



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

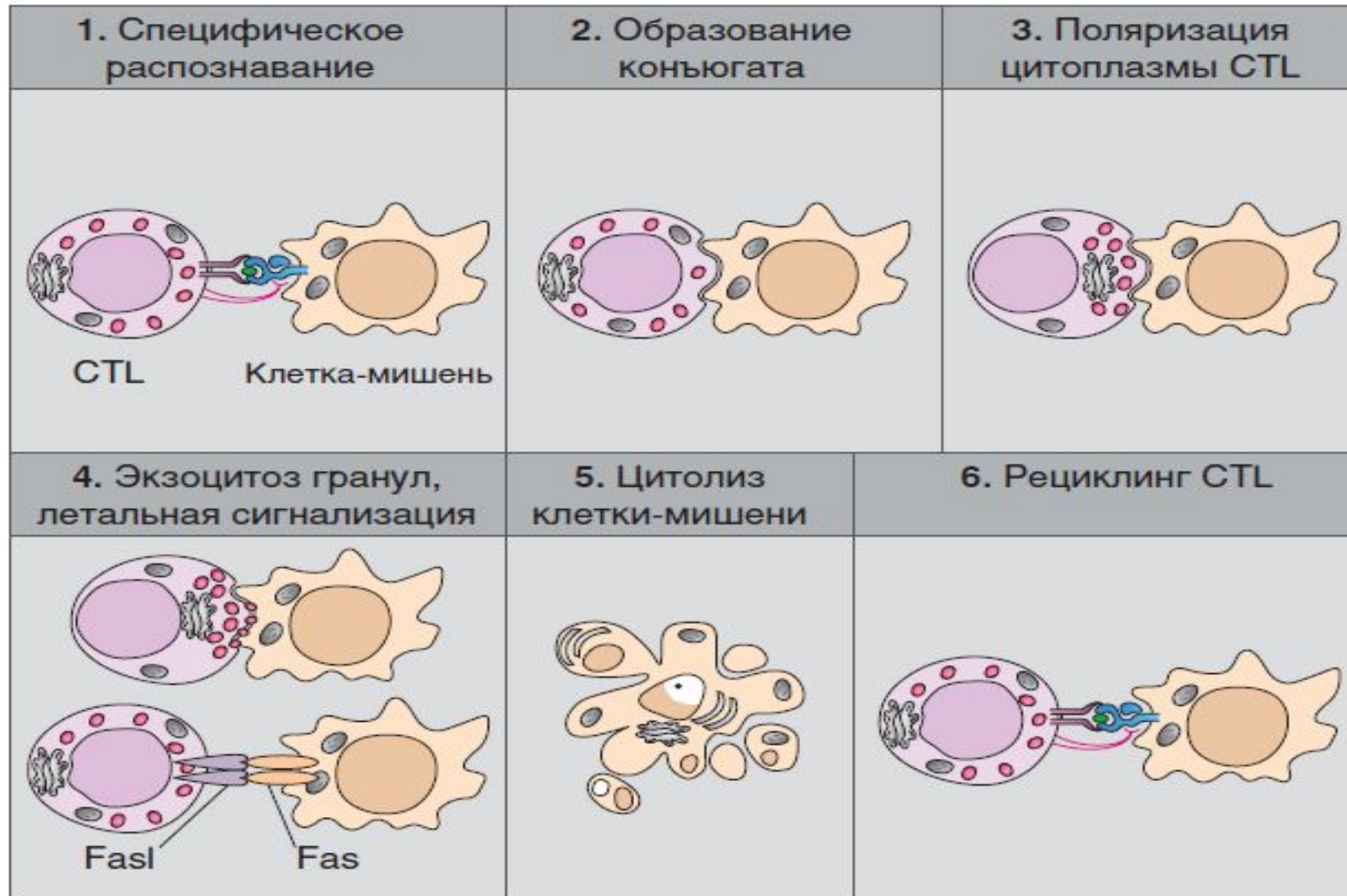


Рис.1. Этапы контактного цитолиза

Контактный цитолиз

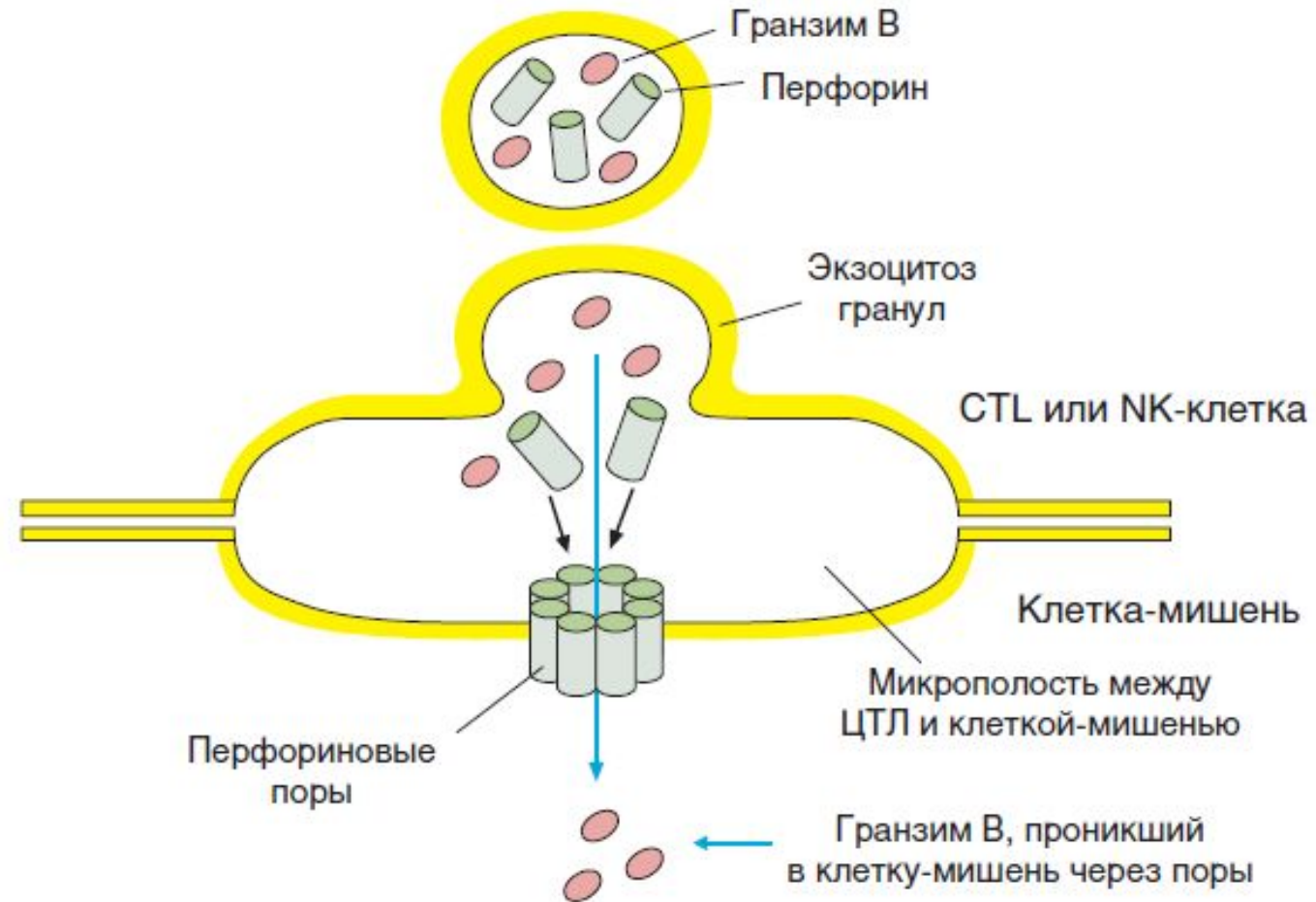


Рис.2. Перфорин-гранзимовый механизм. Микрополость

Контактный цитолиз

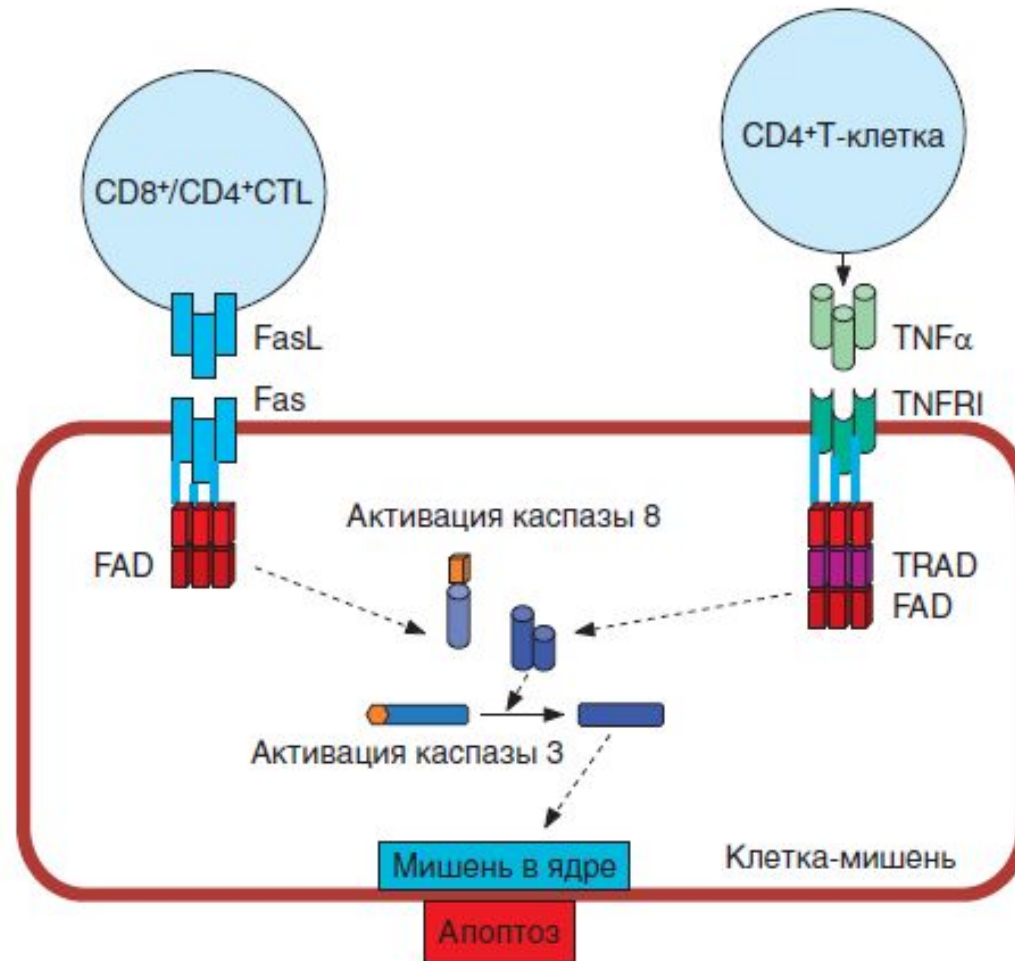


Рис.3. Индукция апоптоза через Fas-рецептор

АНТИТЕЛОЗАВИСИМАЯ КЛЕТОЧНАЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ

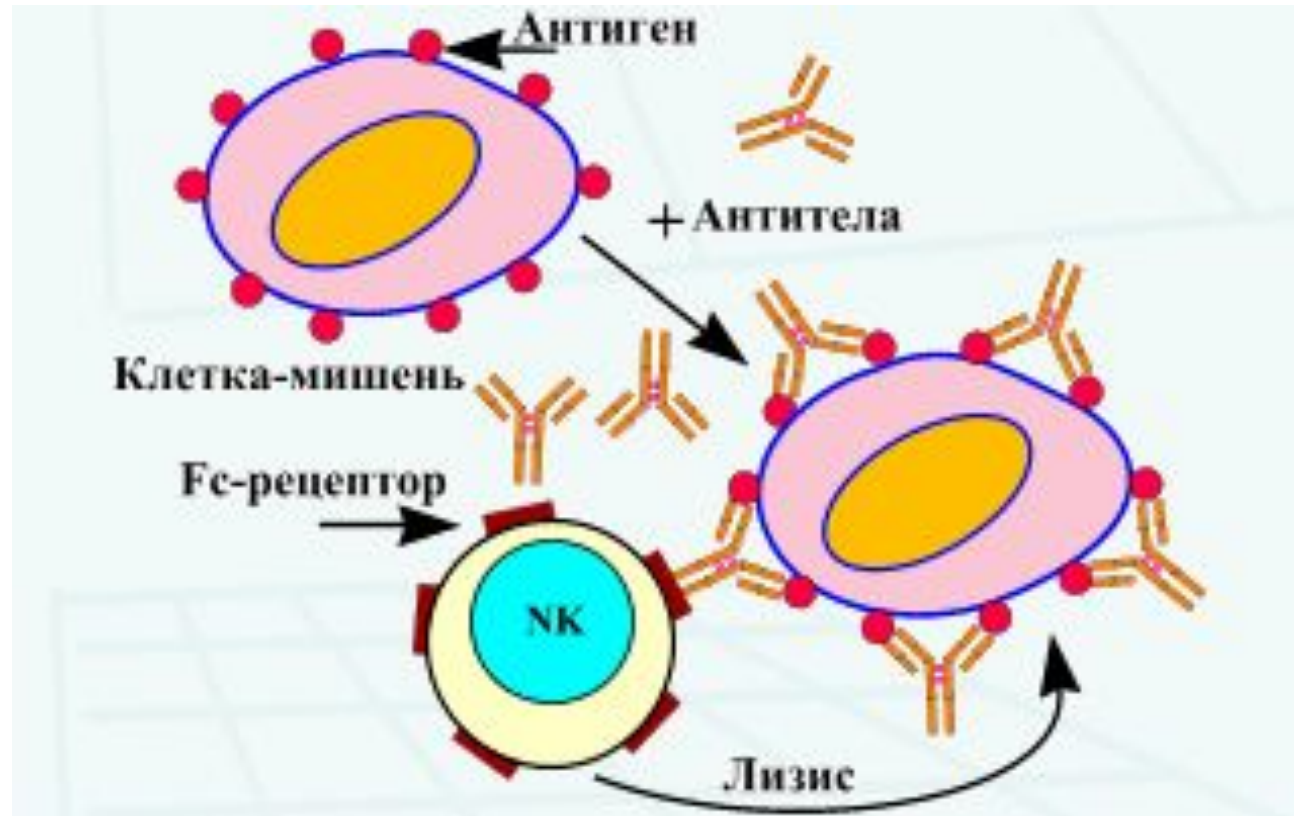


Рис.4. Схема АЗКЦ (активация NK-клетки через Fc γ RIII)

Цитотоксические клетки

НК-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 НК-клеток

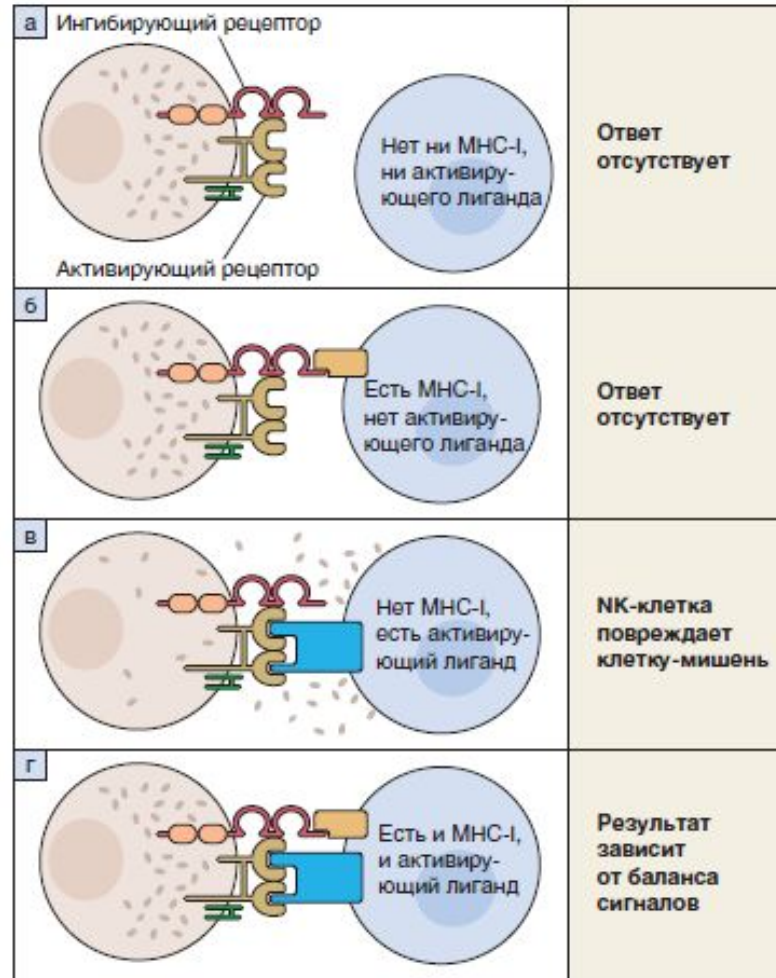


Рис.5. Варианты лиганд-рецепторного взаимодействия на НК-клетках

Лабораторные методы определения функции НК-клеток

Клеточная линия: клетки линии эритромиелоидного лейкоза человека *K562*

1. Оценка цитотоксичности по выходу ^{51}Cr
2. Оценка клеточного цитолиза по ослаблению ^3H -уридиновой метки
3. Метод оценки функциональной активности НК-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

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

Оценка клеточного цитолиза по ослаблению ^3H -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 (^3H -уридина).

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

Нормативы: $45,5 \pm 15,6$ при разбросе данных 5,6-86%

Метод оценки функциональной активности НК-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 флуоресцентного окрашивания пропидия йодидом.

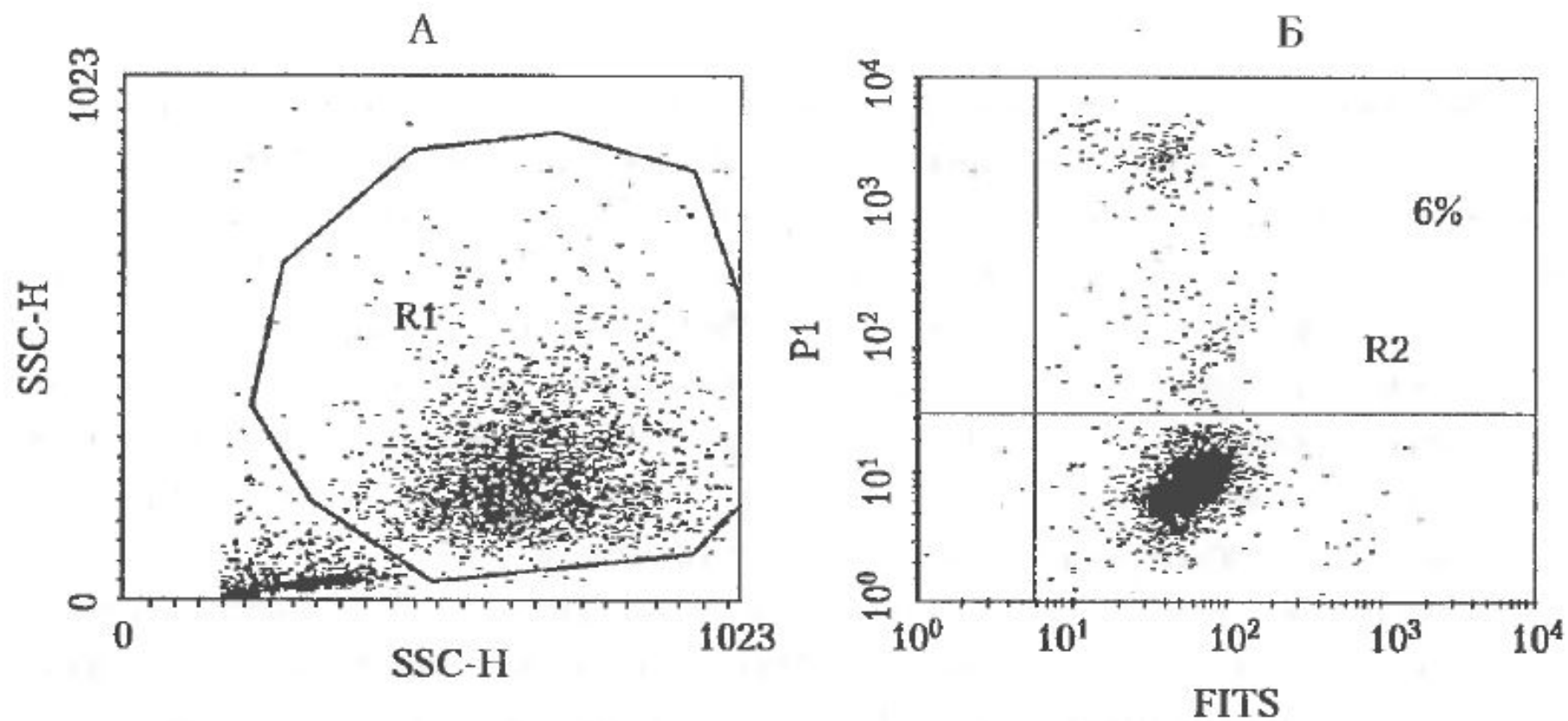


Рис. 5.11. Спонтанная гибель клеток-мишеней К-562.

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 K562 в контрольных пробах составляет $3,6 \pm 1, \%$

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

Активация CD8⁺ Т-лимфоцитов

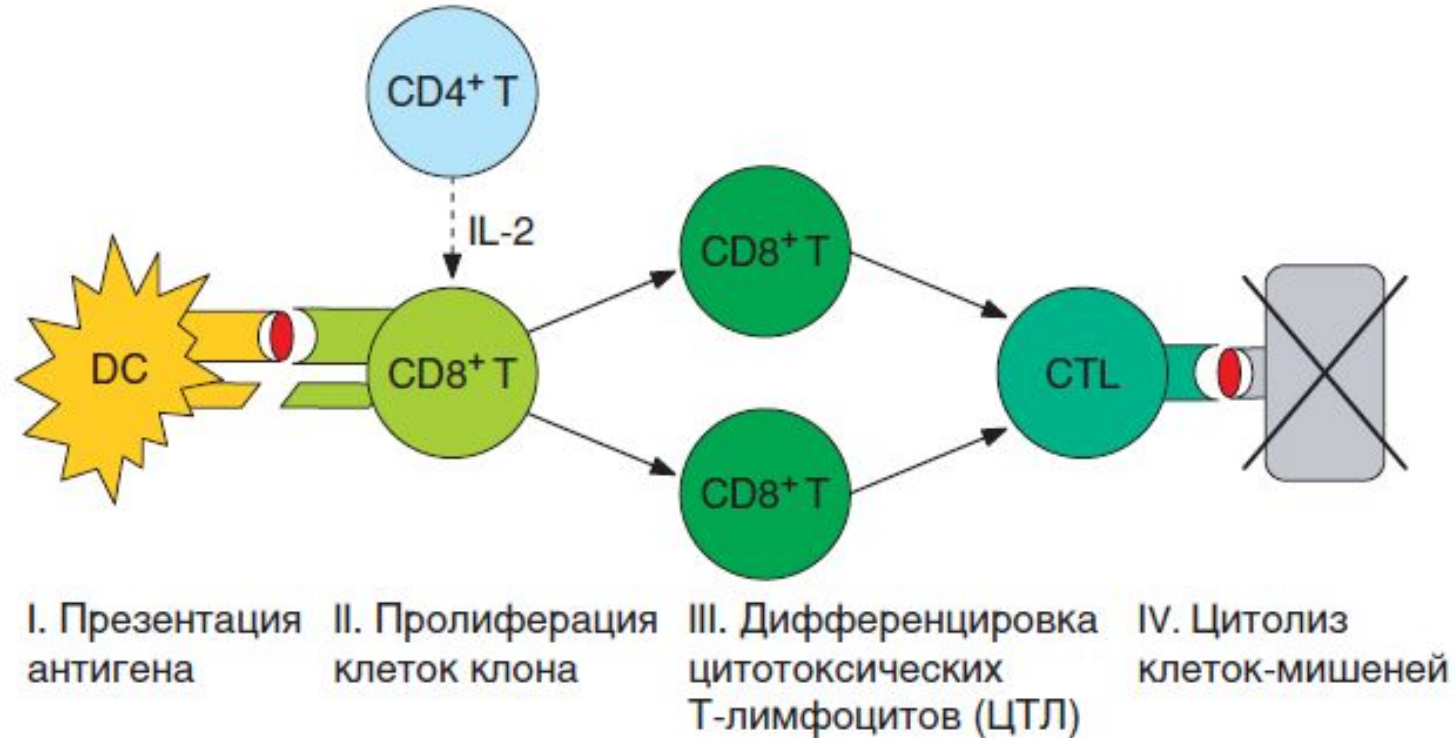


Рис.7. Схема развития цитотоксического Т-клеточного ответа

Активация CD8⁺ Т-лимфоцитов

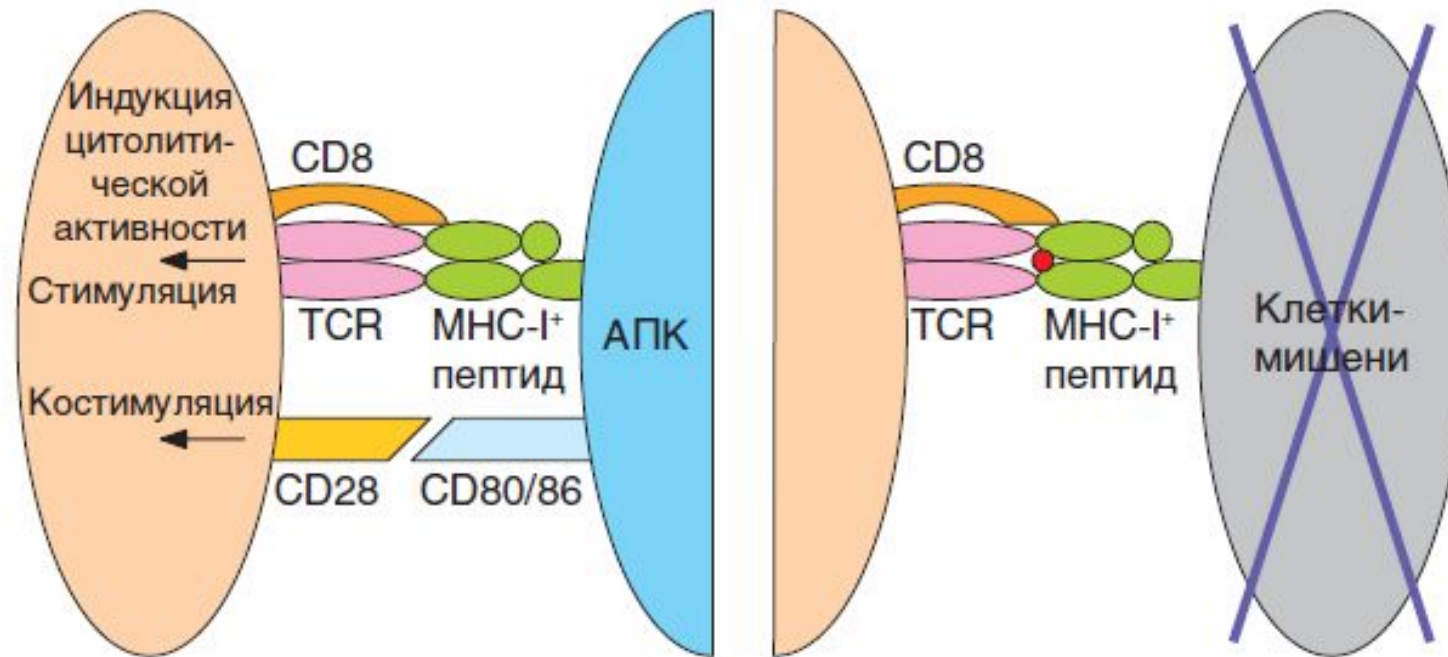


Рис.8. Схема активации CD8⁺ Т-лимфоцита и распознавание клетки-мишени

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 цитолитических $CD8^+$ Т-клеток с помощью реакции специфической дегрануляции.
5. Реакция торможения миграции лейкоцитов.

Определение реакции Т-клеток на антигены МНС в СКЛ

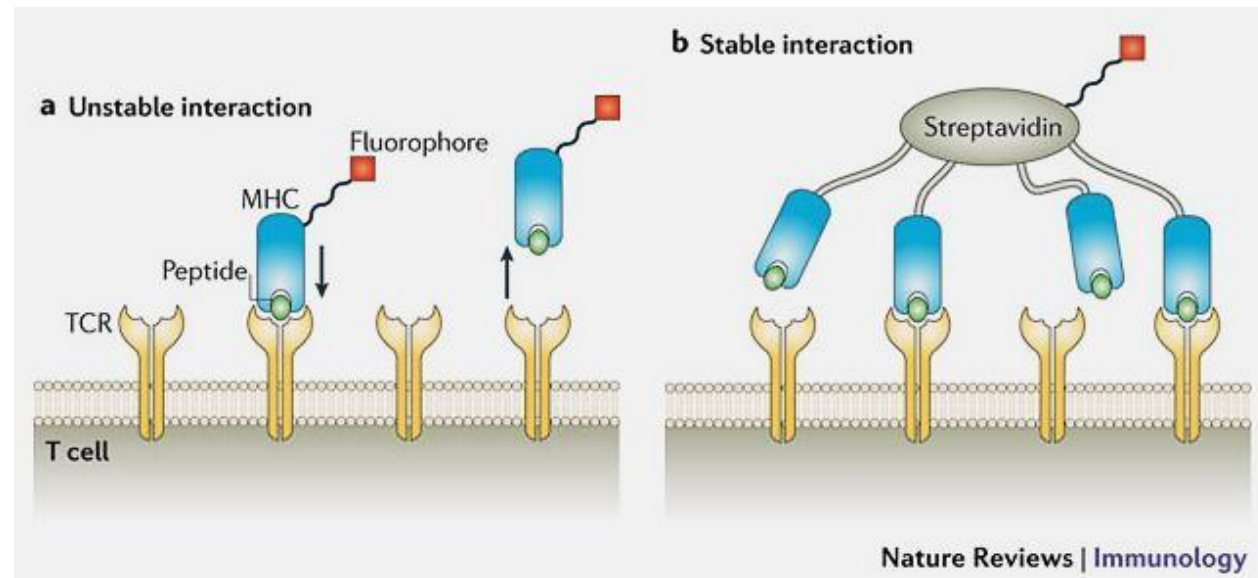
- **Цель теста:** оценка пролиферативной реакции отвечающих клеток на действие клеток-стимуляторов, точнее на аллогенные молекулы МНС, которые они несут.

$$ИС = \frac{\left(\frac{ИМП}{МИН}\right) О}{\left(\frac{ИМП}{МН}\right) К}$$

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 МНС-I, содержащей участок для биотинилирования
2. Создание комплекса модифицированной тяжелой цепи МНС-I с β_2 – микроглобулином и специфическим антигенным пептидом
3. Биотинилирование комплекса МНС-пептид
4. Синтез тетрамера

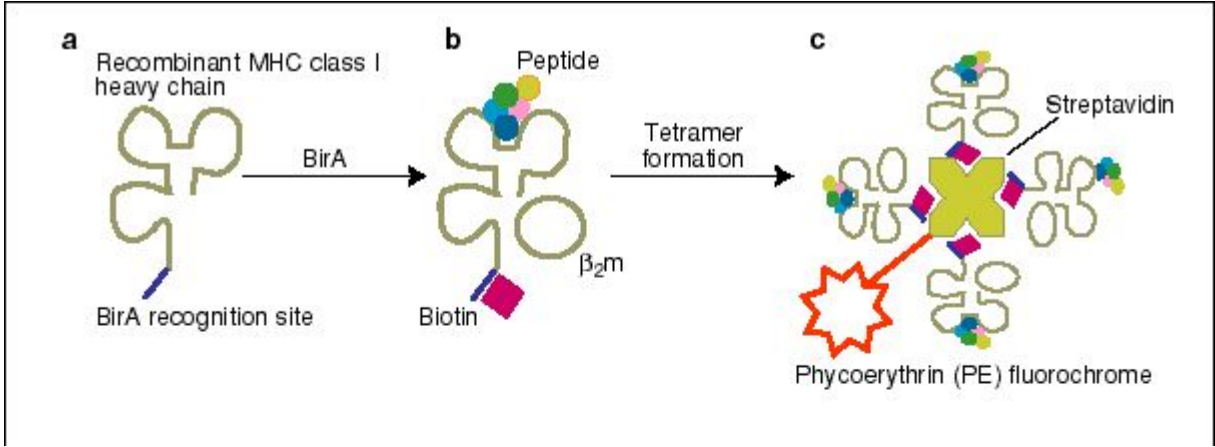
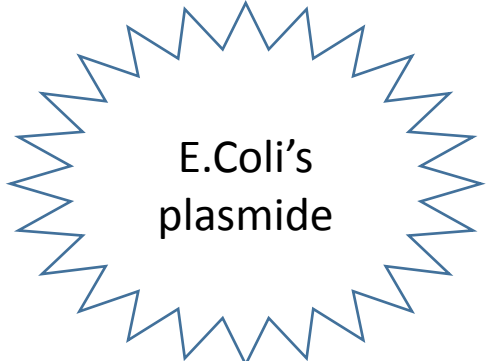
5' HLA-A2 gene 3'

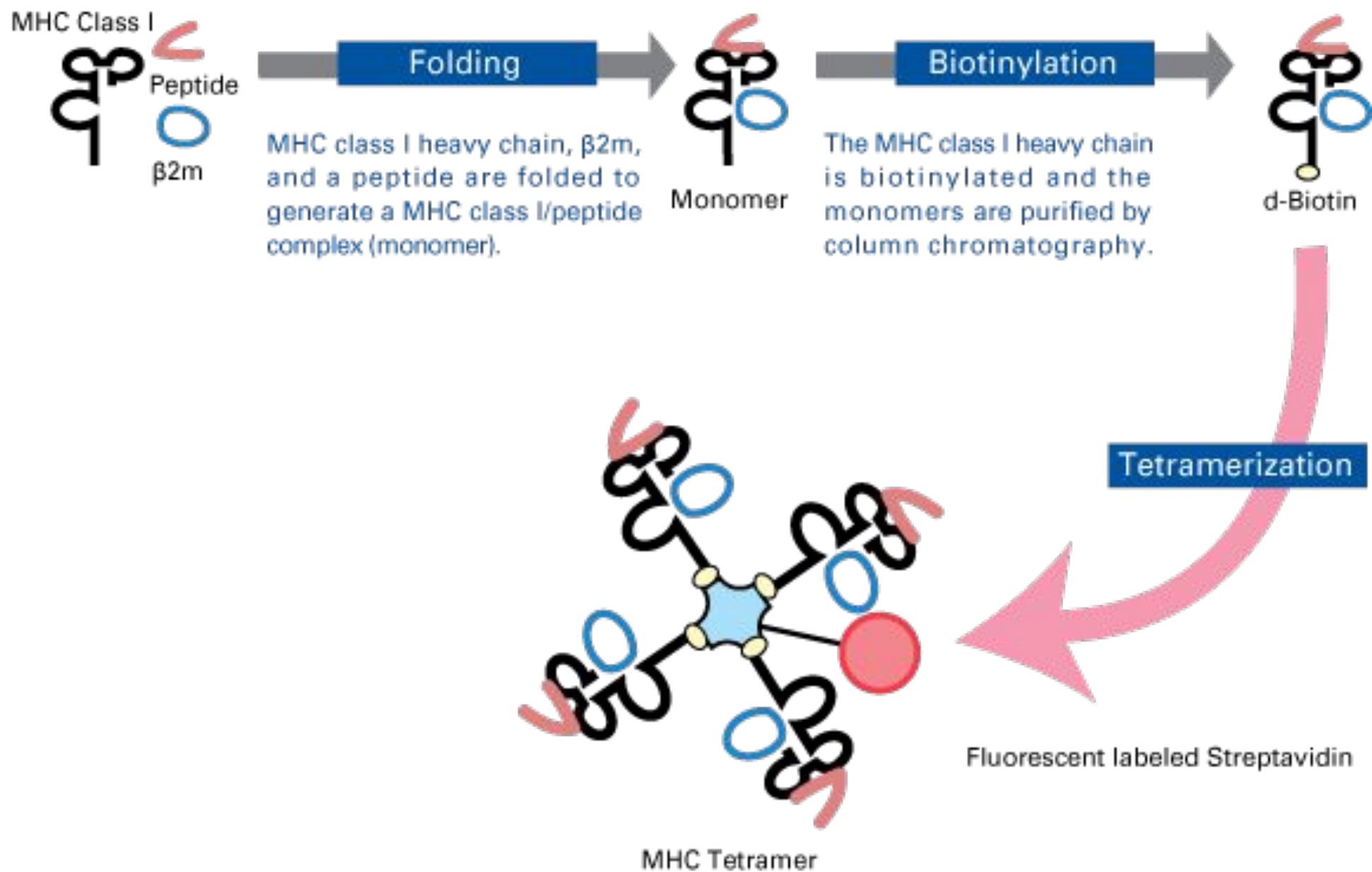
+

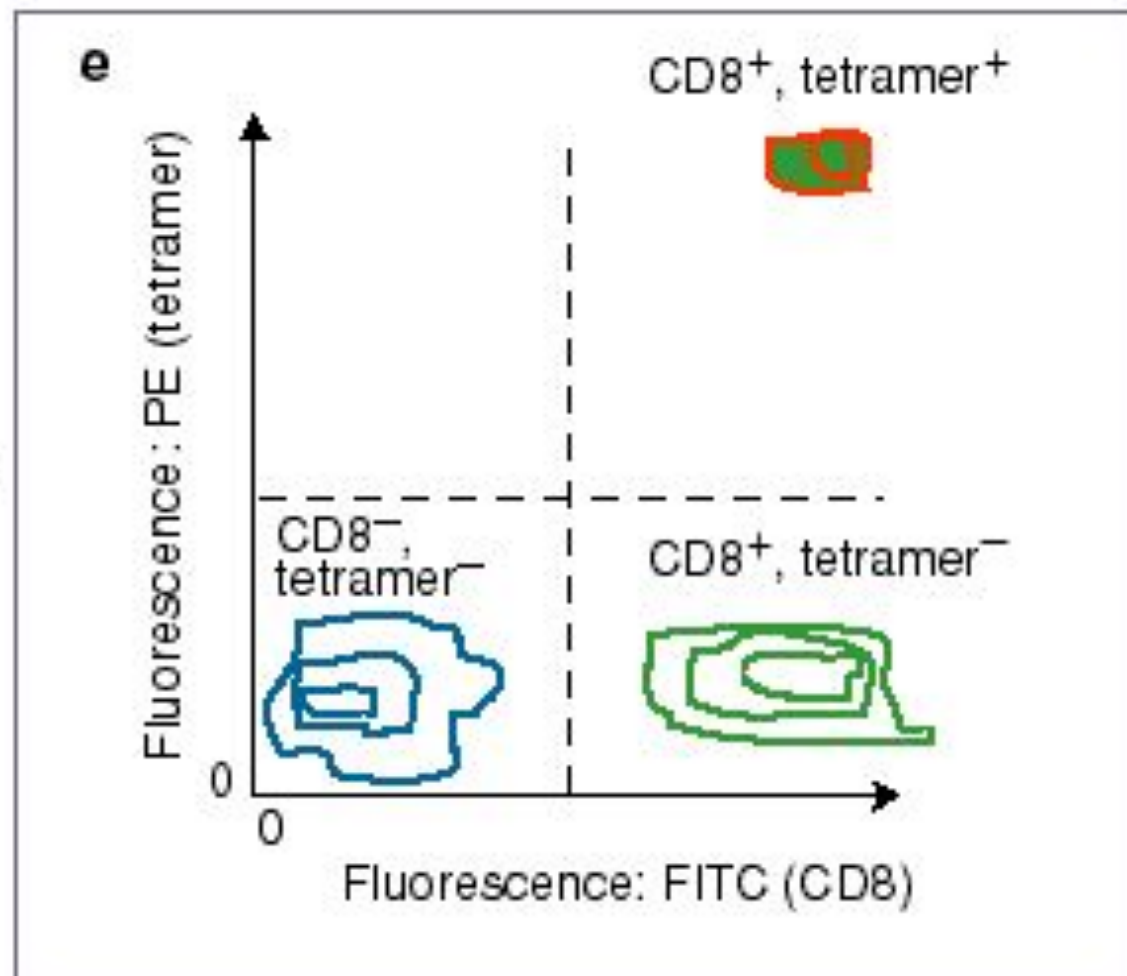
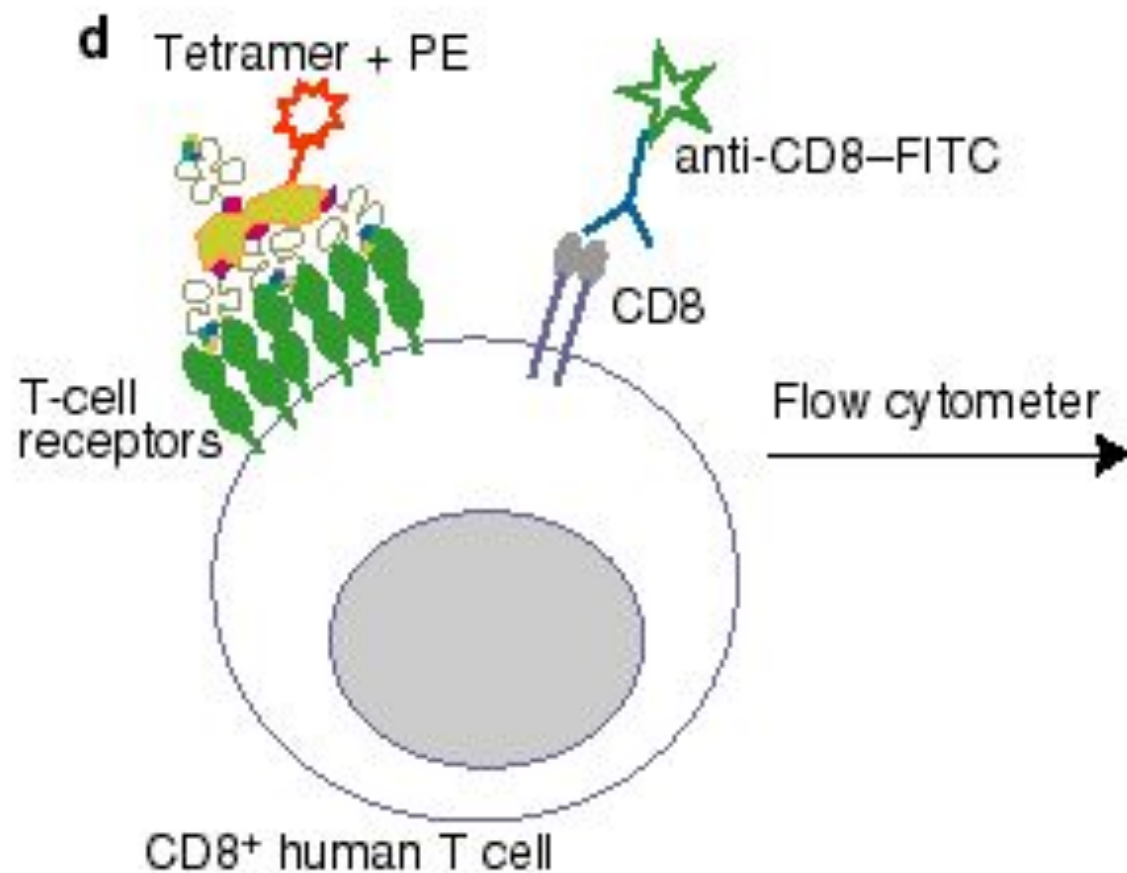
Sequence for biotinylation



5' HLA-A2 gene 3' Sequence for biotinylation







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, злокачественных 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 НК-клеток только наличием этапа индукции цитотоксических Т-лимфоцитов
- Реакция определения цитолиза, опосредованного цитотоксическими Т-лимфоцитами, представляет с собой совмещение методов СКЛ и оценки специфического 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 цитолитических CD8⁺ Т-клеток с помощью реакции специфической дегрануляции.

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

Нормативы

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

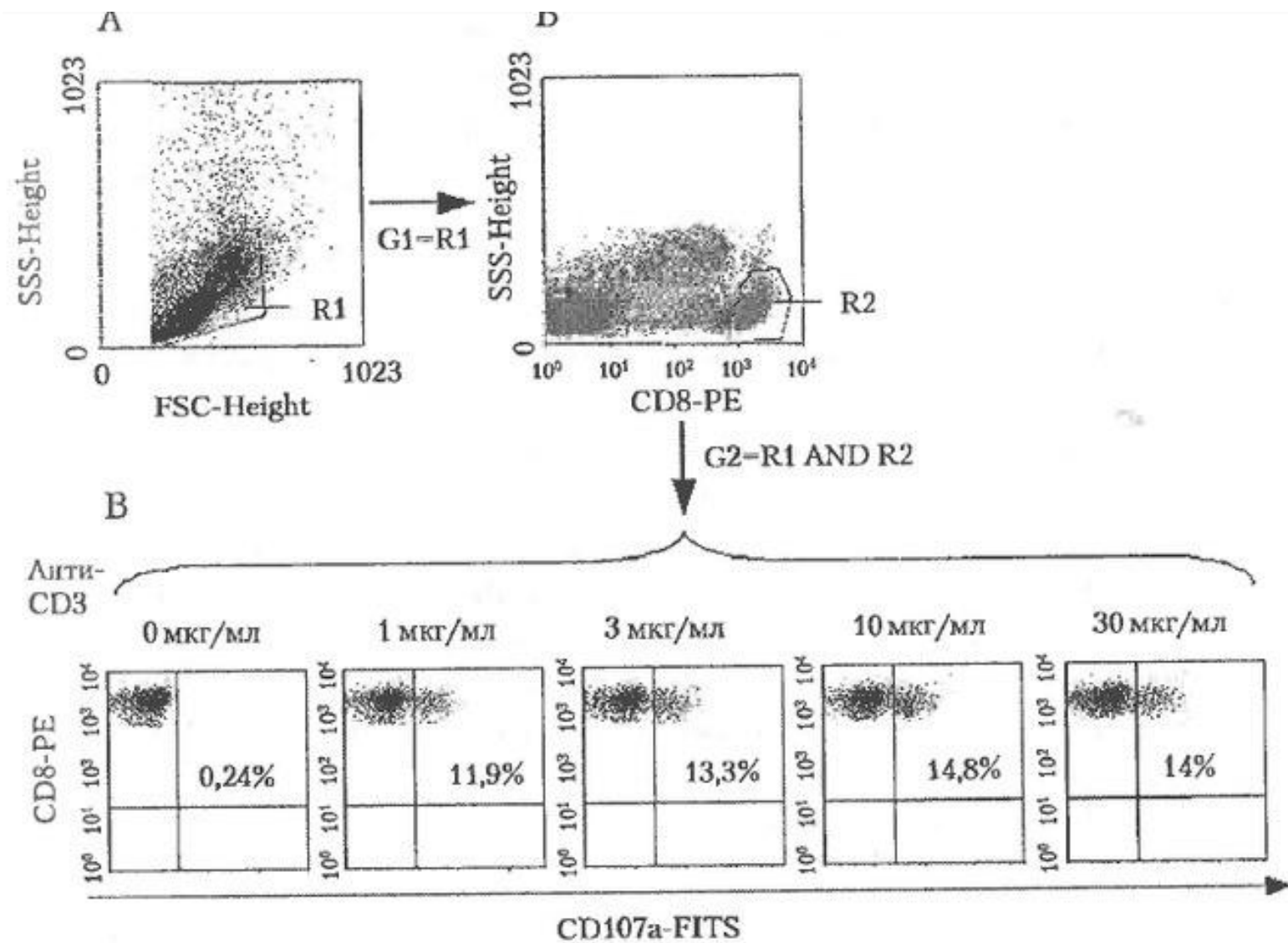


Рис. 5.12. Схема постановки реакции специфической дегрануляции цитотоксических Т-лимфоцитов

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

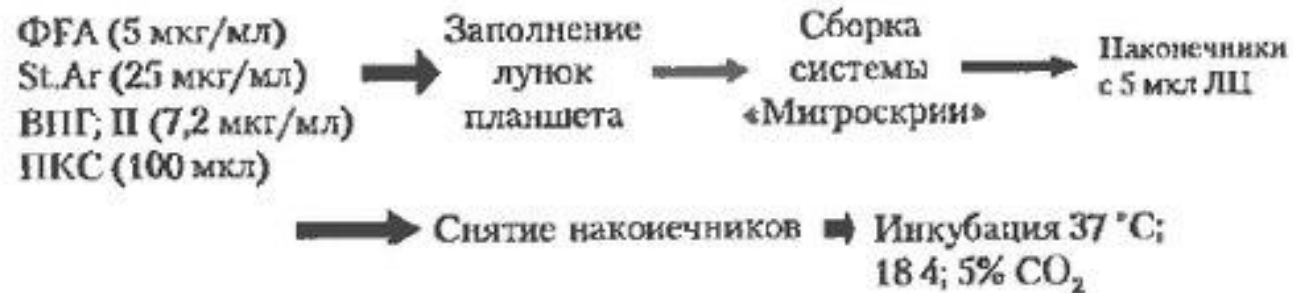
- **Принцип метода:** Метод основывается на определении активности факторов, модифицирующих миграцию макрофагов, которые секретируются сенсibilизированными лимфоцитами при их рестимуляции *in vitro*. Как правило наблюдается торможение миграции, реже – ее усиление.

Нормативные значения индекса подавления миграции (ИПМ)

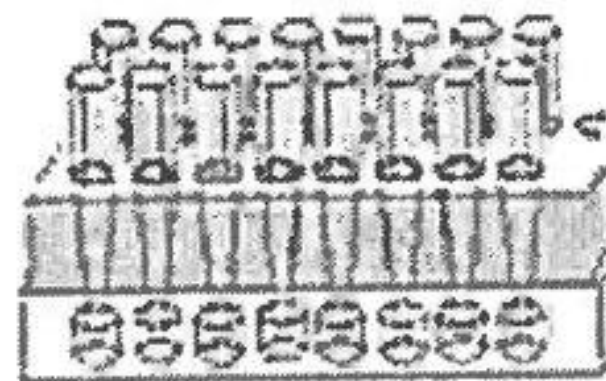
	ФГА	КонА	Антиген <i>St. aureus</i>	Антиген ВПГ 1	Антиген ВПГ 2
$M \pm \sigma$	69 \pm 8	69 \pm 8	54 \pm 9	41 \pm 9	24 \pm 3
Min; max	55; 79	55; 79	32; 65	28; 47	20; 27

I этап: получение суспензии лейкоцитов

II этап: постановка реакции

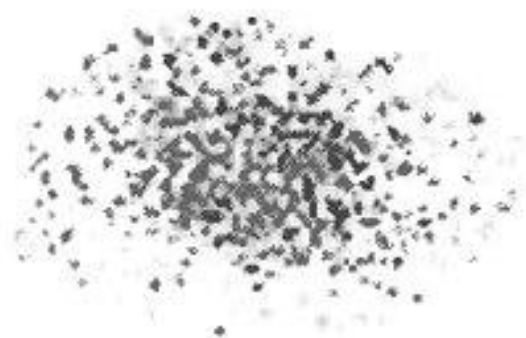


1 час



III этап: оценка результатов

1) Измерение диаметра зон миграции



2) Вычисление индекса подавления миграции

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

где: D_0^2 — средний диаметр зон миграции в опыте

D_k^2 — средний диаметр зон миграции в контроле

←→ — стимуляция миграции

←→ — подавление миграции