ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России
Медико-биологический факультет
Кафедра иммунологии

Оценка клеточной цитотоксичности

Подготовил: студент медико-биологического факультета
гр.3.4.01
Куликов Филипп

Контактный цитолиз

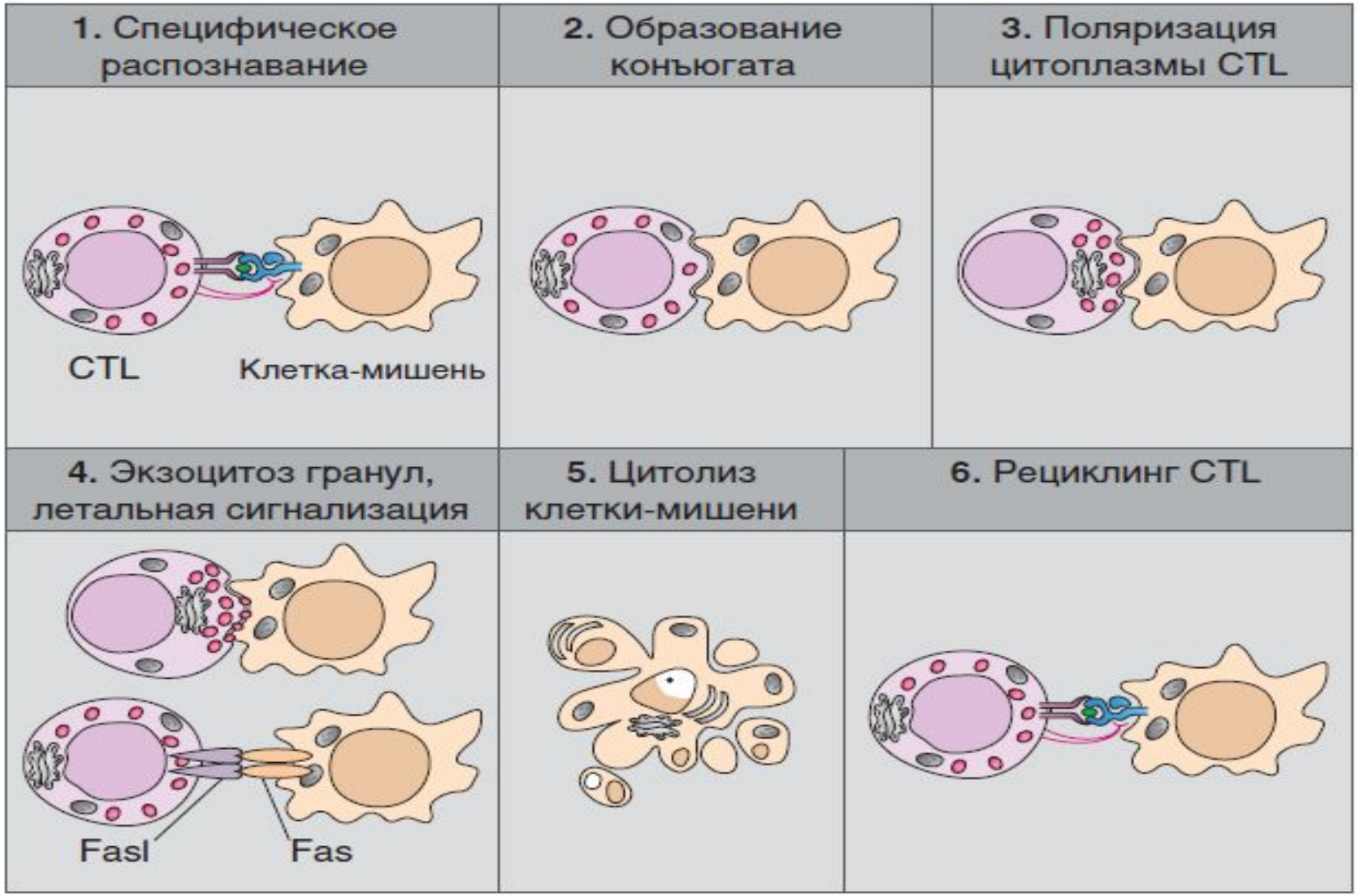


Рис.1. Этапы контактного цитолиза

Контактный цитолиз

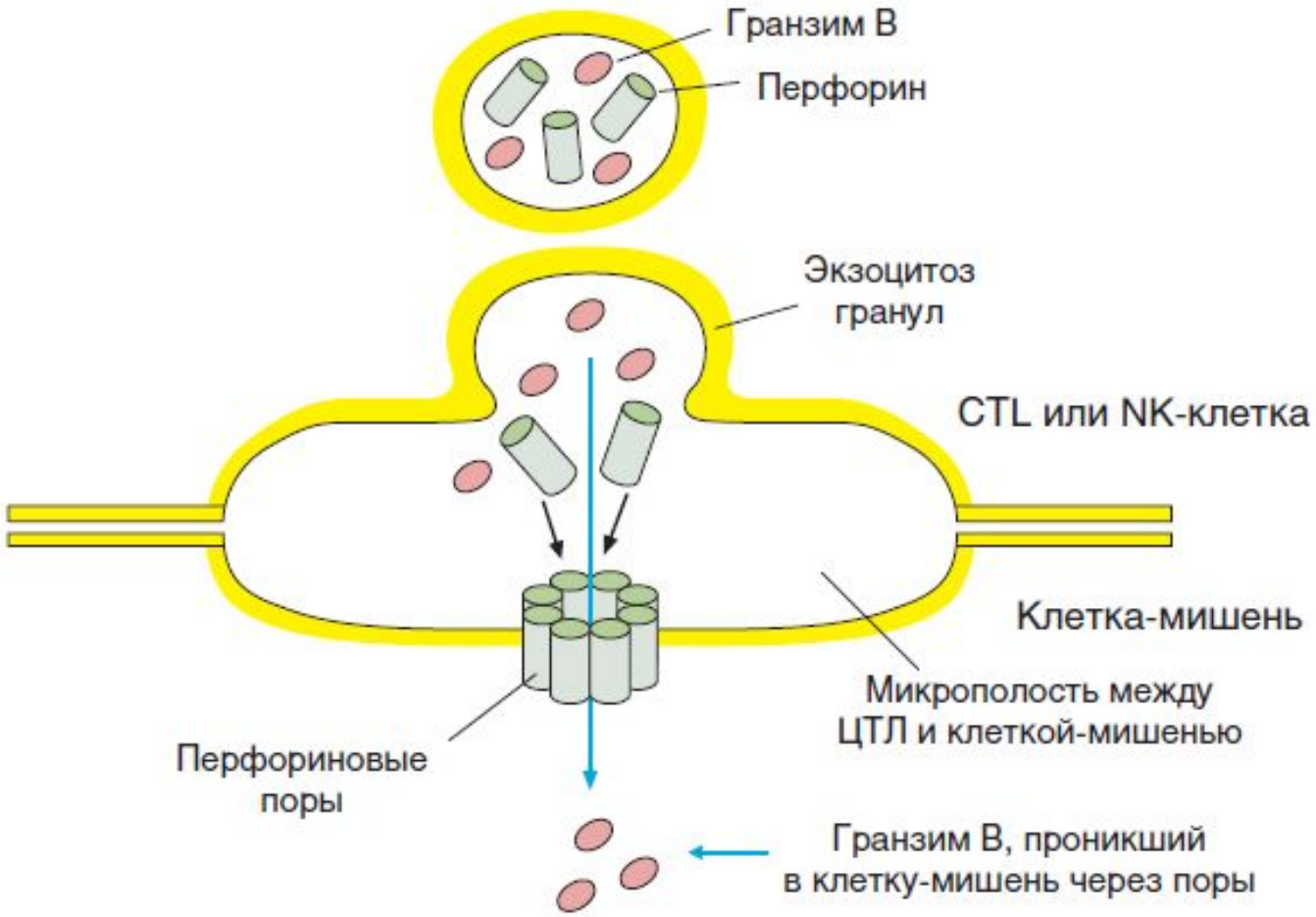


Рис.2. Перфорин-гранзимовый механизм. Мирополость

Контактный цитолиз

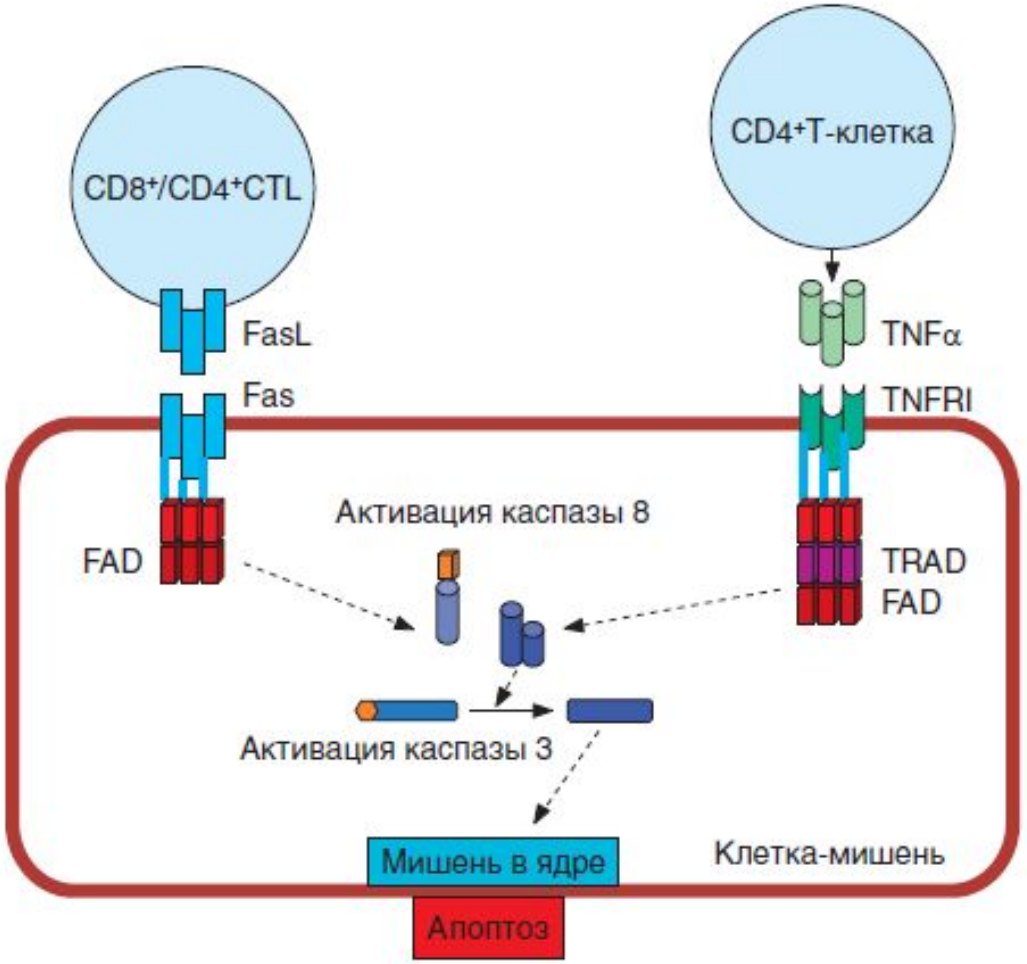


Рис.3. Индукция апоптоза через Fas-рецептор

Антителозависимая клеточная цитотоксичность

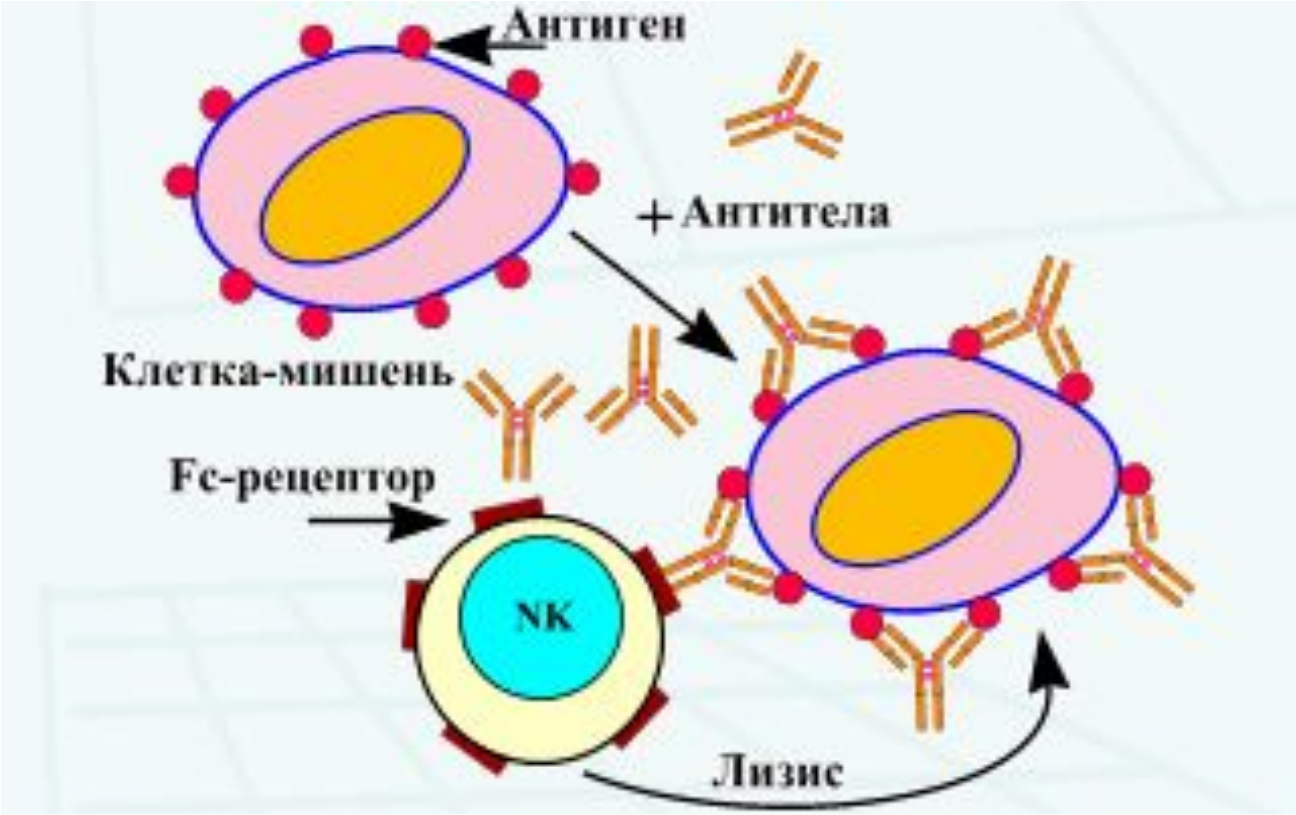


Рис.4. Схема АЗКЦ (активация NK-клетки через FcγRIII)

Цитотоксические клетки

NK-клетки

$CD8^+$ Т-лимфоциты

Клетки естественного иммунитета	Клетки адаптивного иммунитета
Ответ в пределах часа	Ответ в течение недели
Реагируют как единая популяция	Клональность
Активация путем распознавания «стрессорных» молекул и концепция «потеря своего»	Активация антигеном/митогеном

Активация NK-клеток

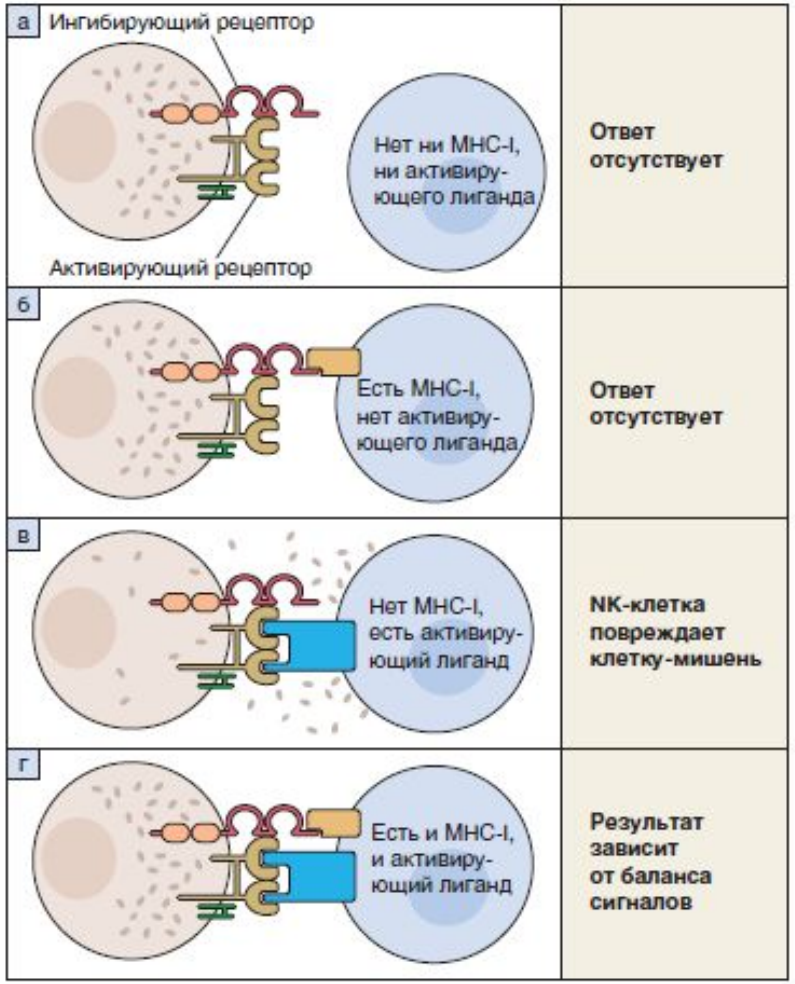


Рис.5. Варианты лиганд-рецепторого взаимодействия на NK-клетках

Лабораторные методы определения функции NK-клеток

<u>Клеточная линия:</u> клетки линии эритромиелоидного лейкоза человека ***K562***

1. Оценка цитотоксичности по выходу ^{51}Cr
2. Оценка клеточного цитолиза по ослаблению ^{3}H-уридиновой метки
3. Метод оценки функциональной активности NK-клеток с использованием проточной цитометрии

Оценка цитотоксичности по выходу ^{51}Cr

- **Принцип метода**: основан на оценке цитолиза меченых клеток-мишеней, после их кратковременной инкубации с клеточными суспензиями, содержащими естественные киллеры. Цитолиз оценивается по выходу радиоактивной метки (^{51}Cr), предварительно введенной в клетки

$$ИЦ = \frac{Эксп - Спонт}{Макс - Спонт}$$

Оценка клеточного цитолиза по ослаблению ^{3}H-уридиновой метки

- **Принцип метода:** основан на оценке цитолиза меченых клеток-мишеней, после их кратковременной инкубации с клеточными суспензиями, содержащими естественные киллеры. Цитолиз оценивается по потере клетками предварительно введенной метки (^{3}H-уридина).

$$CT = \%\text{лизиса} - \left(1 - \frac{A - C}{B - C}\right) * 100$$

Нормативы: 45,5±15,6 при разбросе данных 5,6-86%

Метод оценки функциональной активности NK-клеток с использованием проточной цитометрии

- **Принцип метода:** окрашивание клеток-мишеней CFSE используется для их дифференцировки от эффекторных клеток. После совместной инкубации и окрашивания пропидия йодидом (который проникает только в погибшие клетки и взаимодействует с ДНК) оценивается гибель клеток мишеней по присоединению к зеленой флуоресценции красного флуоресцентого окрашивания пропидия йодидом.

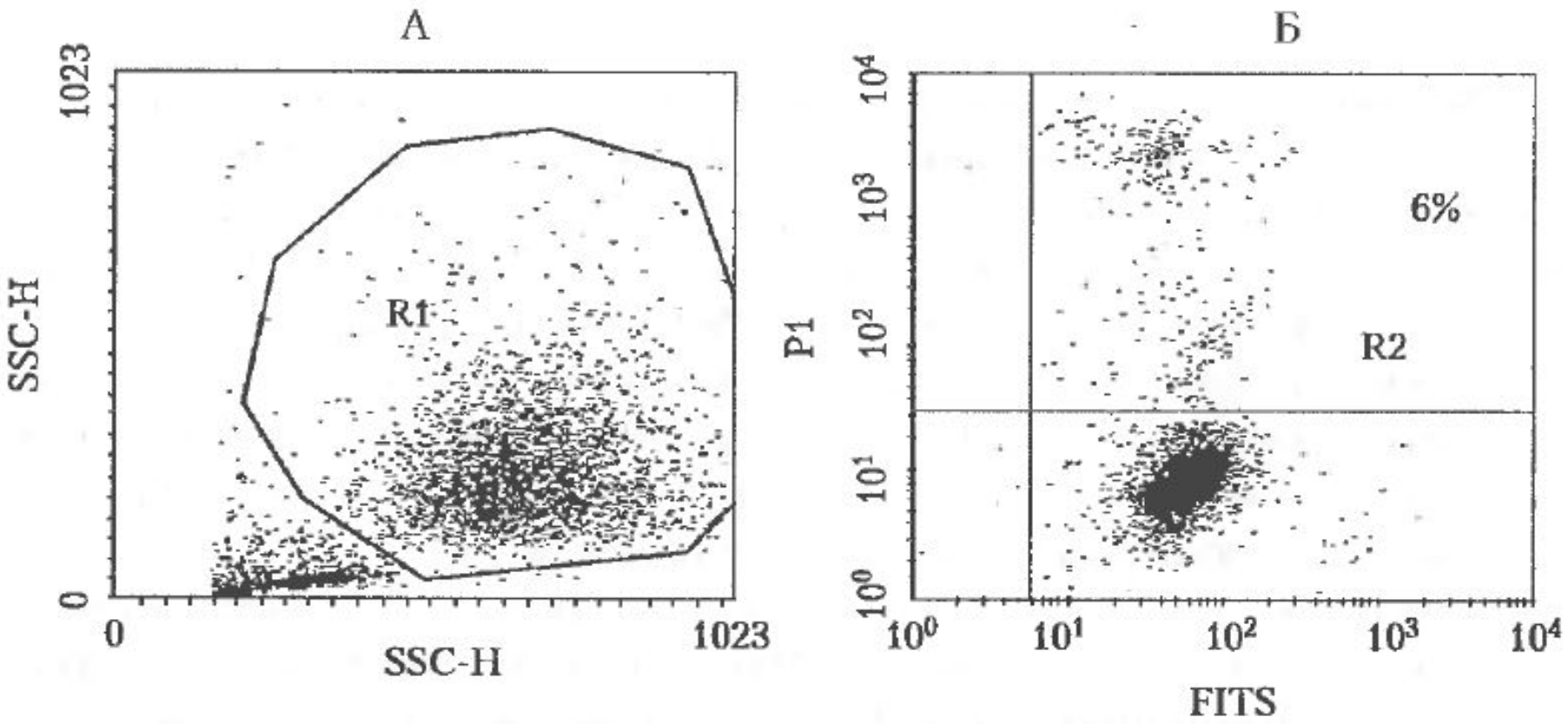


Рис. 5.11. Спонтанная гибель клеток-мишеней К-562.
А — выделены клетки-мишени по показателям малоуглового (FS) и бокового (SS) светорассеяния; Б — среди всех клеток-мишеней погибшие клетки (правый верхний квадрант). По осям абсцисс — интенсивность зеленой флуоресценции, по осям ординат — интенсивность красной флуоресценции

- **Нормативы:** спонтанная гибель клеток линии К562 в контрольных пробах составляет 3,6±1,%

$$\%\text{уб. кл.} = \%\text{уб. кл. о.} - \%\text{мертв. к.}$$

Активация $CD8^+$ Т-лимфоцитов

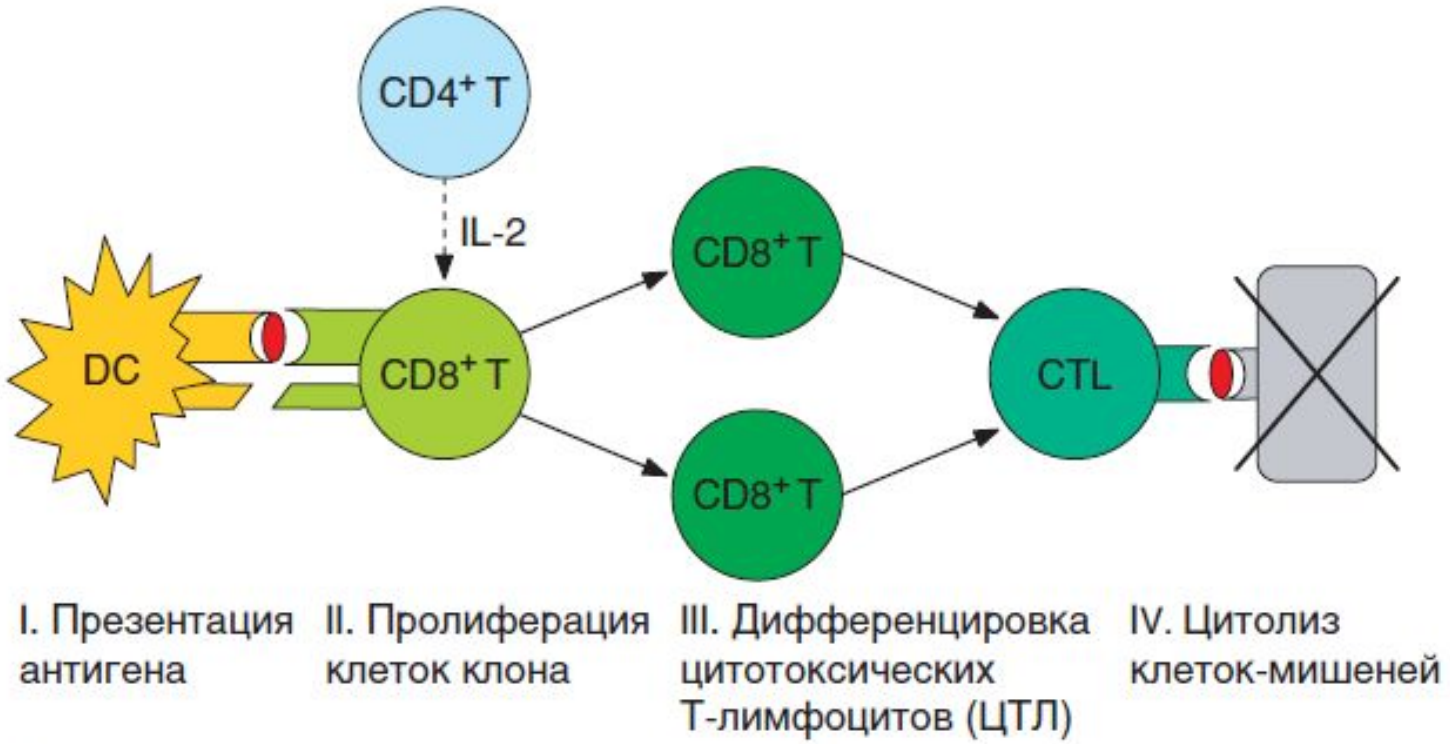


Рис.7. Схема развития цитотоксического Т-клеточного ответа

Активация $CD8^+$ Т-лимфоцитов

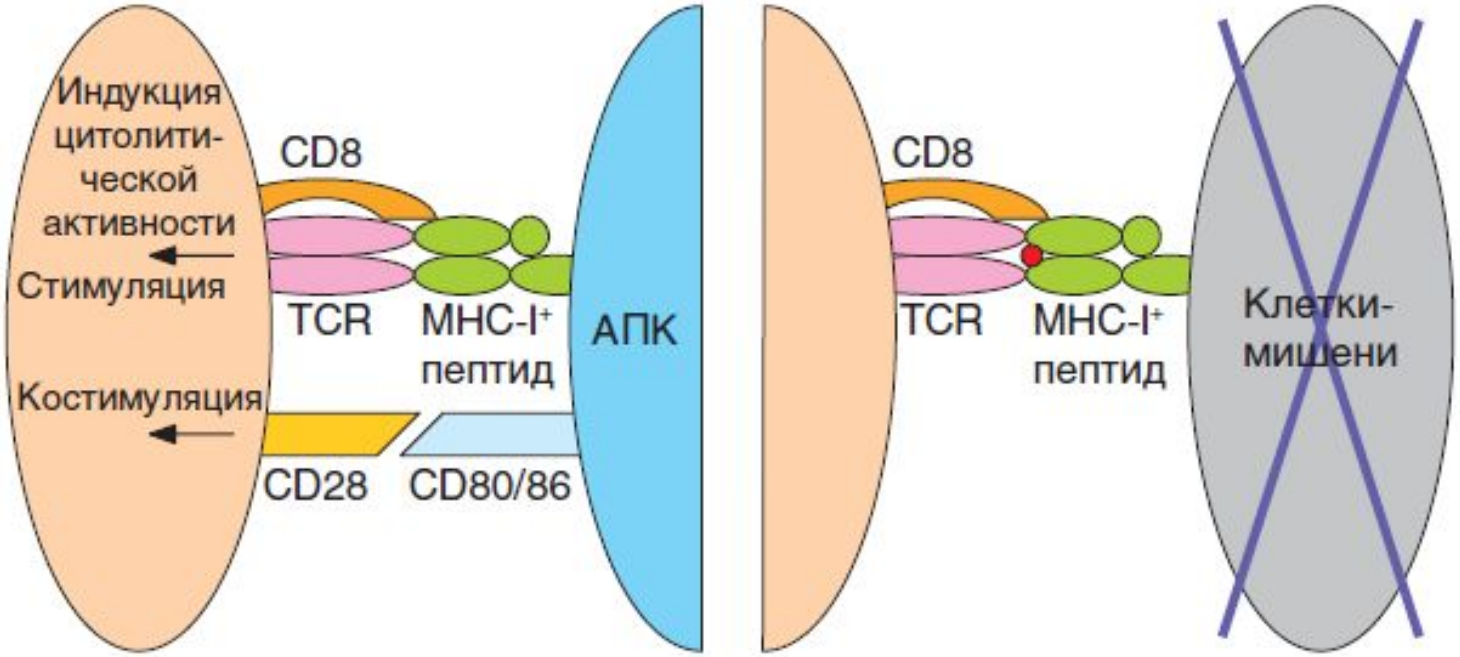


Рис.8. Схема активации $CD8^+$ Т-лимфоцита и распознавание клетки-мишени

Лабораторные методы определения функции Т-лимфоцитов

1. Определение реакции Т-клеток на антигены МНС в СКЛ.
2. Определение антигенспецифических Т-лимфоцитов с использованием МНС-пептидных тетрамеров. .
3. Метод определения цитолитической активности цитотоксических Т-лимфоцитов.
4. Определение цитолитичеких $CD8^+$ Т-клеток с помощью реакции специфической дегрануляции.
5. Реакция торможения миграции лейкоцитов.

Определение реакции Т-клеток на антигены МНС в СКЛ

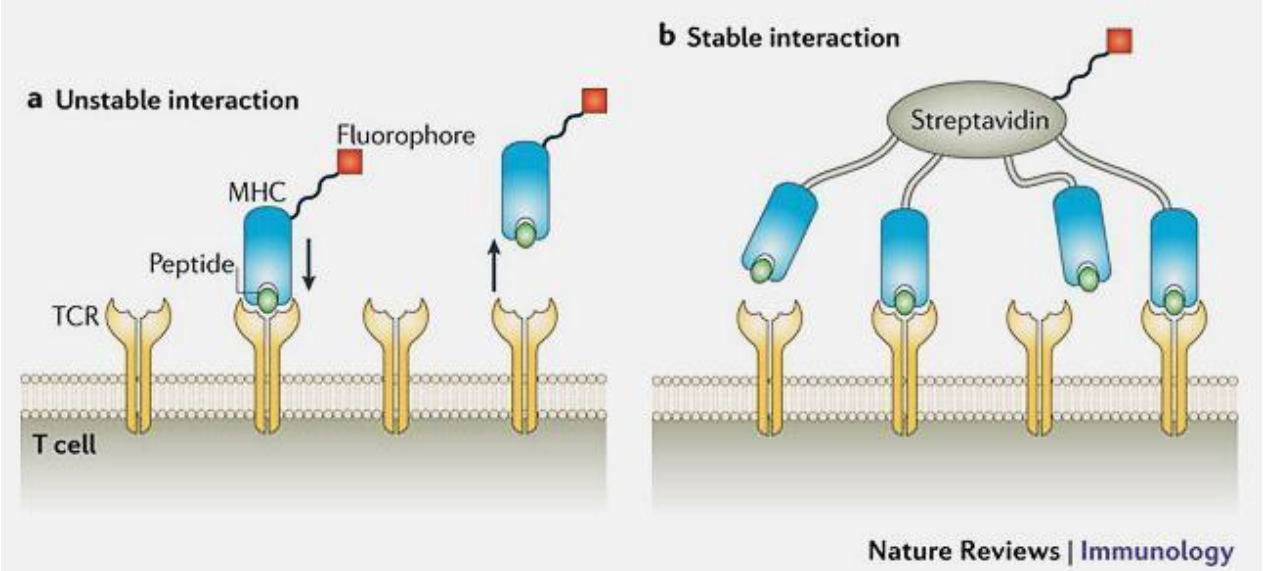
- **Цель теста:** оценка пролиферативной реакции отвечающих клеток на действие клеток-стимуляторов, точнее на аллогенные молекулы МНС, которые они несут.

$$\text{ИС} = \frac{\left(\frac{\text{имп}}{\text{мин}}\right)\text{О}}{\left(\frac{\text{имп}}{\text{мн}}\right)\text{К}}$$

Определение антигенспецифических Т-лимфоцитов с использованием МНС-пептидных тетрамеров.

- Проблема 1: низкий процент клеток конкретных клонов Т-лимфоцитов
- Проблема 3: невозможность прочного связывания растворимых лигандов с TCR

Данные проблемы были решены с помощью сборки тетрамерных структур

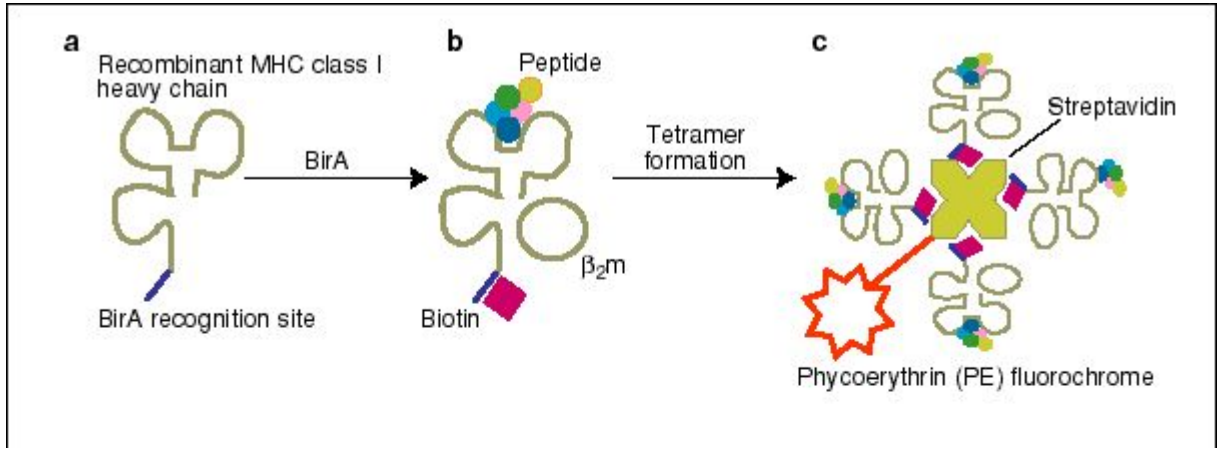


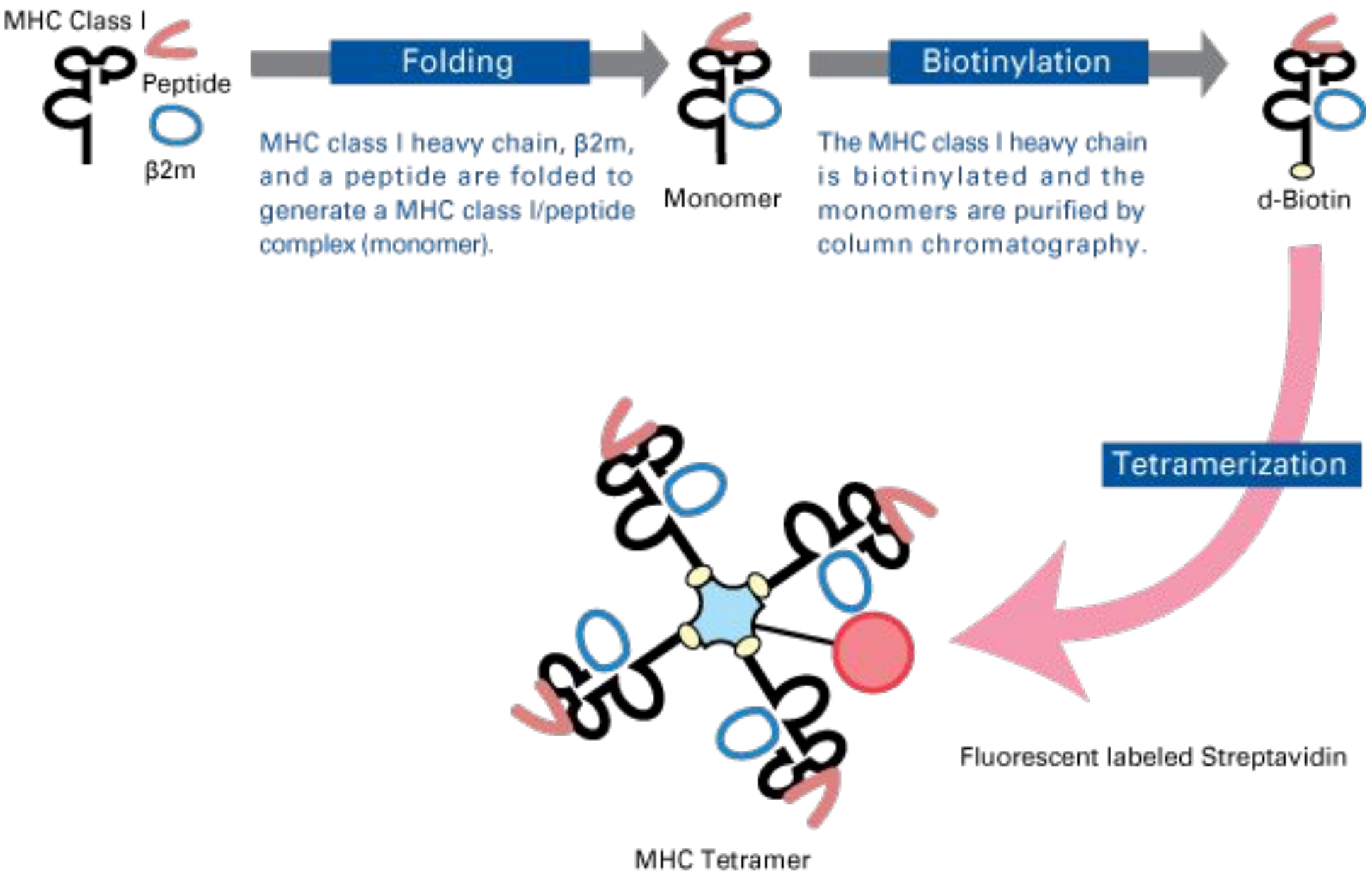
Метод синтеза тетрамеров

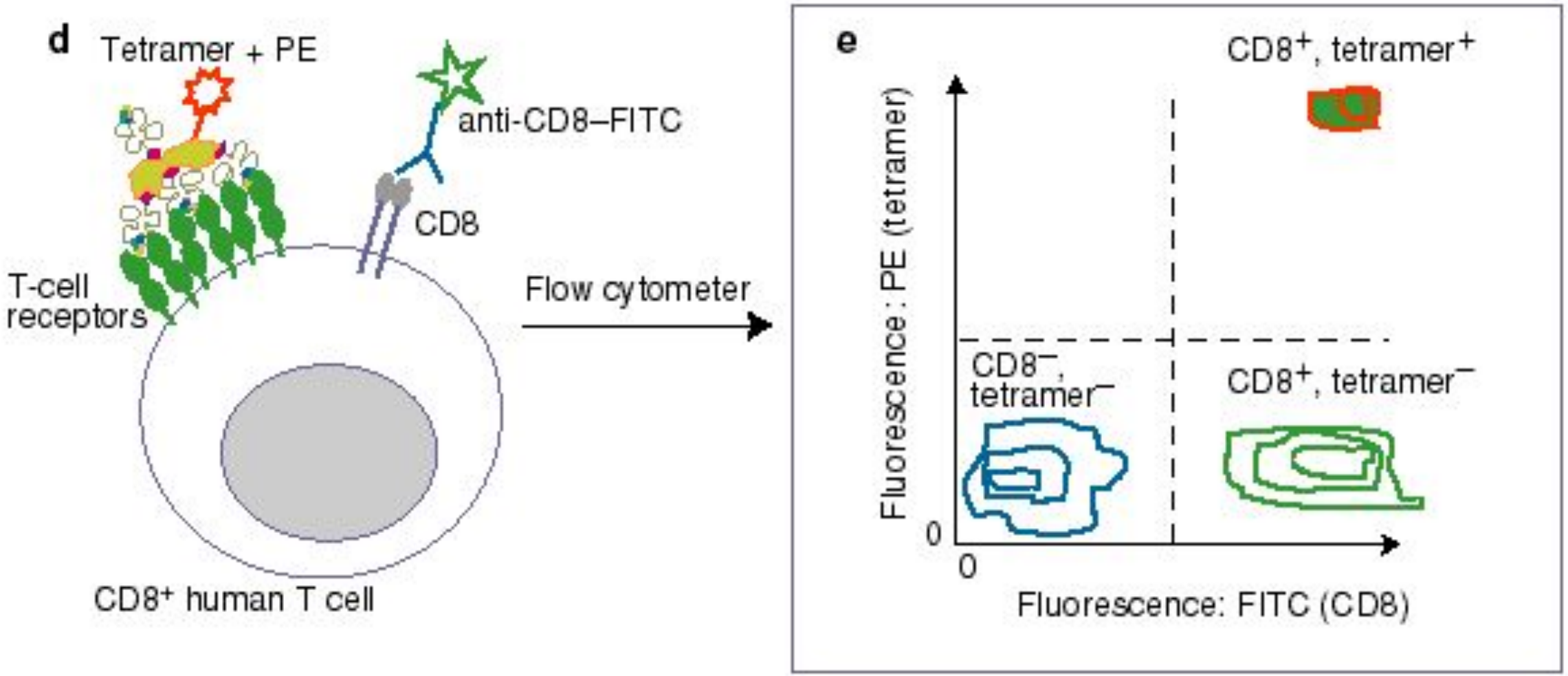
1. Получение тяжелой цепи MHC-I, содержащей участок для биотинилирвоания
2. Создание комплекса модифицированной тяжелой цепи MHC-I с β_2 – микроглобулином и специфическим антегенным пептидом
3. Биотинилирование комплекса MHC-пептид
4. Синтез тетрамера

5’ HLA-A2 gene 3’ + Sequence for biotinHliation

5’ HLA-A2 gene 3’ Sequence for biotinylation → E.Coli’s plasmide




MHC Class I
Peptide
β2m
Folding
MHC class I heavy chain, β2m, and a peptide are folded to generate a MHC class I/peptide complex (monomer).
Monomer
Biotinylation
The MHC class I heavy chain is biotinylated and the monomers are purified by column chromatography.
d-Biotin
Tetramerization
Fluorescent labeled Streptavidin
MHC Tetramer



Tetramer analysis to detect T lymphocytes (T cells) that have specific T-cell receptors on their cell surface

Expert Reviews in Molecular Medicine

Применение метода

1. Контроль за численностью клеток в клонах и её динамикой при инфекционных процессах, аутоиммунной патологии, злокачествтенных опухолях, вакцинации, а также при трансплантации тканей
2. Выделение антигенспецифических клеток, пригодных для использования с целью иммунотерапии
3. Тетрамеры на основе пептидов, комплексированных с молекулами МНС, используются для локализации Т-клеточных эпитопов в макромолекулах
4. Предполагается использование тетрамеров, содержащие кроме молекул МНС пептидов, цитотоксические агенты для прицельной элиминации патологических клонов Т-клеток при аутоиммунных процессах (показано в опытах на мышах)

Метод определения цитолитической активности цитотоксических Т-лимфоцитов.

- Определение активности иммунных цитотоксических Т-лимфоцитов отличается от оценки активности NK-клеток только наличием этапа индукции цитотоксических Т-лимфоцитов
- Реакция определения цитолиза, опосредованного цитотоксическими Т-лимфоцитами, представляет с собой совмещение методов СКЛ и оценки спецфического цитолиза клеток-мишеней, меченных ^{51}Cr.
- Ограниченность применения реакции обусловлена главным образом тем, что она дает информацию только о цитотоксическом ответе на МНС-антигены (HLA I класса).

Определение цитолитичеких $CD8^+$ Т-клеток с помощью реакции специфической дегрануляции.

- В состав мембраны цитотоксических гранул входит антиген CD107a (LAMP-1), который является специфическим макером гранул и отсутствует на поверхности неактивированных $CD8^+$ Т-лимфоцитов.
- Метод позволяет идентифицировать именно цитолитические антигенспецифические Т-клетки.
- Количественным.
- Высокочувствительным.

Нормативы

- Спонтанная дегрануляция – 0,2±0,1%
- Дегрануляция, индуцированная МАТ к CD3, - 7,5±06,8%

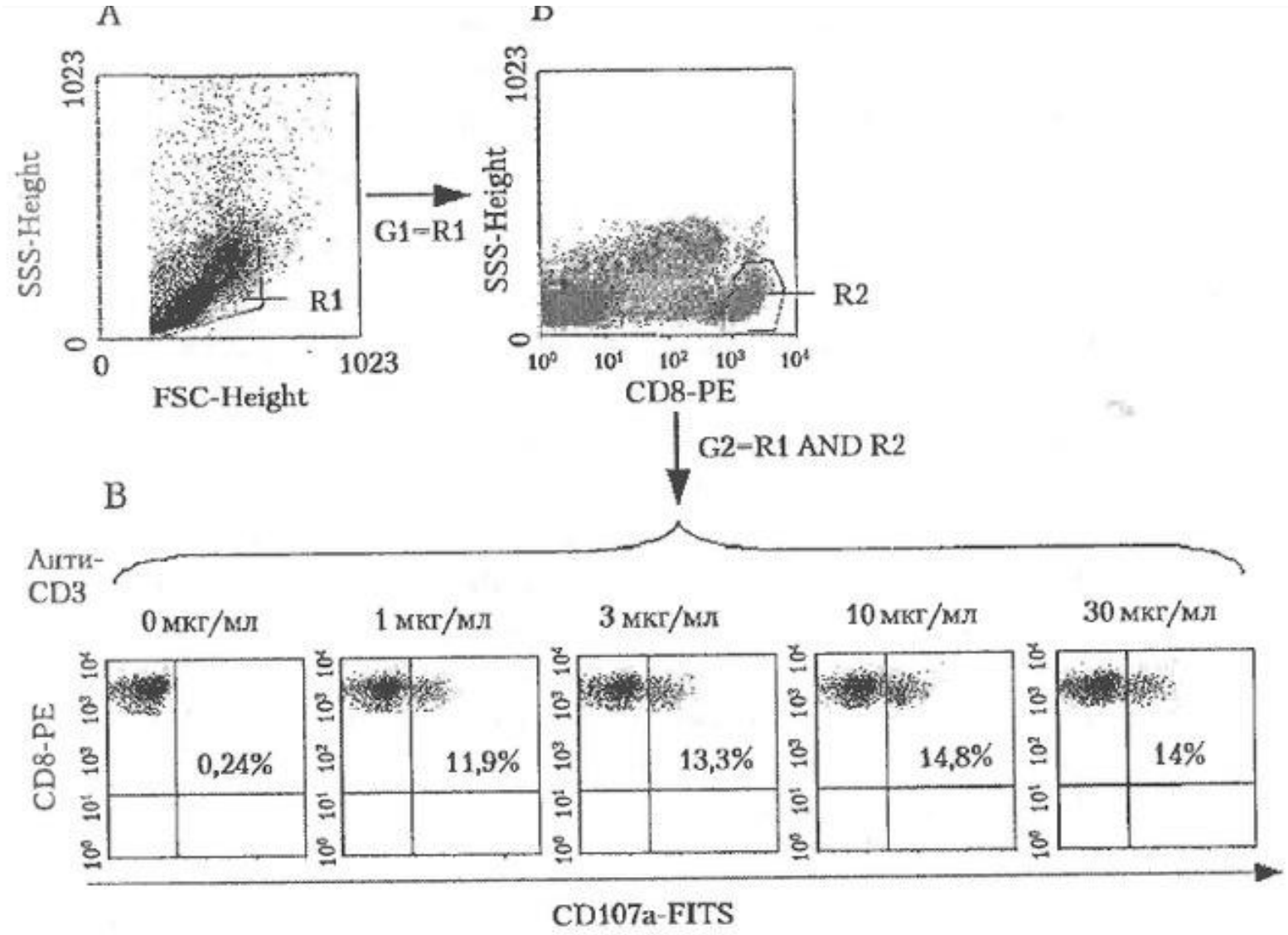


Рис. 5.12. Схема постановки реакции специфической дегрануляции цитотоксических Т-лимфоцитов

Клиническая значимость и показания к использованию

- Реакция дегрануляции CD8+ Т-лимфоцитов может применяться в комплексе оценки Т-клеточного иммунитета.
- Применяется при:

1. Мониторинг цитолитической функции Т-клеток при различных вирусных инфекциях и др, вызванных внутриклеточным патогеном.
2. Мониторинг специфического Т-клеточно иммунитета, у лиц, получающих вакцинные препараты
3. Мониторинг специфического Т-клеточно иммунитета, у лиц, получающих противоопухолевые терапевтические вакцины

Реакция торможения миграции лейкоцитов

- **Принцип метода:** Метод основывается на определение активности факторов, модифицирующих миграцию макрофагов, которые секретируются сенсибилизированными лимфоцитами при их рестимуляции *in vitro*. Как правило наблюдается торможение миграции, реже – ее усиление.

Нормативные значения индекса подавления миграции (ИПМ)

	ФГА	КонА	Антиген *St. aureus*	Антиген ВПГ 1	Антиген ВПГ 2
M±σ	69±8	69±8	54±9	41±9	24±3
Min; max	55; 79	55; 79	32; 65	28; 47	20; 27

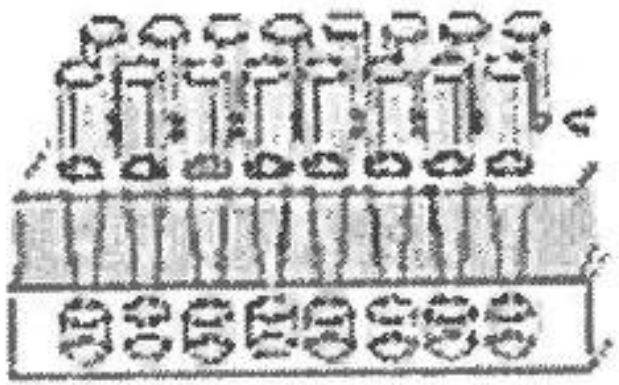
I этап: получение суспензии лейкоцитов
II этап: постановка реакции

ФГА (5 мкг/мл)
St.Ar (25 мкг/мл)
ВПГ; II (7,2 мкг/мл)
ПКС (100 мкл)

→ Заполнение лунок планшета → Сборка системы «Мигроскрин» → Наконечники с 5 мкл ЛЦ

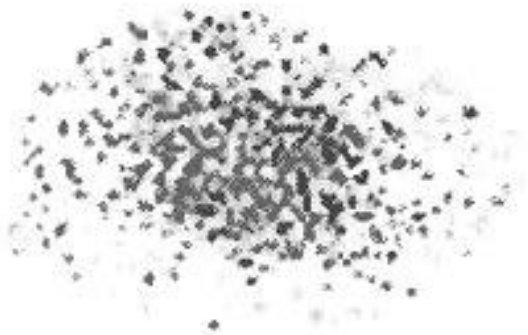
→ Снятие наконечников → Инкубация 37 °С; 18 4; 5% CO_2

1 час



III этап: оценка результатов

1) Измерение диаметра зон миграции



2) Вычисление индекса подавления миграции

$$ИПМ = \pm [(D_0^2/D_k^2) - 1] \times 100\%,$$

где: D_0^2 — средний диаметр зон миграции в опыте
D_k^2 — средний диаметр зон миграции в контроле
«+» — стимуляция миграции
«–» — подавление миграции