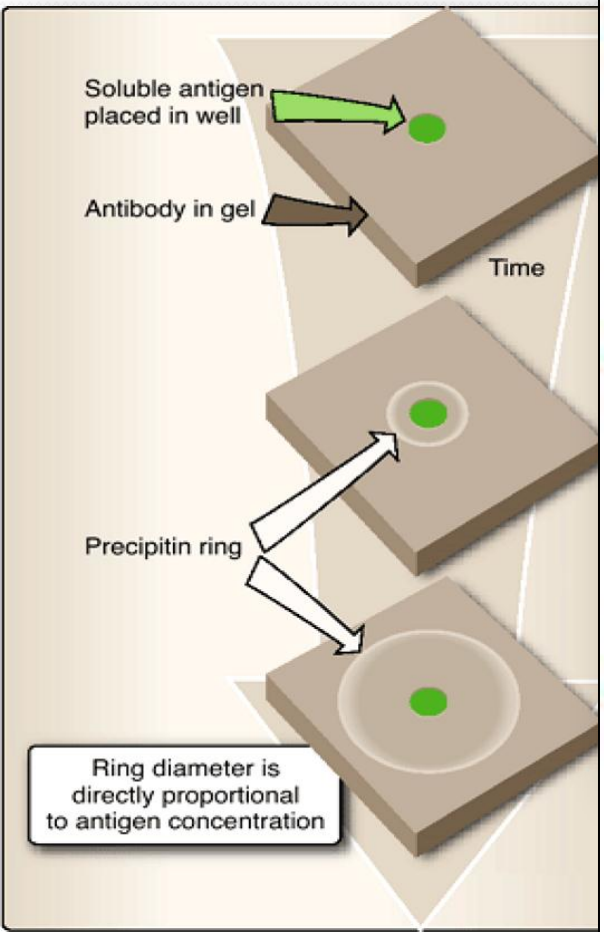


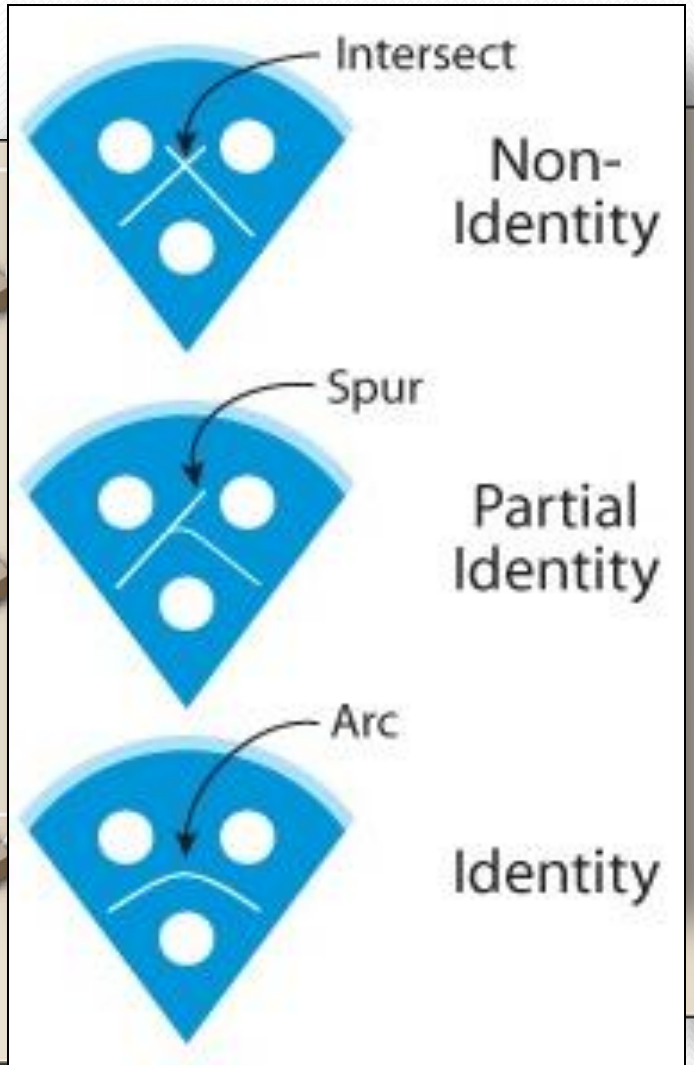
← Precipitin ring

Agar diffusion (immunodiffusion)

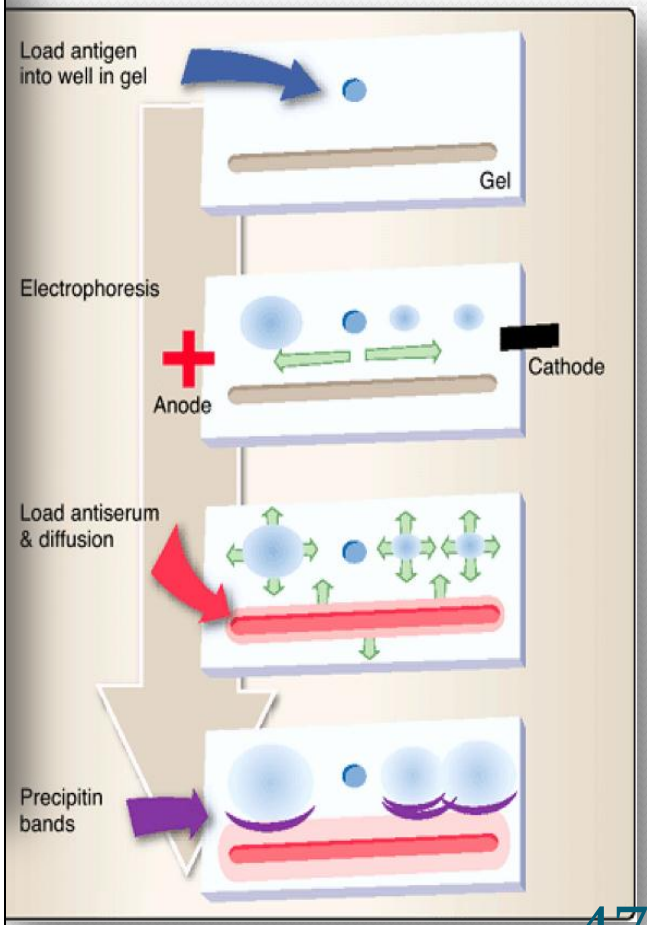
Double-diffusion or Ouchterlony technique

Radial immunodiffusion





Immunoelectrophoresis



3. ปฏิกิริยาลบล้างฤทธิ์ (Neutralization)

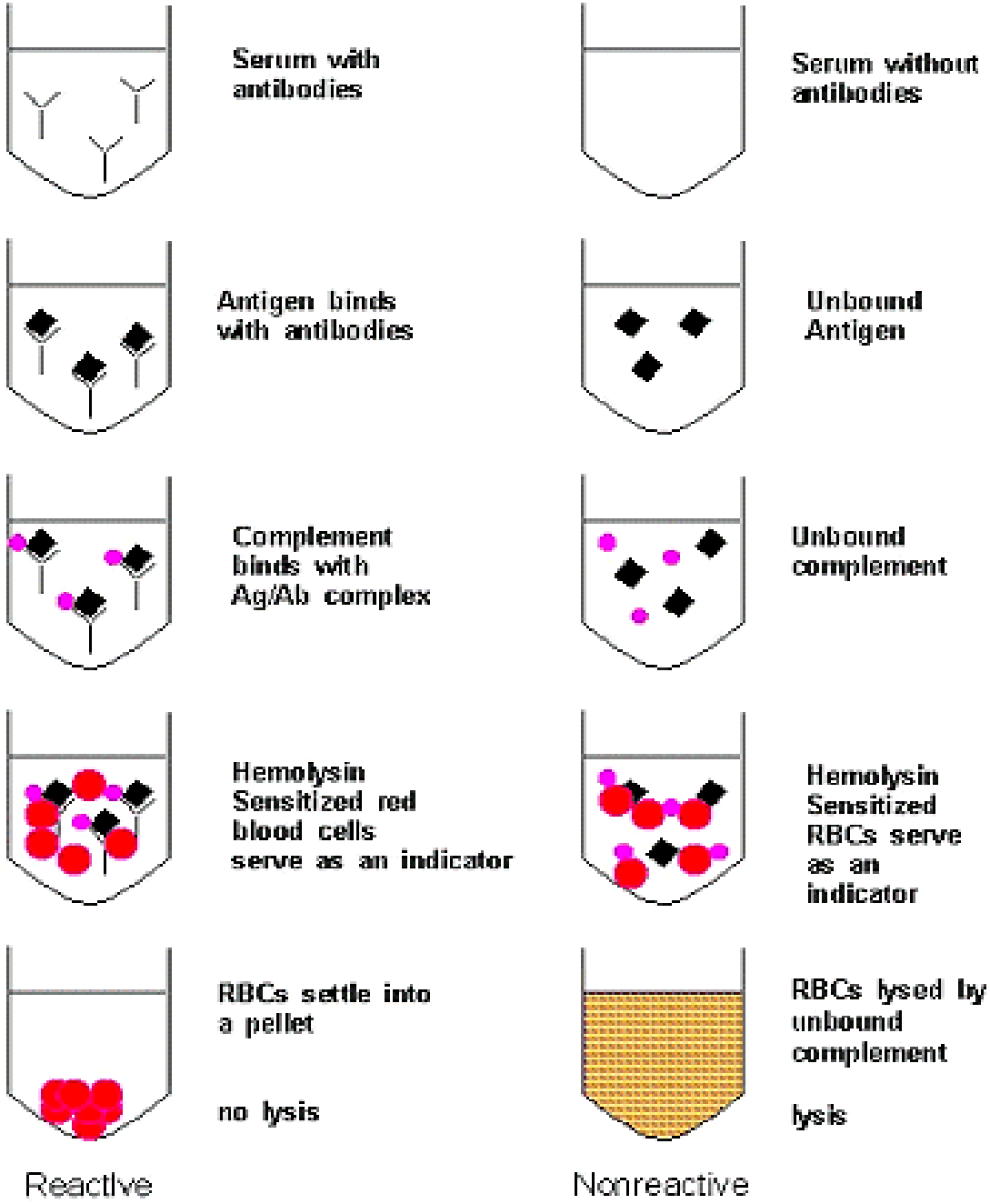
➢ สารพิษหรือเอนไซม์ต่างๆ จะถูกลบล้างฤทธิ์ (neutralized) เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

- แอนติบอดีที่ลบล้างพิษ toxin เรียกว่า antitoxin
- แอนติบอดีต่อไวรัสลบล้างฤทธิ์ในการติดเชื้อไวรัสเรียก neutralizing antibody (NT-Ab)

4. Complement fixtaion test (CF test)

➢ เป็นปฏิกิริยาการตรึงคอมพลีเมนต์ (ดูรูป)

Complement Fixation Test

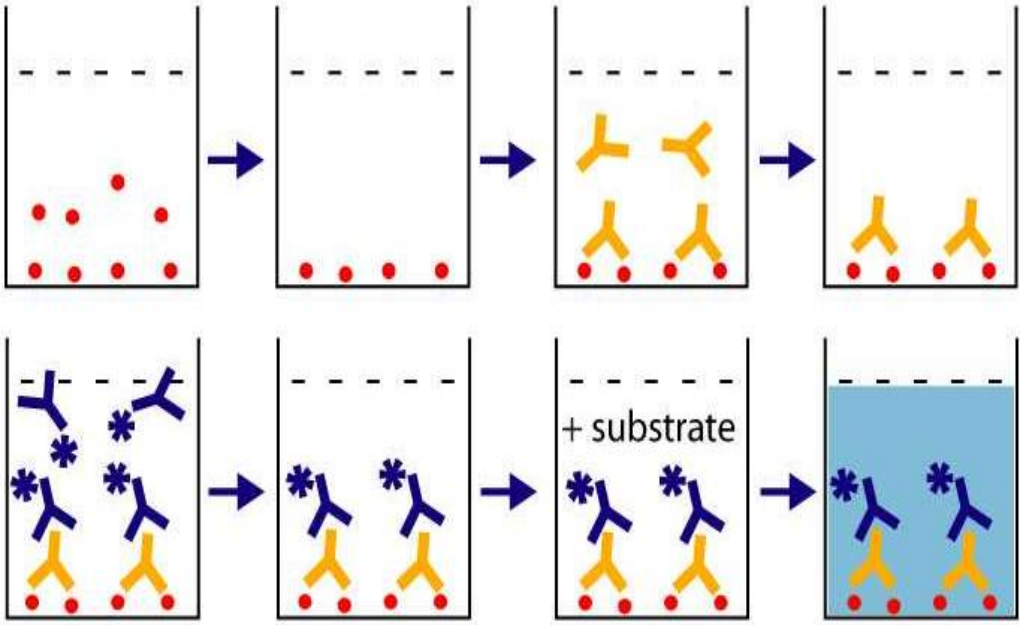


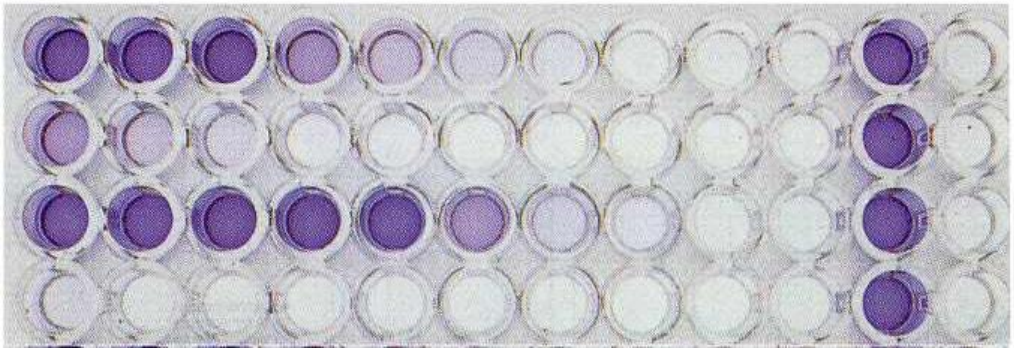
5. ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่มีการติดฉลาก (label)

- สามารถติดฉลากได้ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีส่วนใหญ่นิยมติดฉลากแอนติบอดีมากกว่า สารที่นิยมใช้ติดฉลากได้แก่
  - เอนไซม์ เช่น horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, glucose oxidase
  - สีฟลูออเรสซีน (fluorescein dye) เช่น fluorescein isothioicyanate (FITC)
  - สารกัมมันตภาพรังสี เช่น I^{125} , ^{3}H (tritium)

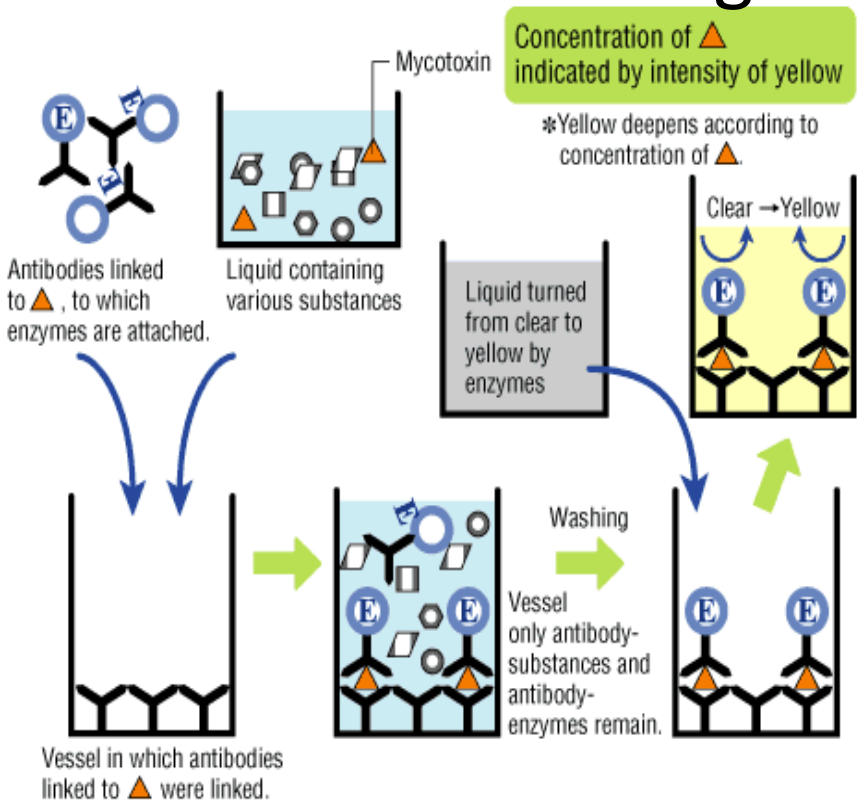
Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Indirect ELISA: Ab



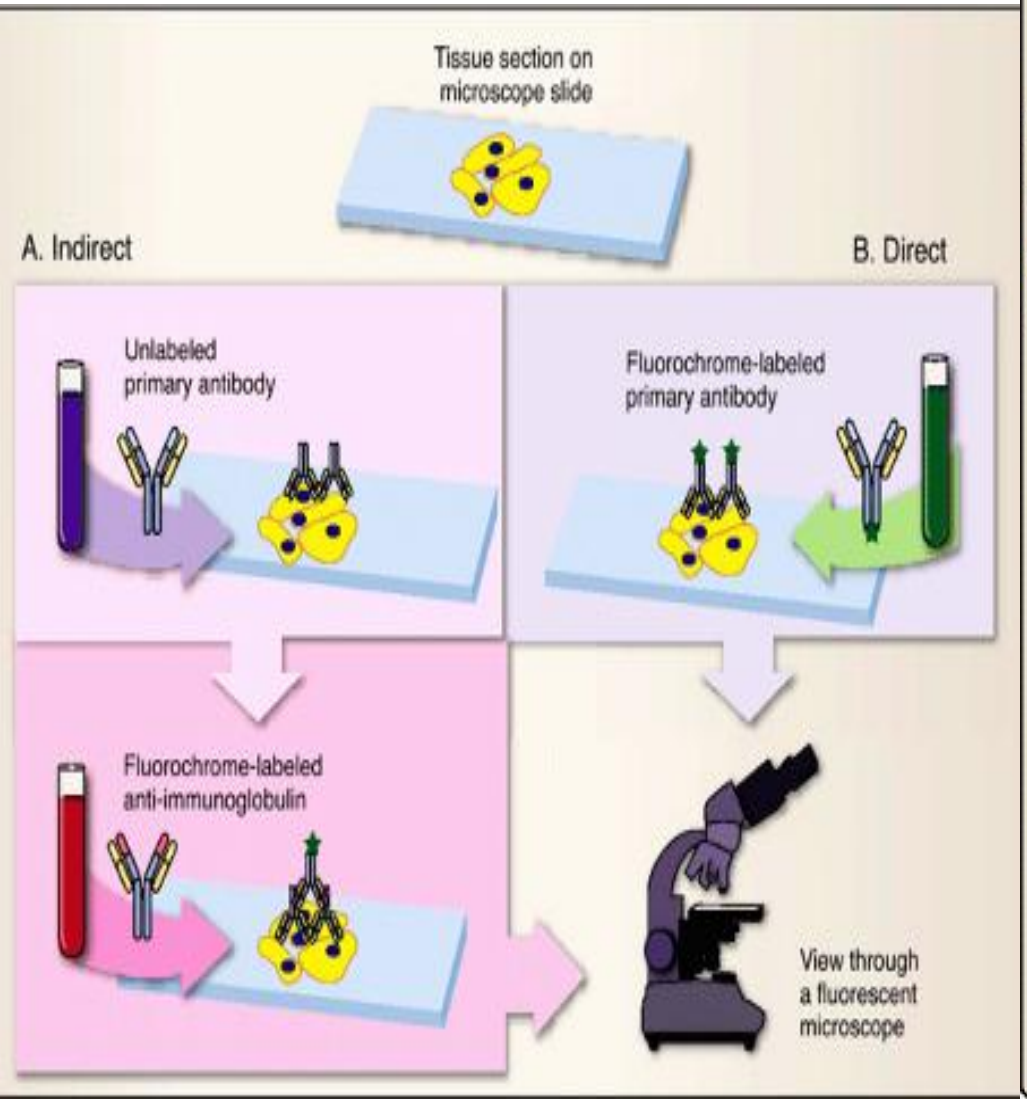


Sandwich ELISA: Ag

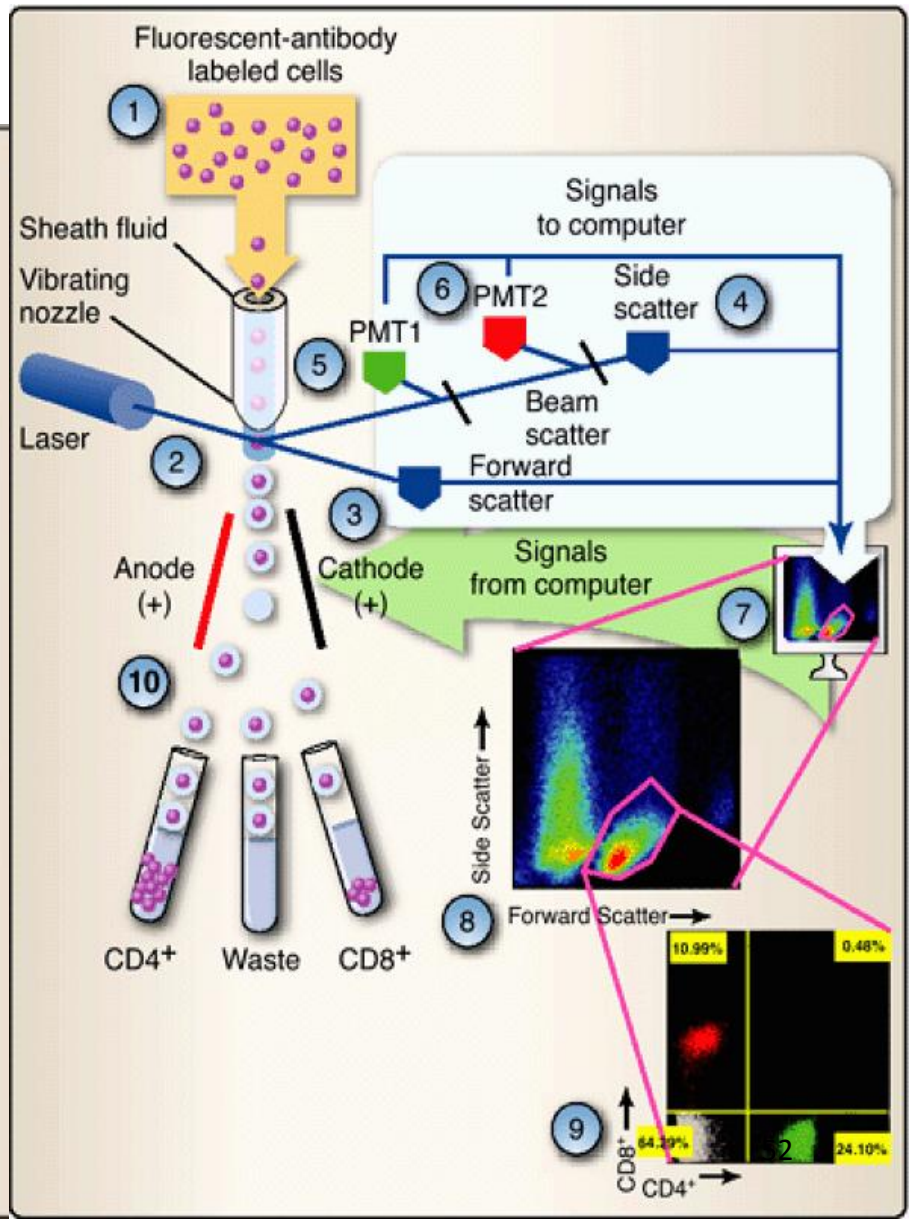


ELISA reader

Immunofluorescence (IF)



Flow cytometry



Start
Skin
STOP
Mucous membranes
Granuloma Island
Isolation
Microbes initiate attack.
Antimicrobial secretions
Infection - the Game
Can you guide the microbes past all these defensive mechanisms of the immune system?
HOME SWEET HOME
Commensal microbes
Defects in immune system Advance 6 spaces
Natural killer cells
Complement
Phagocytic cells
T cells
T
Microbes face numerous obstacles to reproducing and establishing long-term infections in the human body.
Antibodies
Inflammation
Membrane damage
Cell suicide
Finish