Иммунитет. Как защититься от защиты?

Делаем жизнь человека безопасной

РУКОВОДИТЕЛЬ:
Вдовенко Дарья Юрьевна
Вдовин Александр Сергеевич

УЧАСТНИКИ:
Драгони 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

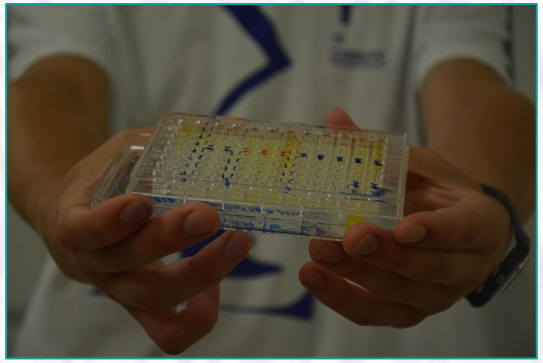
Изучение влияния активированных иммунных клеток на другие клетки организма на примере эндотелия и фибробластов

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].

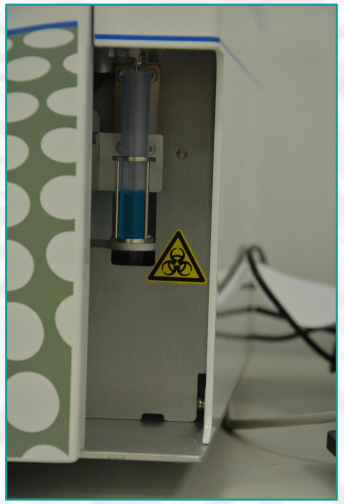
МЕТОДЫ

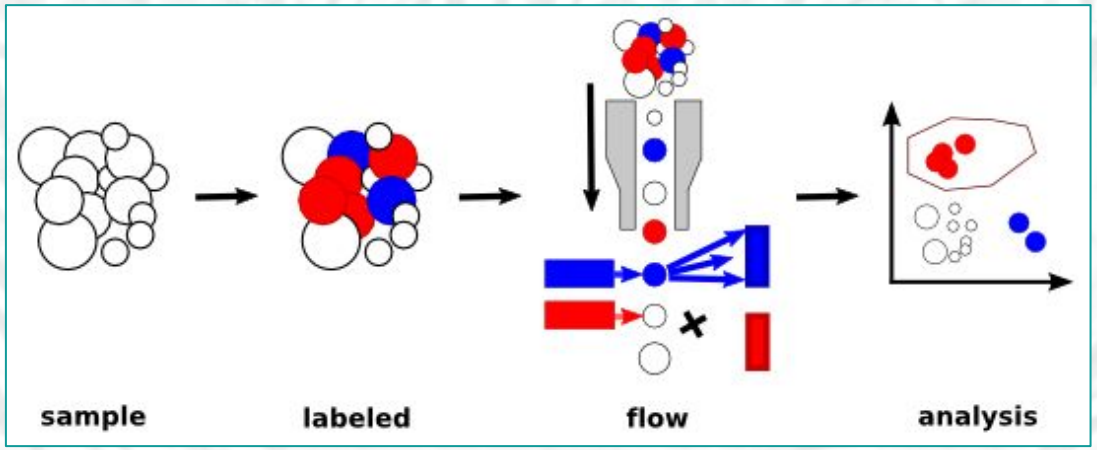
- Проточная цитофлуориметрия [FACS]
- Иммуноферментный анализ [ELISA]
- Флуоресцентная микроскопия
- Искусственная активация клеток и ведение совместных культур



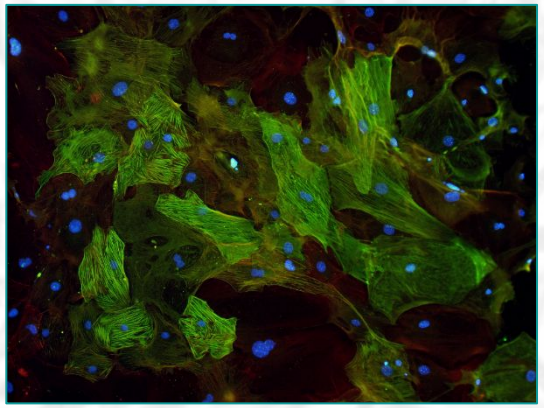
ELISA

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ





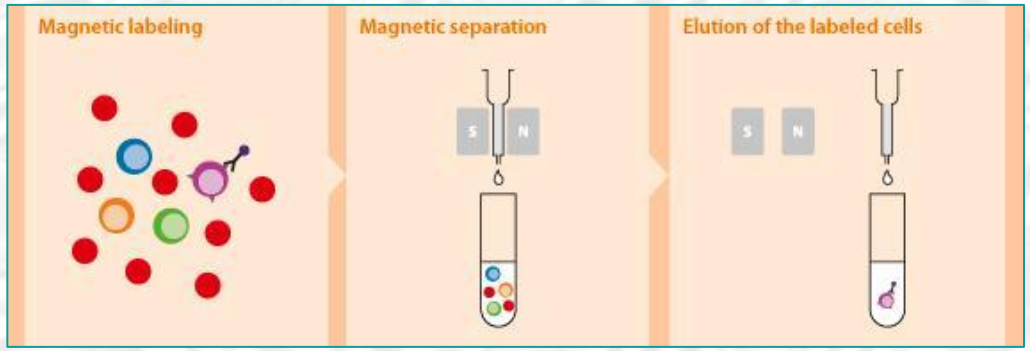
FACS



Флуорисцентная микроскопия

МЕТОДЫ

- Культивирование клеток
- MACS [магнитный сортинг специфических субпопуляций клеток]
- Окрашивание MitoSOX на АФК [образование супероксида]



МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

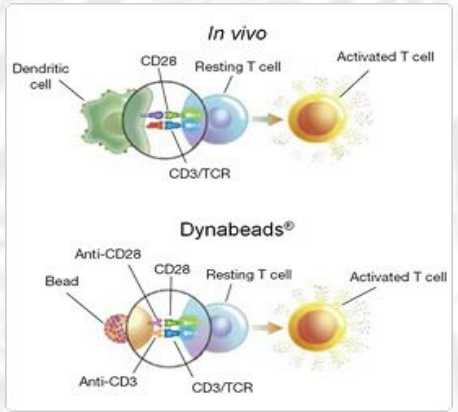
Работа проводилась на культурах человеческих клеток дермальных, фетальных дермальных и легочных фибробластов и сердечных микроваскулярных эндотелиальных клетках и клетках эндотелия аорты методом совместных культур с активированными Т-клетками человека.

ОСНОВНАЯ СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Т-клетки человека

MACS

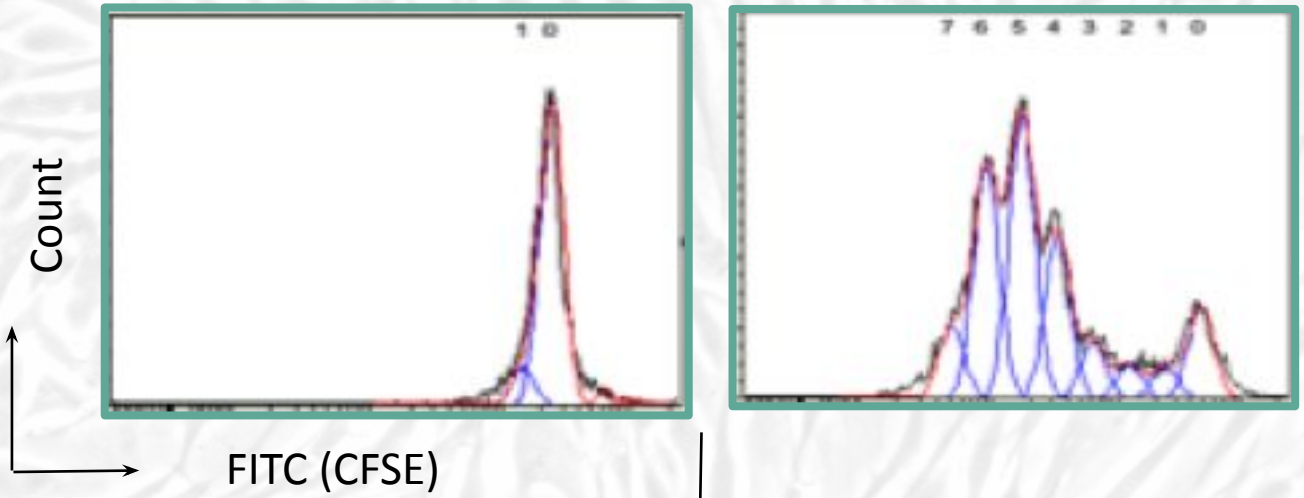
CD8$^+$ T-клетки



Активация Dynabeads

CD4$^+$ T-клетки

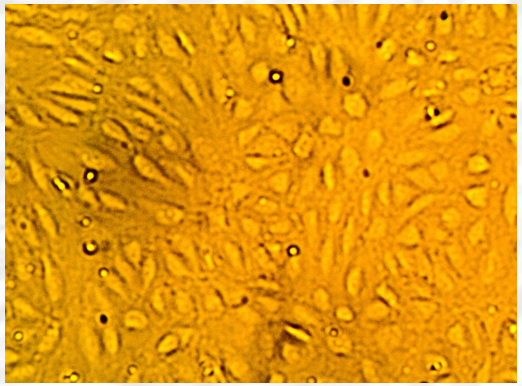
Проверка пролиферации (CFSE)



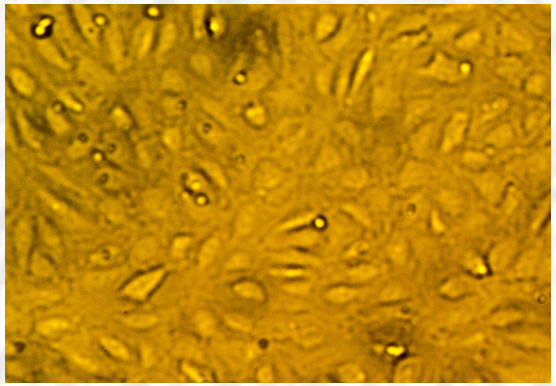
Культуры клеток человека

СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

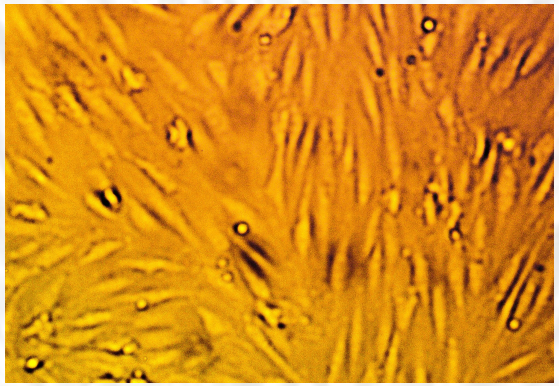
Анализ морфологии клеток через 24 часа



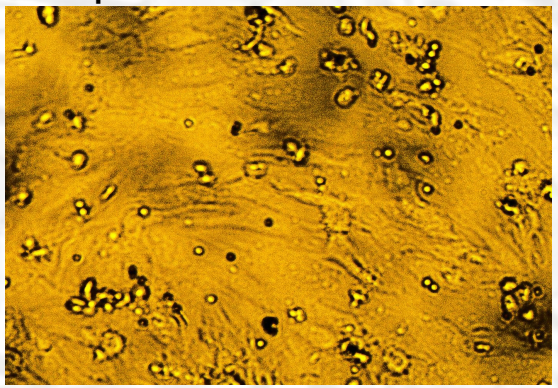
Отрицательный контроль



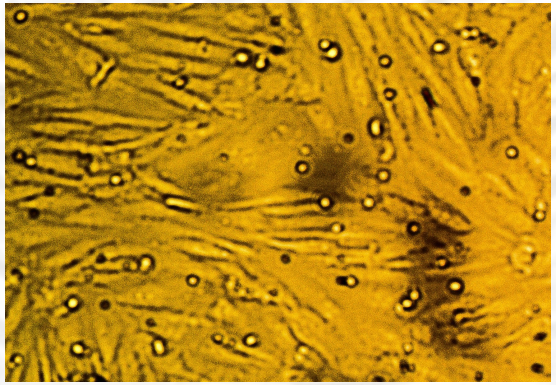
Контроль с бидсами



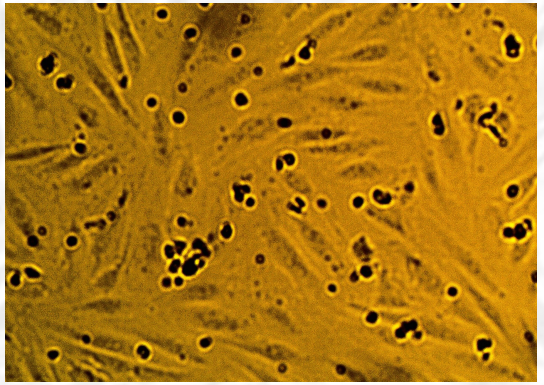
Положительный контроль с TNFα



Клетки с CD4



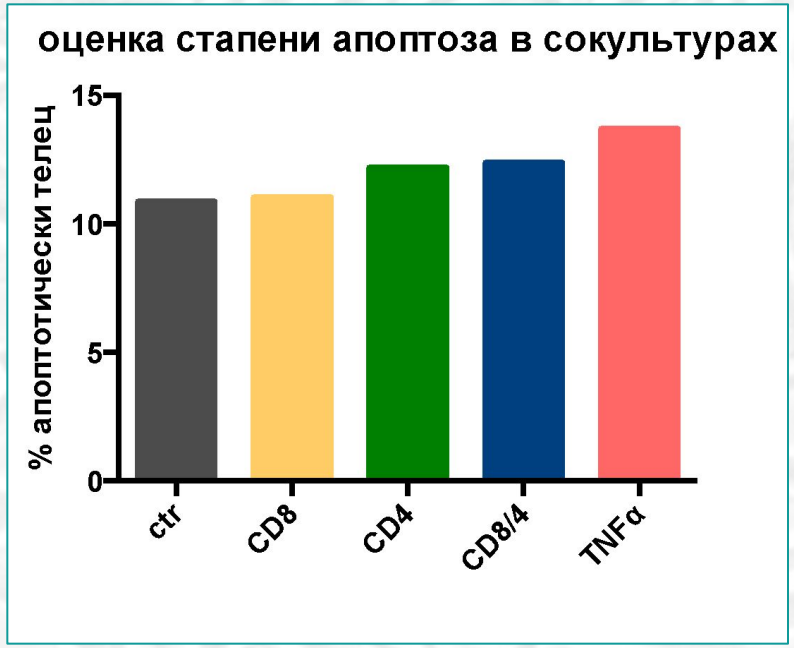
Клетки с CD8



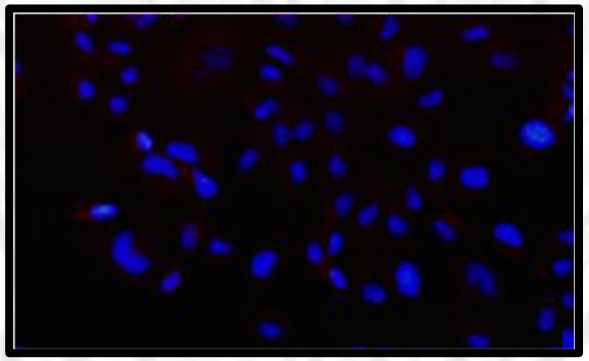
Клетки с CD4 и CD8

MitoSOX - анализ стресса в клетках эндотелия

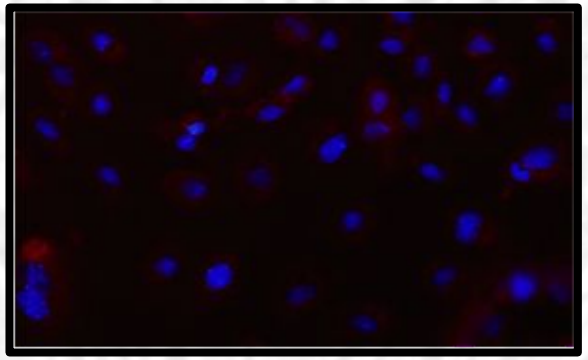
MitoSOX – вещество, которое при взаимодействии с супероксидом [перекись водорода] меняет свой цвет на красный. Клетки, которые стрессуются, выделяют именно такой вид оксида, поэтому с помощью MitiSOX-а можно регистрировать стресс клеток.



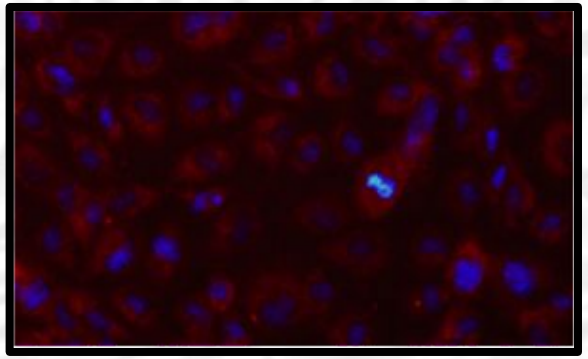
Окрашивание HCMVECs
blue – DAPI
red - MitoSOX



ctr

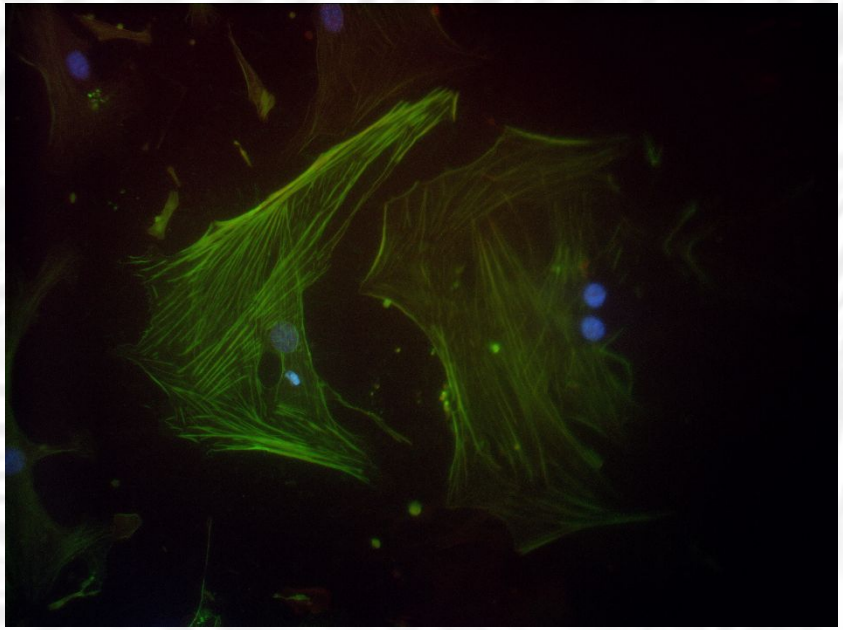


TNFα



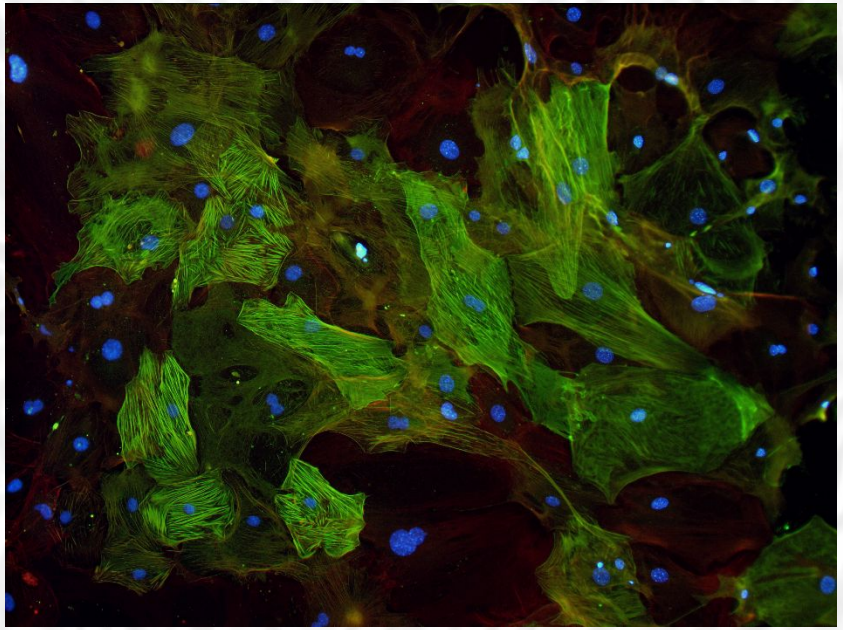
T cells

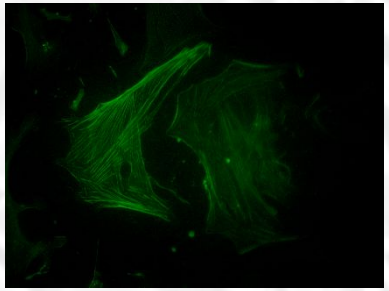
Анализ стресса в фибробластах

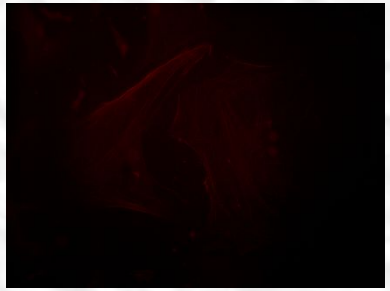


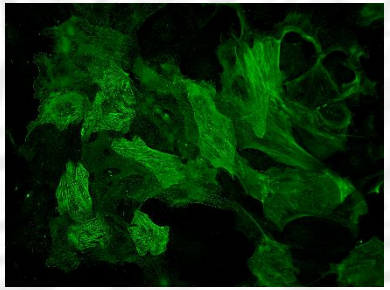
αSMA - green
Phalloidin – red
DAPI – blue

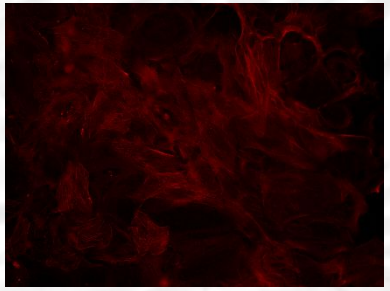
К фибробластам слева лимфоциты не добавлены, а справа- добавлены.



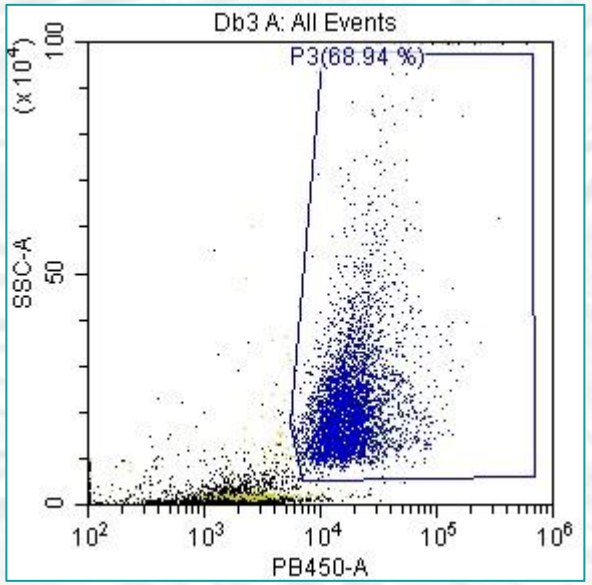




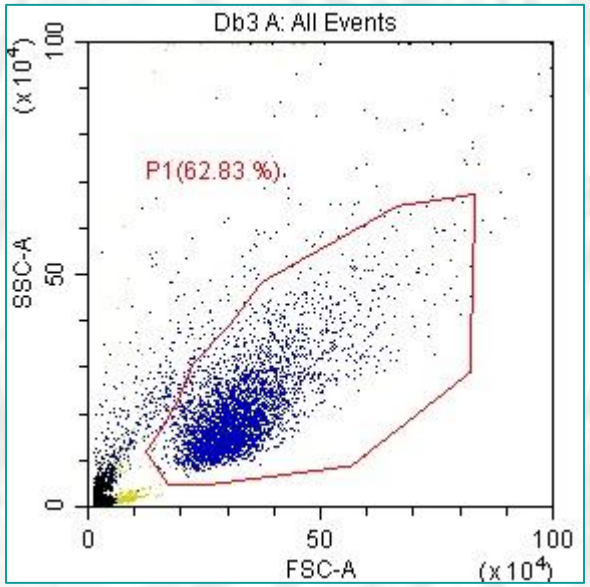




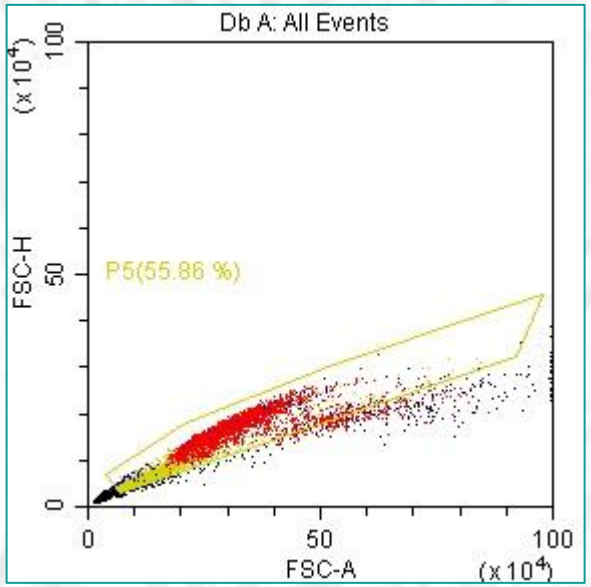
Детекция молекул адгезии в эндотелиальных клетках



Окрашивание на CD31 – маркер эндотелиальных клеток

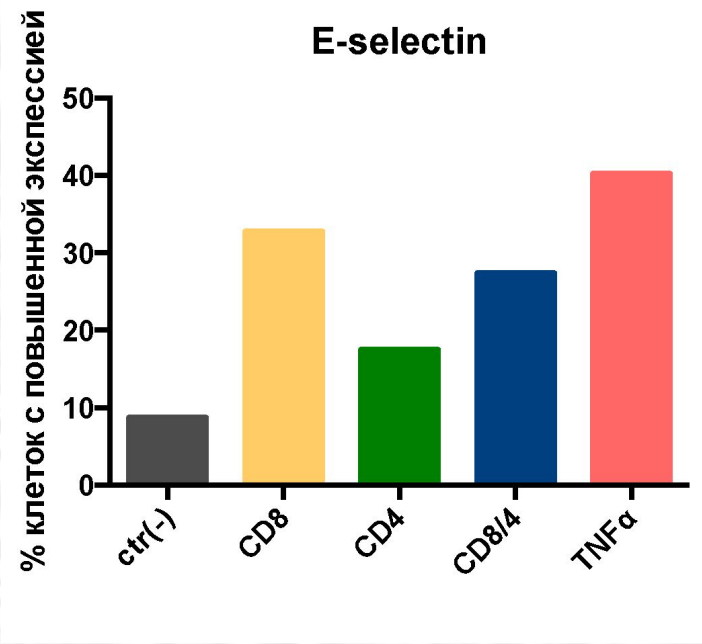


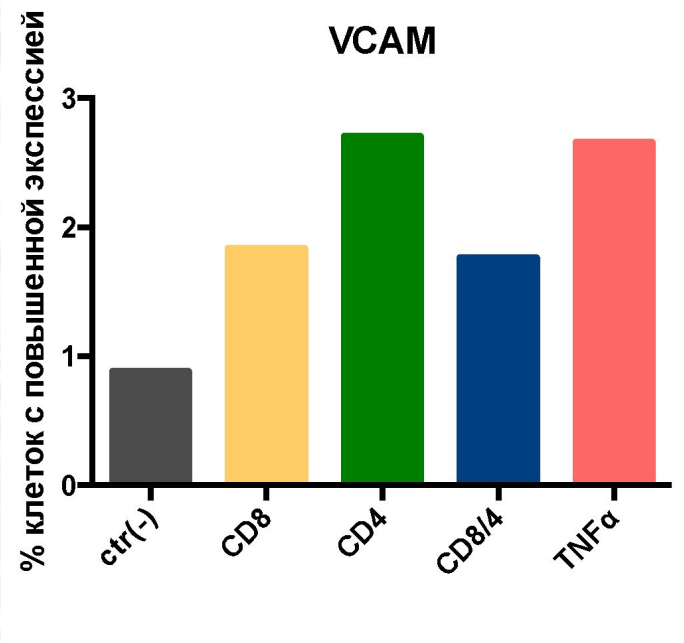
Определение субпопуляции нужных клеток по светорассеиванию

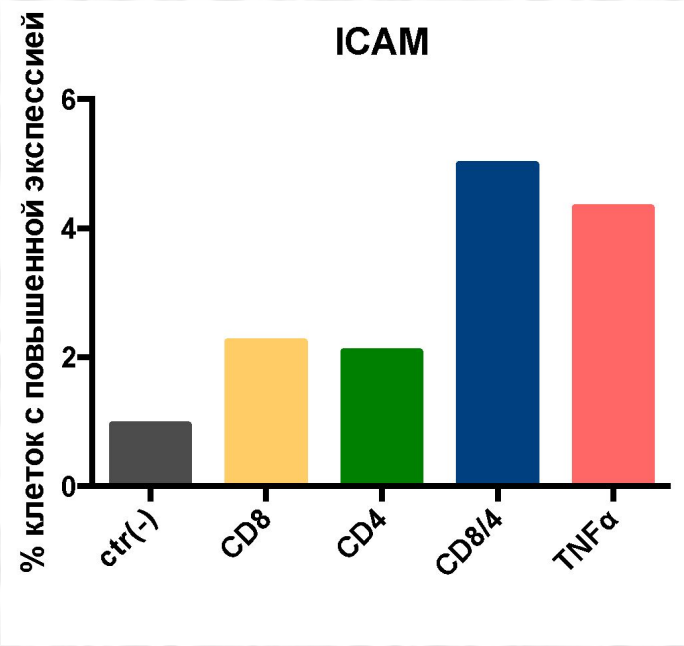


Выбор отдельных клеток (исключение дубликатов и кластеров)

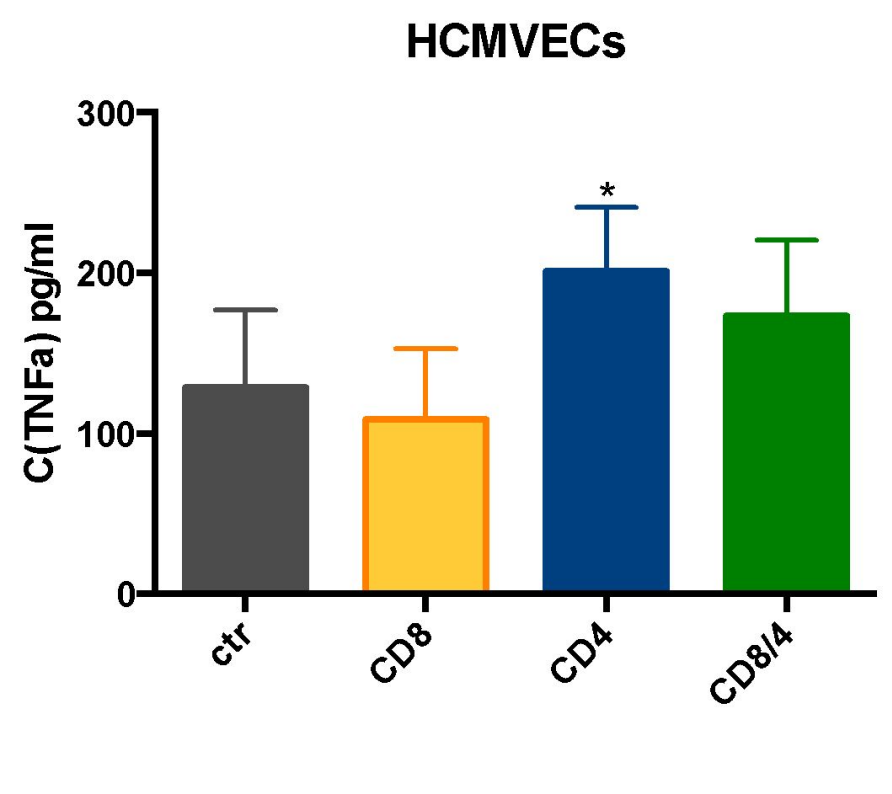
Детекция молекул адгезии в эндотелиальных клетках



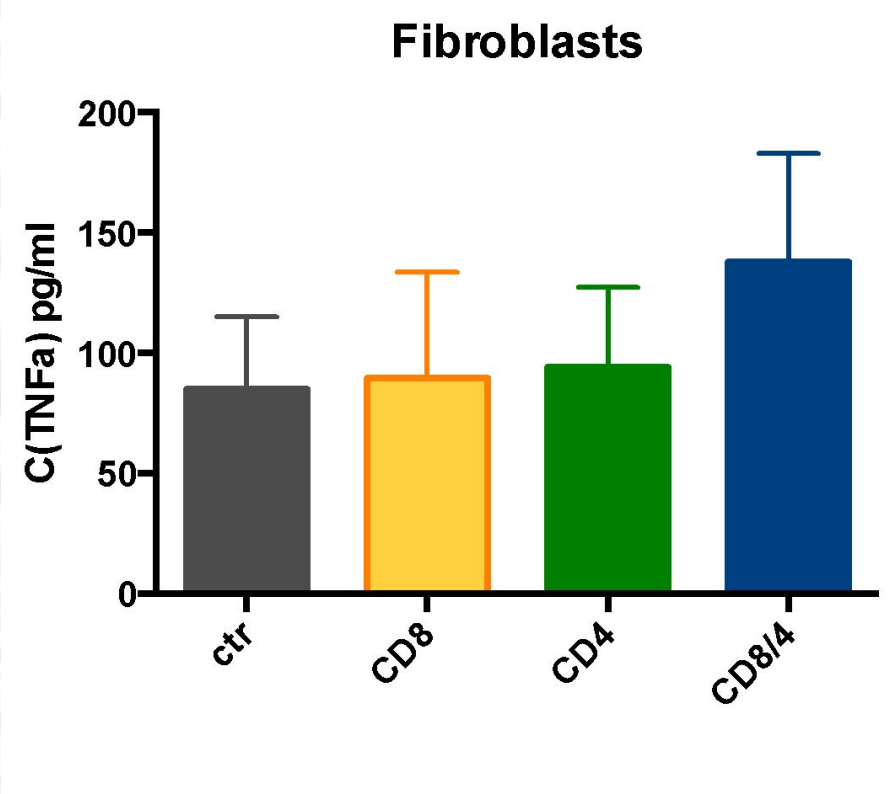




ELISA по TNF-α (фактор некроза опухоли)



Эндотелий



Фибробласты

ВЫВОДЫ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТА

1. Иммунные 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

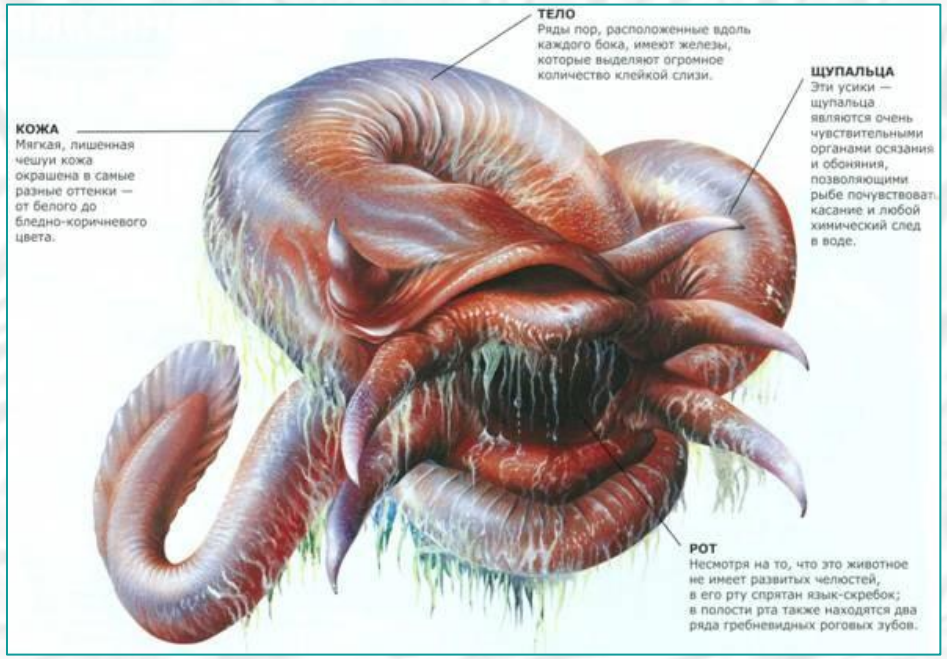
Дарью Юрьевну Вдовенко

Куратора направления Юрия Олеговича Молодых

Руководителя лаборатории «Биохакинг» Александра Ефремова

лаборантов, своих коллег и весь центр «Сириус»!

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



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!