

Иммунитет. Как защититься от защиты?

Делаем жизнь человека безопасной



РУКОВОДИТЕЛЬ:
Вдовенко Дарья Юрьевна
Вдовин Александр Сергеевич

УЧАСТНИКИ:
Драгоны Оливия
Кашин Кирилл
Невская Анастасия
Тараторкин Федор
Хованская Анна

ПРОБЛЕМА

В настоящее время популярно мнение о том, что иммунитет человека нуждается в постоянной стимуляции. Однако, в результате этого множество людей начинают страдать от аутоиммунных заболеваний и системных воспалений.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Механизм влияния активированных клеток на здоровые ткани и работа иммунитета в целом очень мало изучены, однако их понимание является важным элементом обеспечения безопасного существования человека.

СУЩЕСТВУЮЩИЕ РЕШЕНИЯ

Подавление иммунных реакций – иммунная супрессия.

ВОЗМОЖНЫЕ РЕШЕНИЯ

Изучение влияния активированных иммунных клеток на другие клетки организма, не нуждающиеся в нем, и последующий поиск возможных блокаторов этих реакций.

ЦЕЛЬ ПРОЕКТА

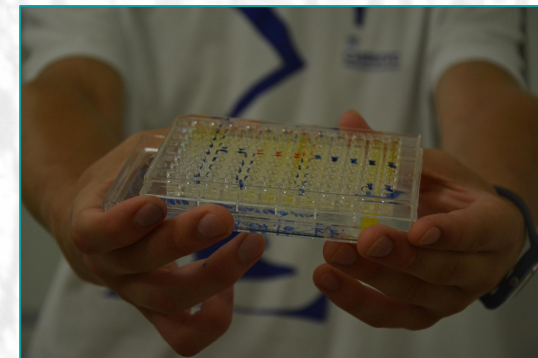
Изучение влияния активированных иммунных клеток на другие клетки организма на примере эндотелия и фибробластов

ЗАДАЧИ ПРОЕКТА

- Выделение, активация иммунных клеток и оптимизация этих процессов [CD3 – Т-клетки].
- Изучение влияния активированных Т-клеток на клетки эндотелия сосудов [сердечные микроваскулярные клетки и клетки аорты].
- Изучение влияния активированных Т-клеток на фибробласты [кожные и лёгочные].

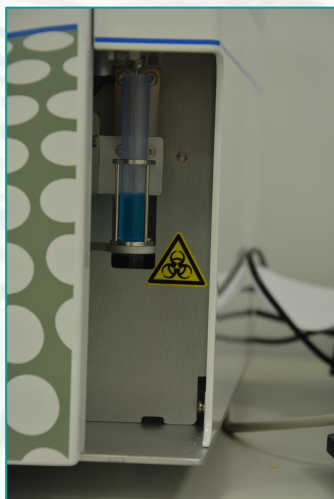
МЕТОДЫ

- Проточная цитофлуориметрия [FACS]
- Иммуноферментный анализ [ELISA]
- Флуоресцентная микроскопия
- Искусственная активация клеток и ведение совместных культур

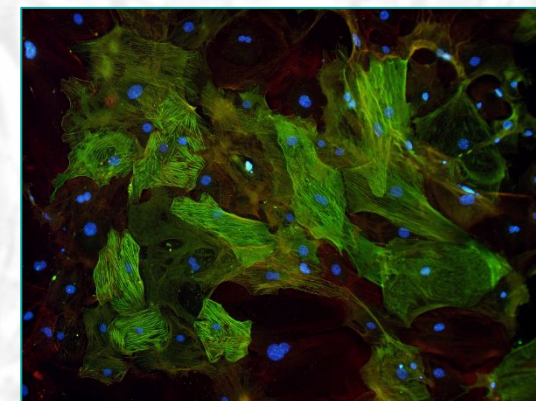
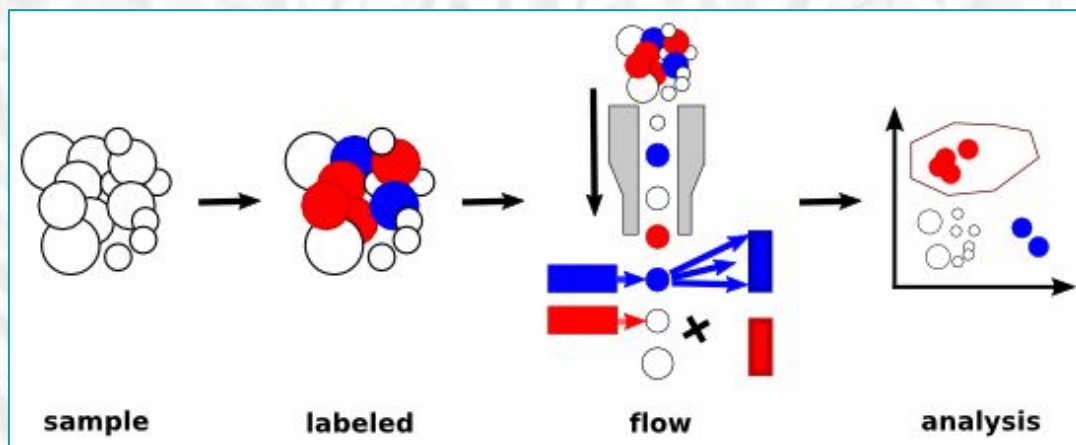


ELISA

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ



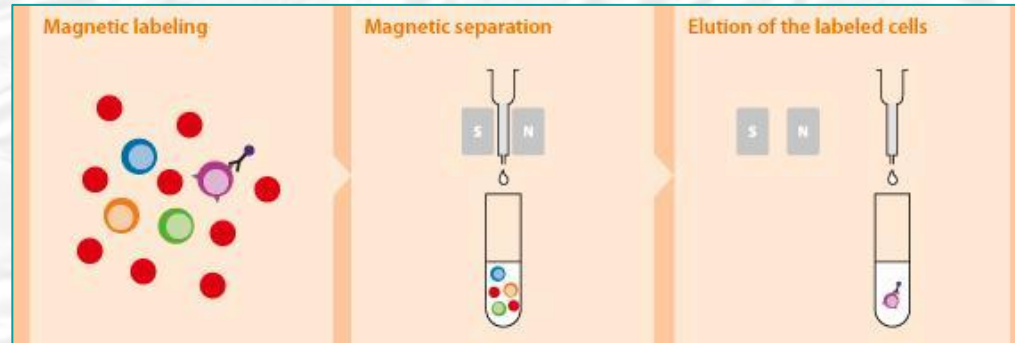
FACS



Флуорисцентная
микроскопия

МЕТОДЫ

- Культивирование клеток
- МЯСС [магнитный сортинг специфических субпопуляций клеток]
- Окрашивание $mitoxox$ на АФК [образование супероксида]



МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

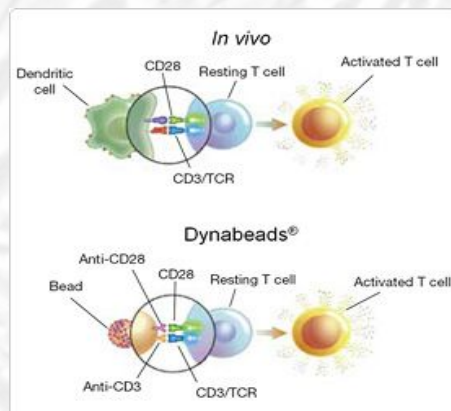
Работа проводилась на культурах человеческих клеток дермальных, фетальных дермальных и легочных фибробластов и сердечных микроваскулярных эндотелиальных клетках и клетках эндотелия аорты методом совместных культур с активированными Т-клетками человека.

ОСНОВНАЯ СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Т-клетки
человека

MACS

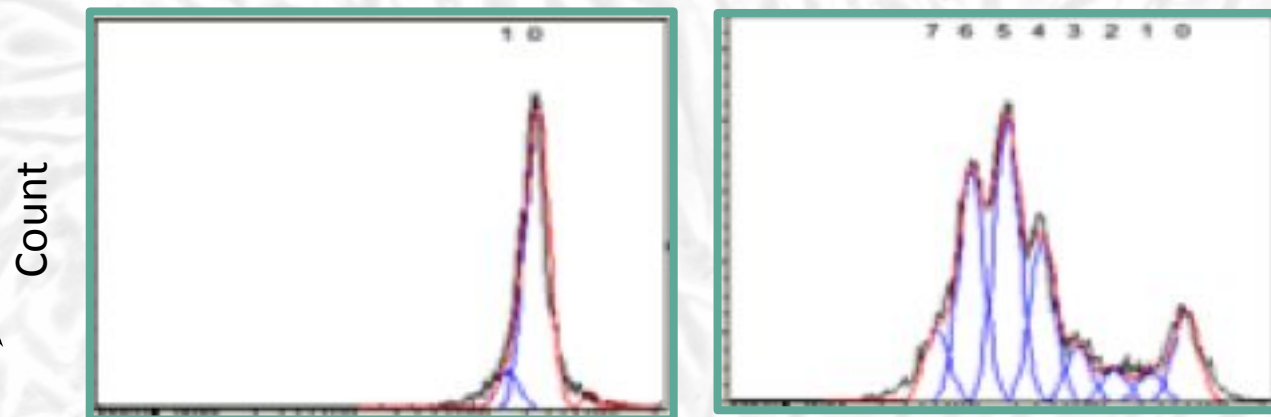
CD8⁺ Т-клетки



Активация Dynabeads

CD4⁺ Т-клетки

Проверка пролиферации
(CFSE)



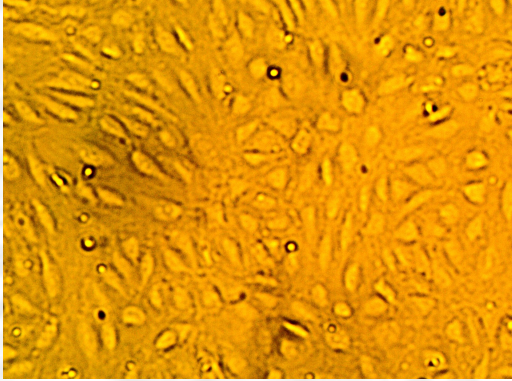
FITC (CFSE)



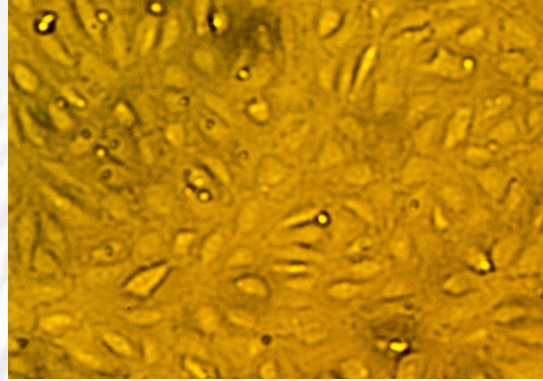
Культуры клеток
человека

СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

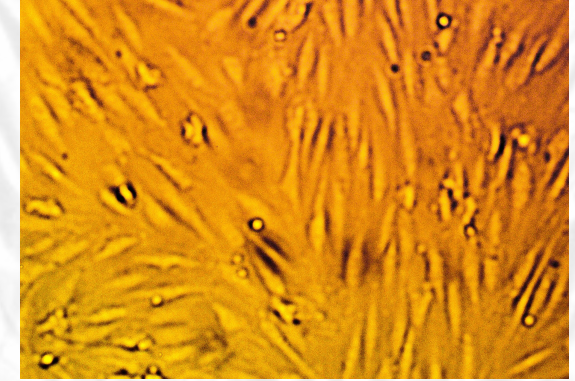
Анализ морфологии клеток через 24 часа



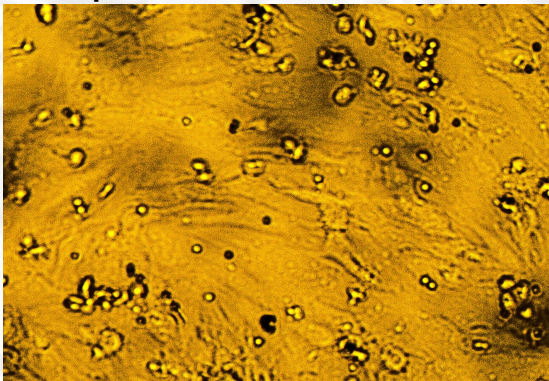
Отрицательный контроль



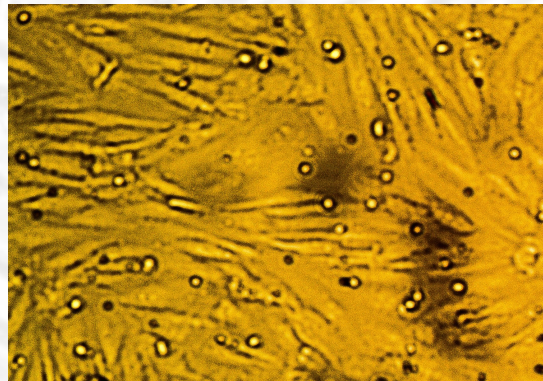
Контроль с бидсами



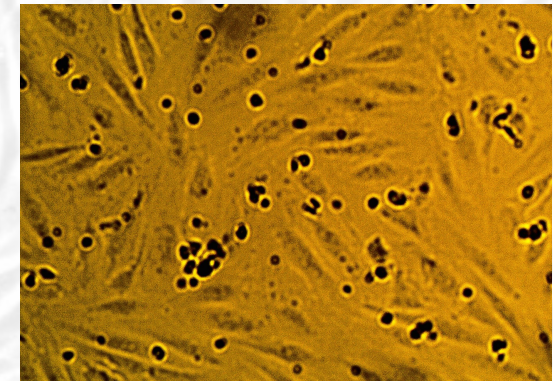
Положительный контроль с TNFα



Клетки с CD4



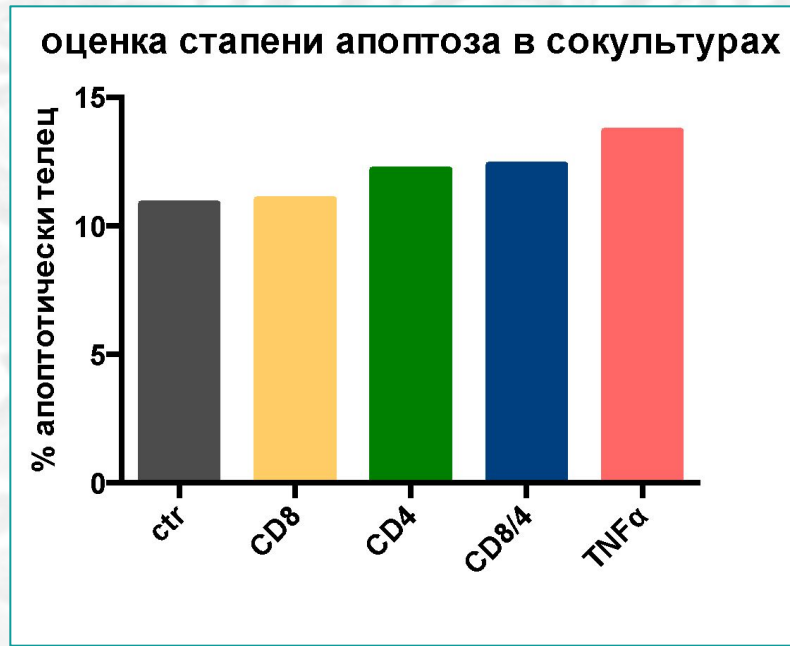
Клетки с CD8



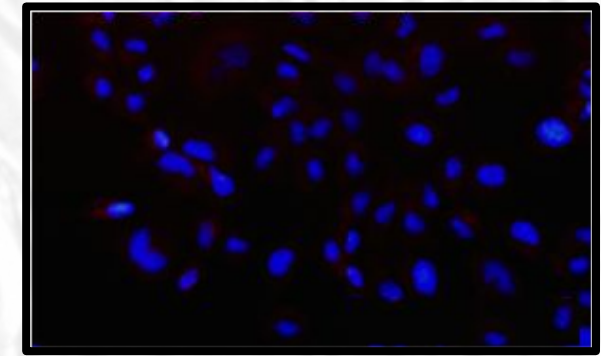
Клетки с CD4 и CD8

MitoSOX - анализ стресса в клетках эндотелия

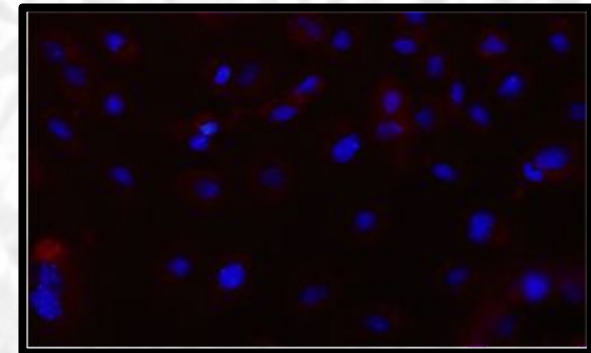
MitoSOX – вещество, которое при взаимодействии с супероксидом [перекись водорода] меняет свой цвет на красный. Клетки, которые стрессуются, выделяют именно такой вид оксида, поэтому с помощью MitoSOX-а можно регистрировать стресс клеток.



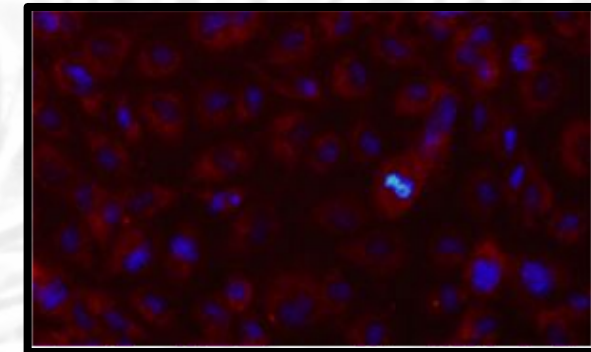
Окрашивание hEMVECs
blue – DAPI
red - MitoSOX



ctr

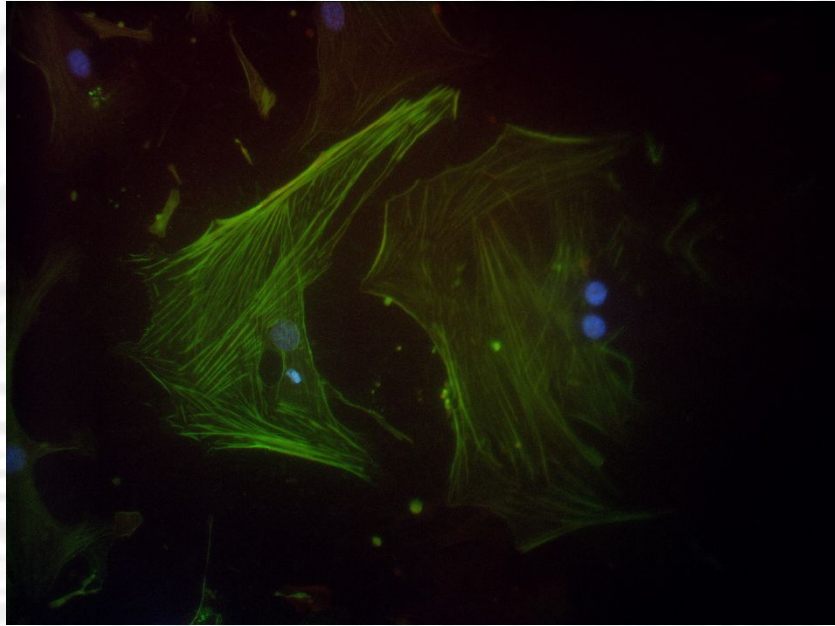


TNFα



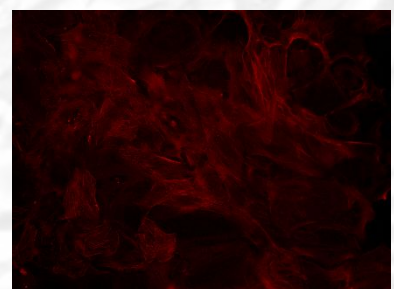
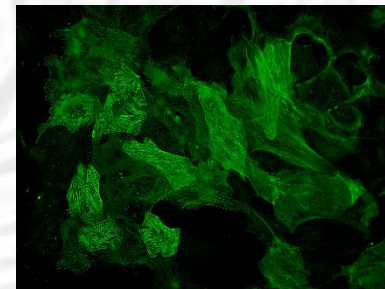
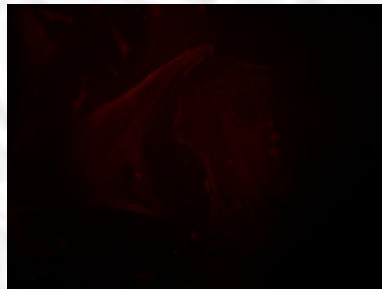
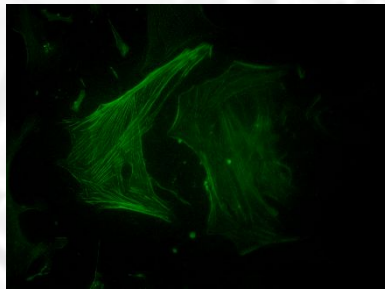
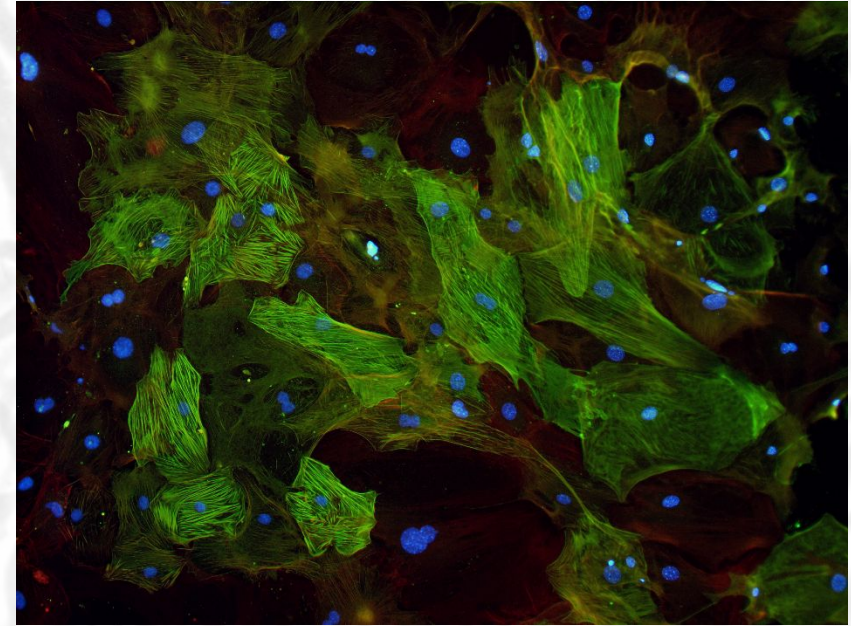
T cells

Анализ стресса в фибробластах

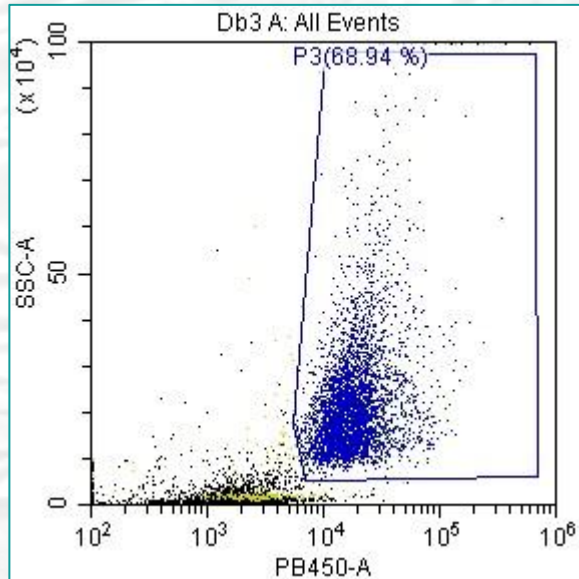


α SMA - green
Phalloidin – red
DAPI – blue

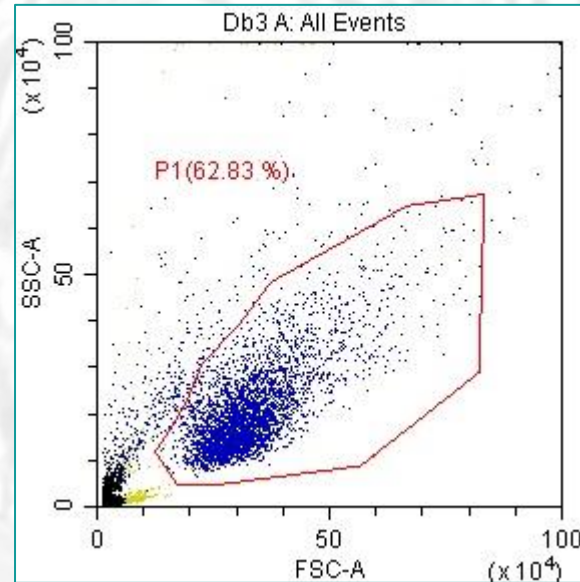
К фибробластам слева
лимфоциты не
добавлены, а справа-
добавлены.



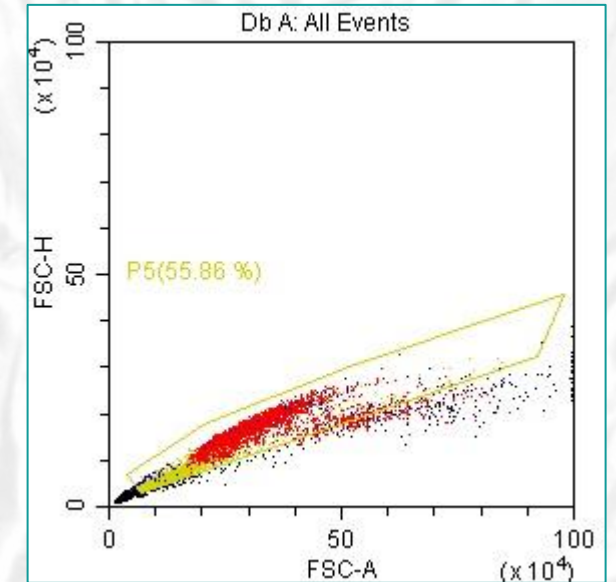
Детекция молекул адгезии в эндотелиальных клетках



Окрашивание на CD31 –
маркер эндотелиальных
клеток

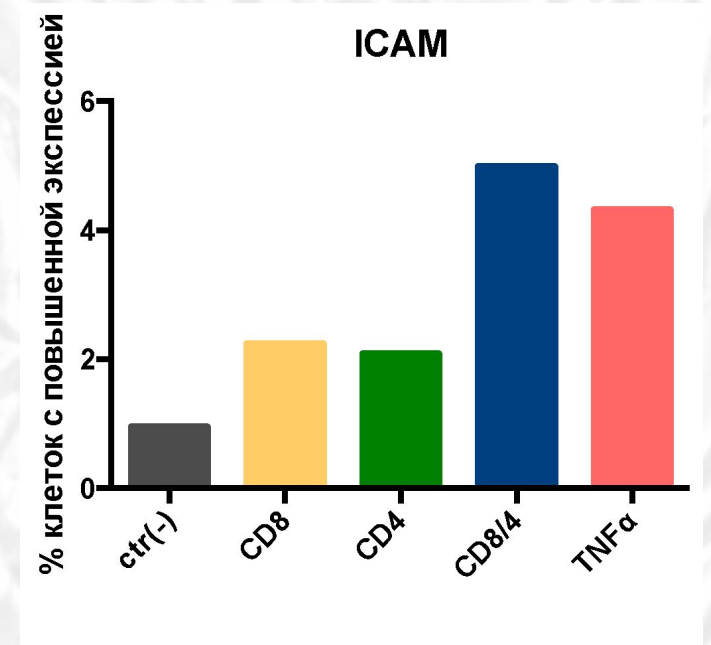
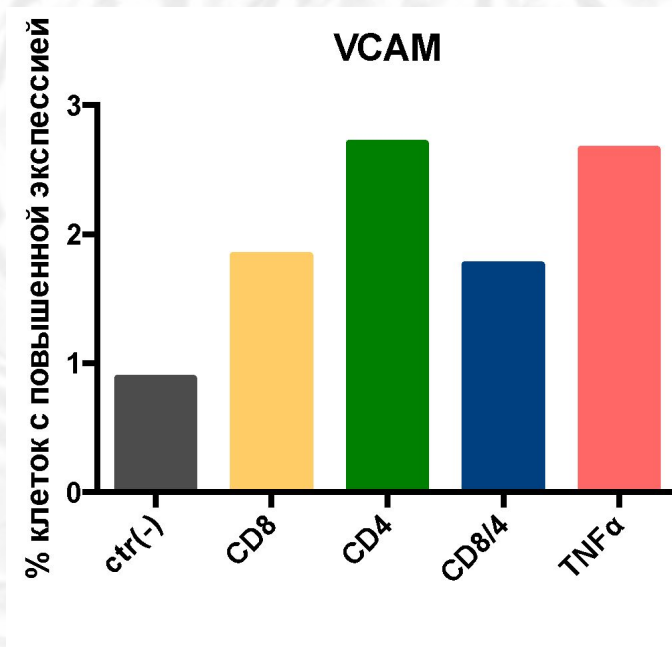
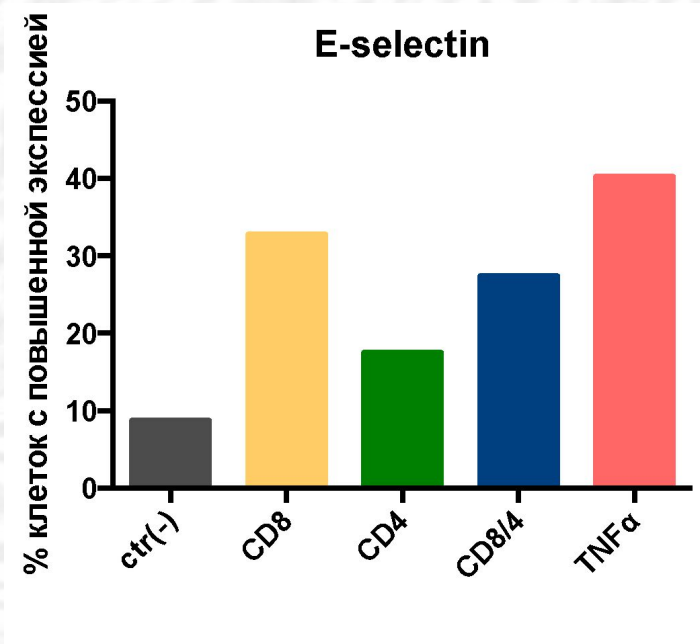


Определение
субпопуляции нужных
клеток по
светорассеиванию

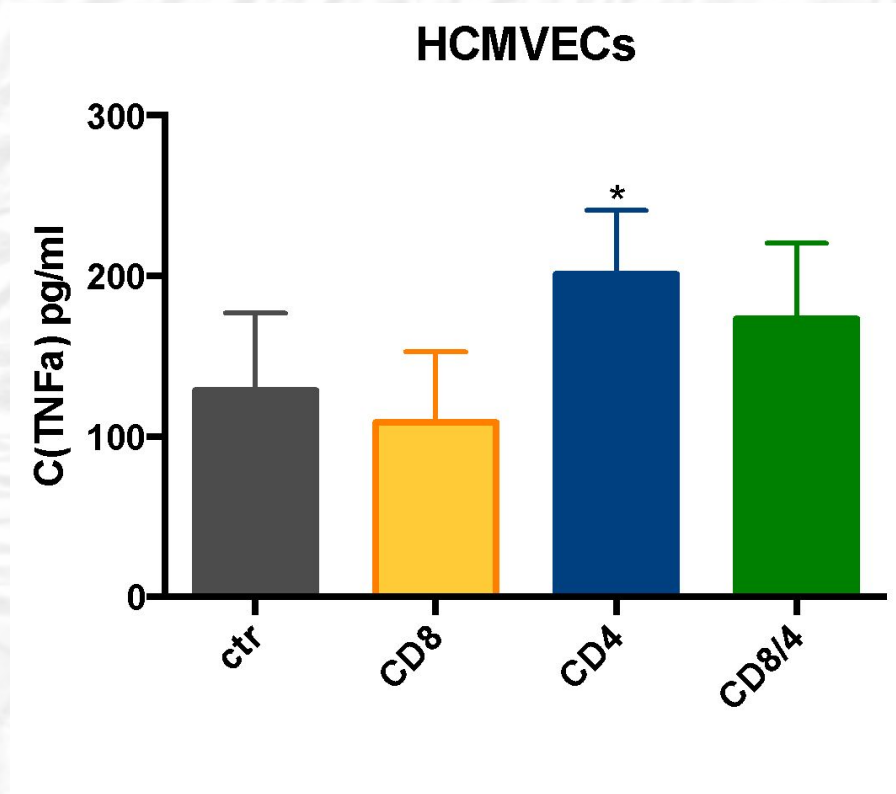


Выбор отдельных клеток
(исключение дубликатов
и кластеров)

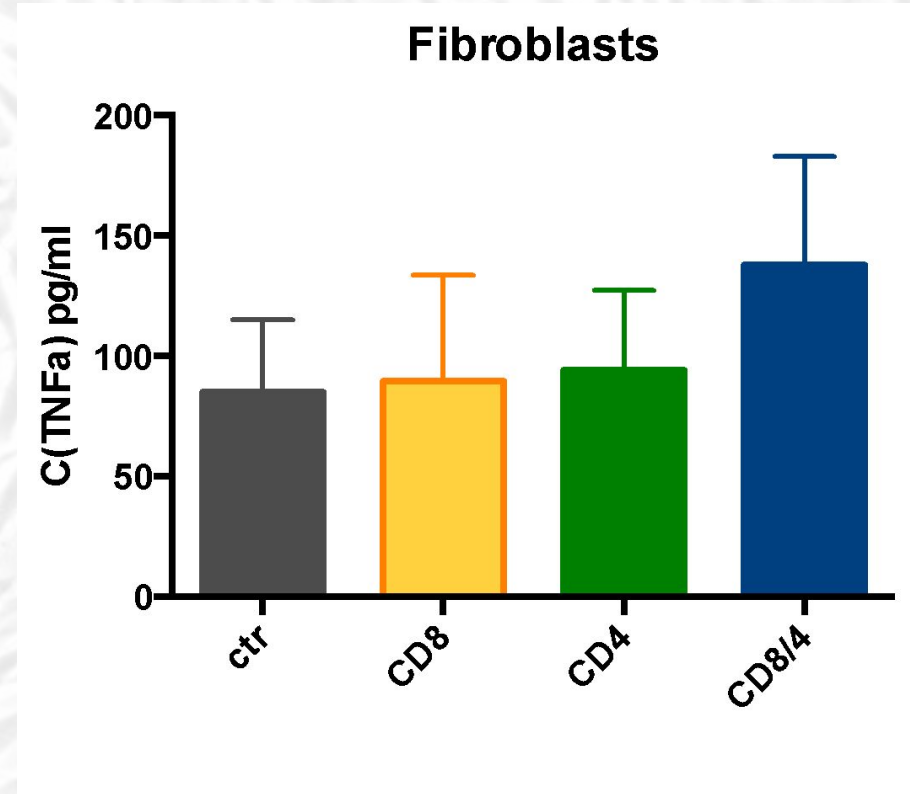
Детекция молекул адгезии в эндотелиальных клетках



ELISA по TNF- α (фактор некроза опухоли)



Эндотелий



Фибробласты

ВЫВОДЫ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТА

1. Иммуные клетки [CD4 и CD8] были выделены и активированы самым эффективным способом [пролиферация до 3х циклов деления у 90% клеток] способом. Для этого использовалось магнитная MACS сепарация.
2. Было выявлено отрицательное влияние гиперактивированных Т-клеток на здоровые клетки эндотелия, наблюдаемое в результате изменения морфологии и интенсивного выделения веществ, характерных для клеток, находящихся в состоянии стресса.
3. Было выявлено отрицательное влияние активированных Т-клеток на здоровые фибробласты, наблюдаемое в результате изменения морфологии и интенсивного выделения веществ, характерных для клеток, находящихся в состоянии стресса.

Активация иммунитета является необходимым фактором защиты организма, но несвоевременная искусственная гиперактивация может быть опасной для здоровых клеток организма и приводить к непредвиденным последствиям.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарим своих руководителей

Александра Сергеевича Вдовина

Дарью Юрьевну Вдовенко

Куратора направления Юрия Олеговича Молодых

Руководителя лаборатории «Биохакинг» Александра
Ефремова

лаборантов, своих коллег и весь центр «Сириус»!

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

И, конечно же, древних миног и миксин, которые развили иммунитет и теперь мы можем его изучать!

