

Определение естественных регуляторных Т-клеток.

Подготовил: студент группы 3.4.01.

Дьяконов А. С.

- Как и следует из названия, регуляторные Т-лимфоциты (Treg) - клетки, выполняющие функции регуляторов, или супрессоров, по отношению к другим клетками иммунной системы. Treg контролируют иммунный ответ на чужеродные и аутоантигены и предотвращают развитие аутоиммунных процессов.
 - Известны по крайней мере два варианта регуляторных Т-клеток:
 - Естественные (природные- natural), спонтанно развивающиеся в тимусе клетки (Treg).
 - Адаптивные, формирующиеся на периферии (индуцированные) (Th3- и Tr1-клетки).
- Все эти клетки происходят из CD4+ Т-лимфоцитов.

Характеристика	Естественные регуляторные CD4 ⁺ CD25 ⁺ Т-клетки (Treg)	Tr1- и Th3-клетки
Место образования	Тимус	Периферические лимфоидные органы
Экспрессия Foxp3	Постоянная	Непостоянная
Другие экспрессируемые поверхностные молекулы	CD25 ^{high} , CD45RB ^{low} , CTLA-4, CD3/TCR, LAG-3 (CD223), глюкокортикоид-индуцированный рецептор ФНО, αEβ7-интегрин (CD103), хемокиновые рецепторы (CCR4, CCR5, CCR8)	Экспрессия CD25 непостоянна, CD45RO ^{high}
Зависимость эффекта от межклеточных взаимодействий	Зависит	Не зависит
Зависимость от ИЛ-2	ИЛ-2 необходим для развития супрессии	Супрессия не зависит от ИЛ-2
Активация специфическим антигеном	Не требуется	Требуется
Секретируемые цитокины	ИЛ-10, ТФР-β	ИЛ-10, ТФР-β

high — высокая экспрессия; low — низкая экспрессия.

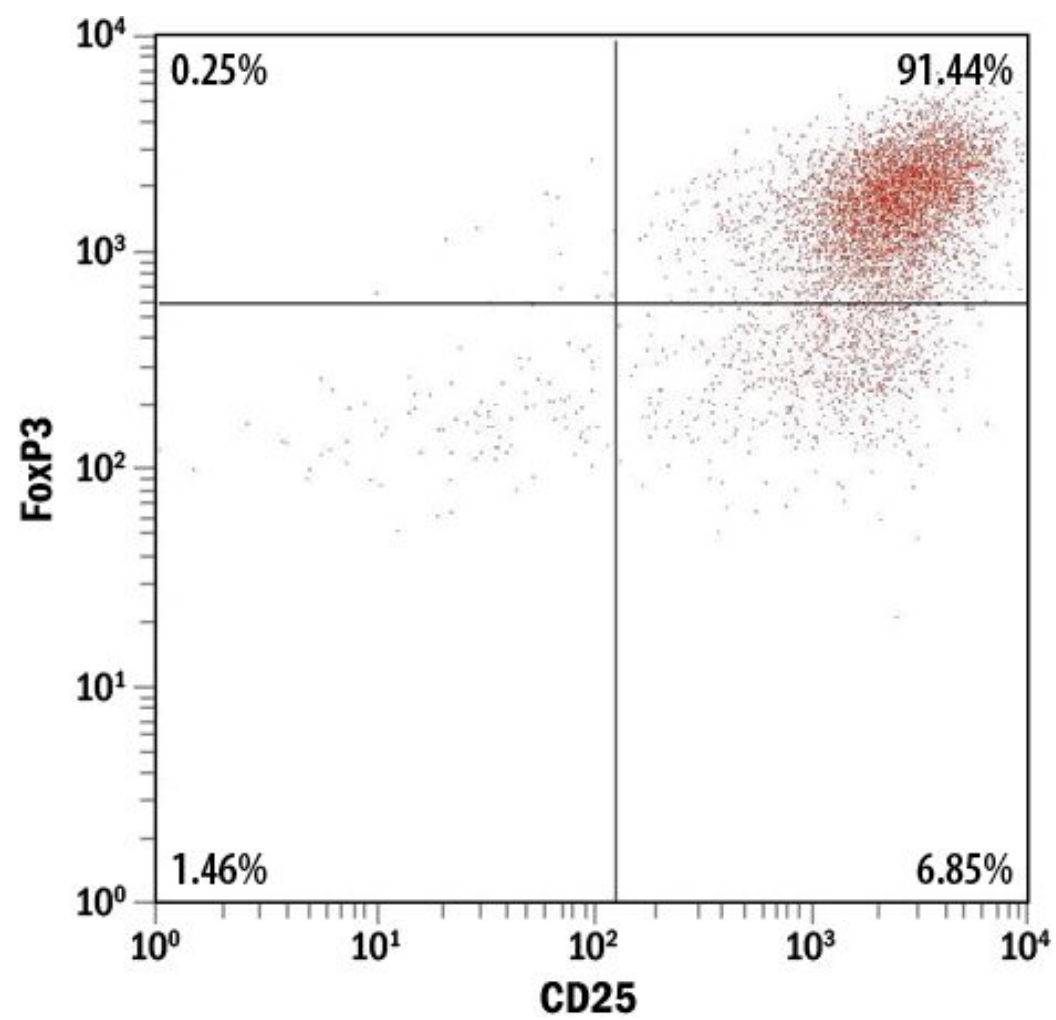
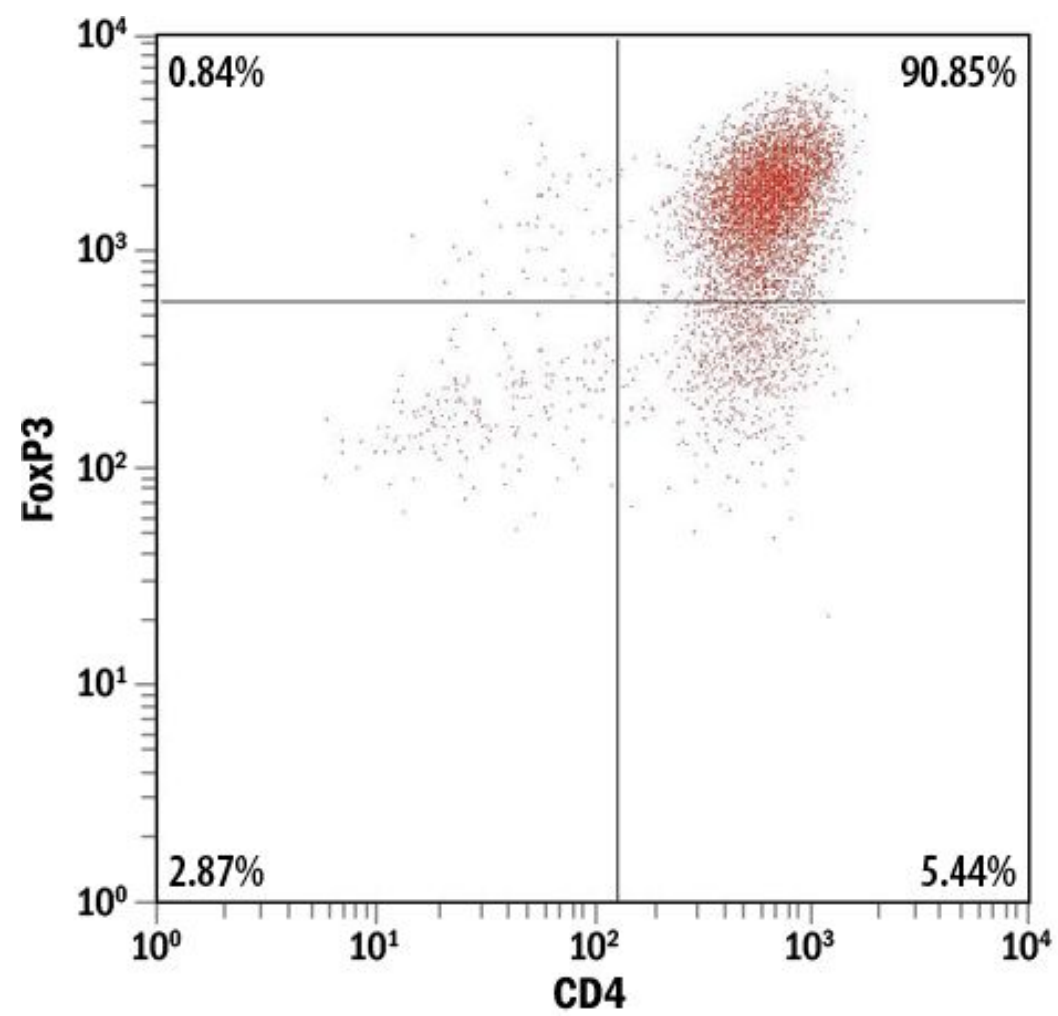
Существуют 3 группы подходов к определению и характеристике естественных Treg.

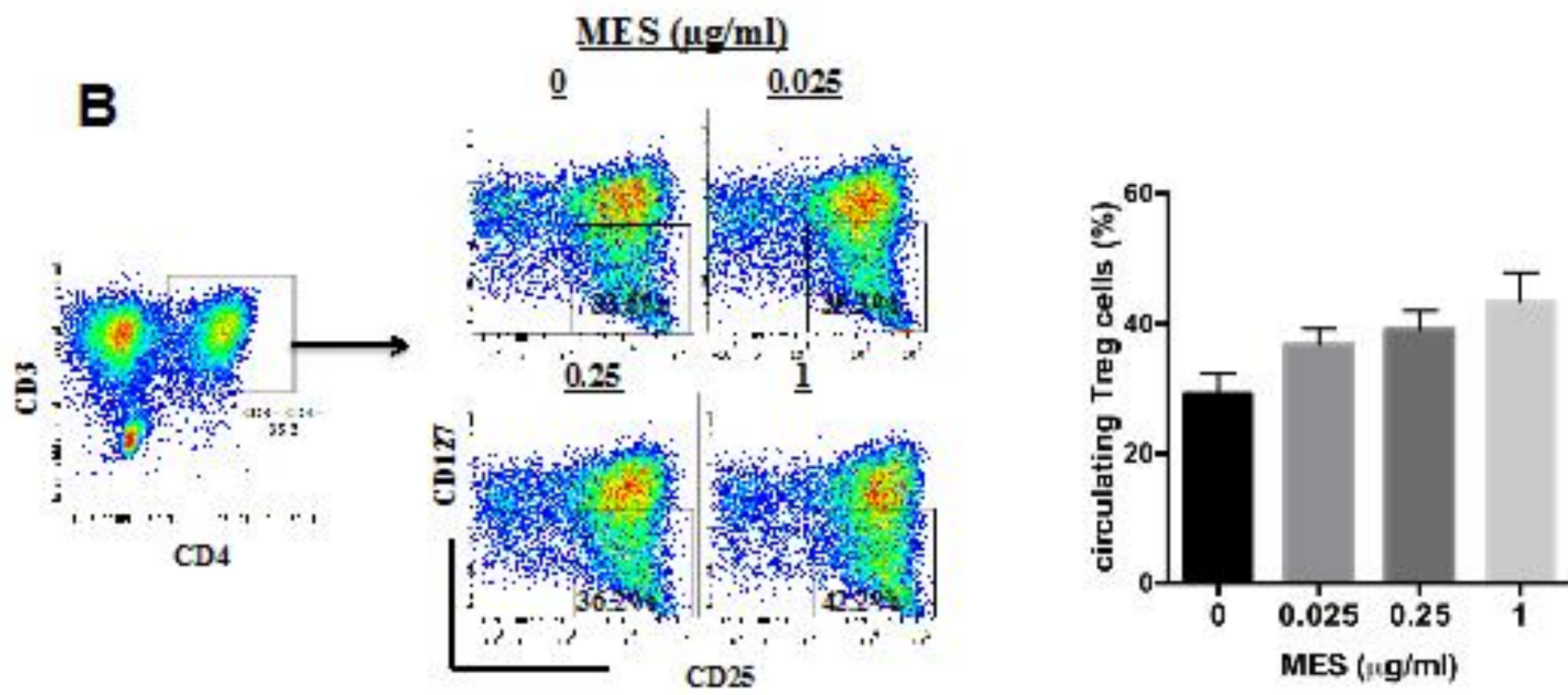
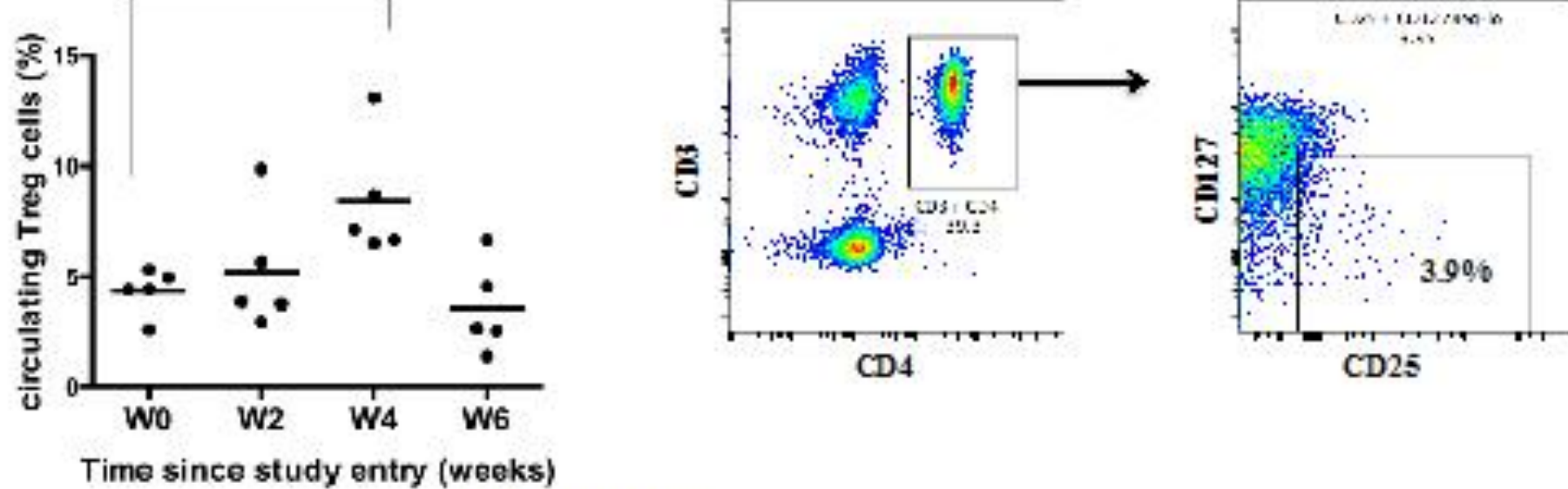
1. Цитофлуорометрическое выявление экспрессии мембранных антигенов (CD4, CD25, CTLA-4)
2. Оценка экспрессии гена FOXP3.
3. Оценка функциональной активности Treg.

Только комбинация всех трех подходов дает реальную информацию о состоянии субпопуляции Treg.

Цитофлуорометрическое определение Treg

- Метод основан на определении комбинации антигенов, характерных для Treg, методом проточной цитометрии с помощью моноклональных антител, меченых флуорохромами.
- Выявляют CD4, CD25, CTLA-4 (CD152)
- Причем учитываются только клетки с высоким уровнем экспрессии CD25
- Иногда в тест систему включается определение CD127 (не экспрессируется на Treg)





Нормативы.

- Содержание клеток с мембранным фенотипом CD4+ CD25+ в периферической крови составляет 2-3,5% от числа мононуклеаров, или 35- 100 клеток в 1 мкл.

Определение экспрессии гена FOXP3 с помощью Real Time ПЦР.

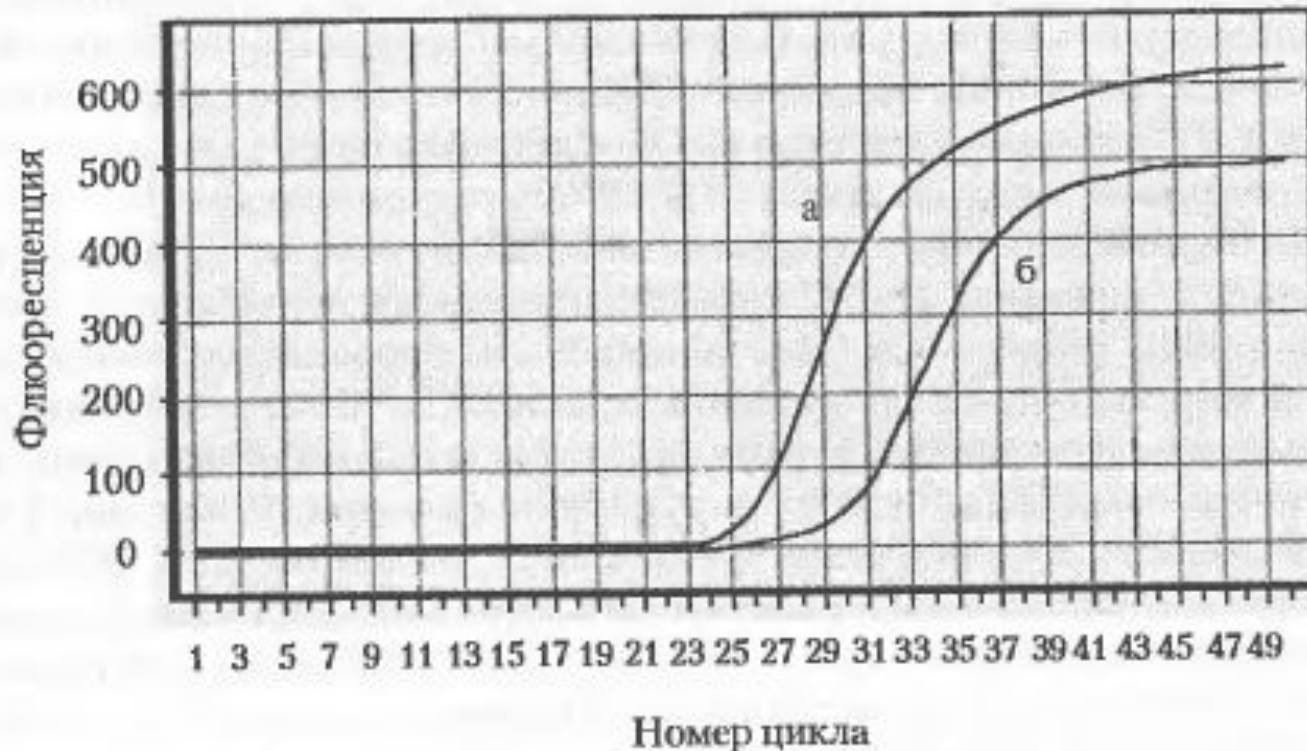
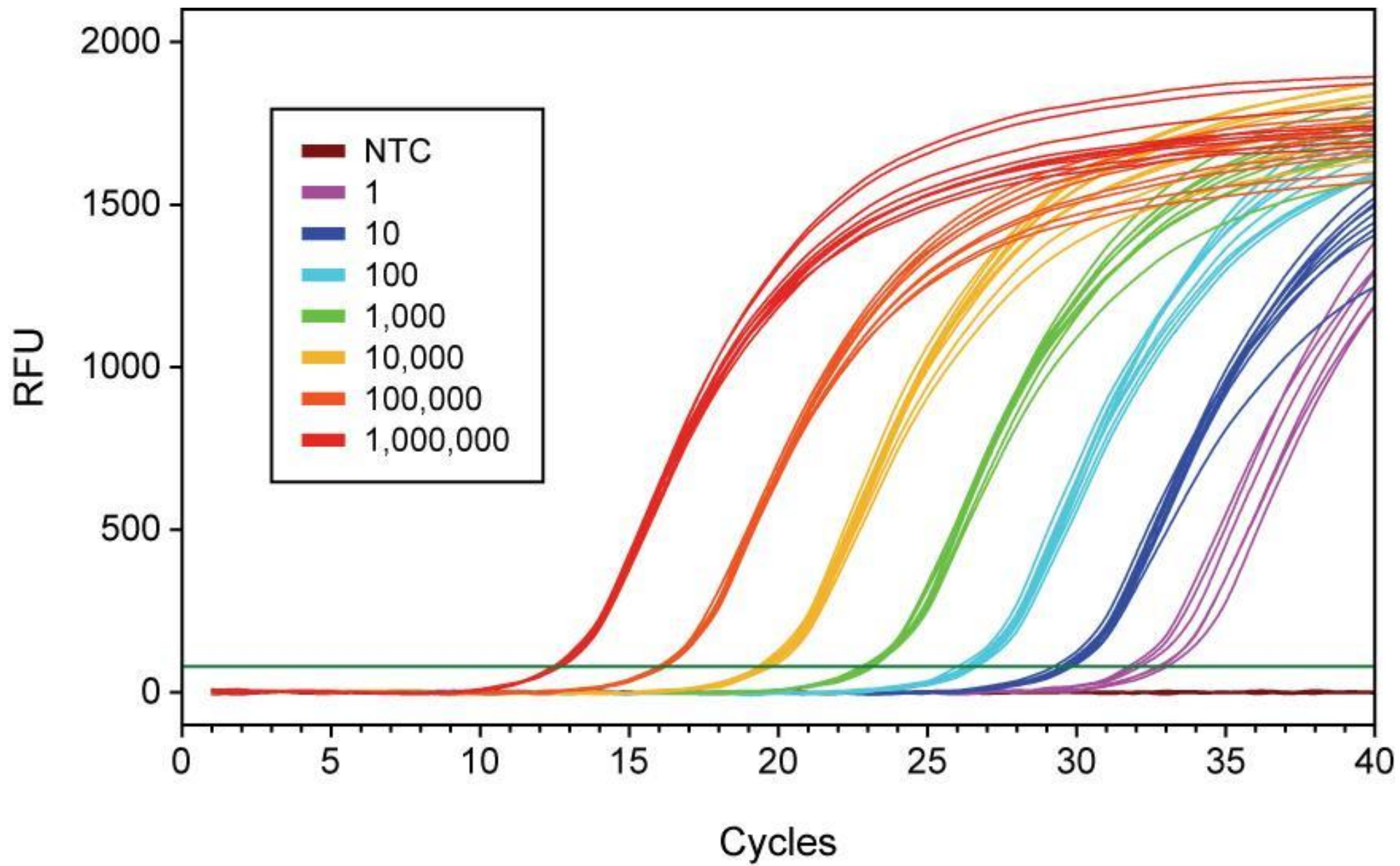


Рис. 5.10. Пример определение экспрессии мРНК FOXP3 в ПЦР в режиме «реального времени»: а — кривая накопления нормировочного гена HPRT1; б — кривая накопления FOXP3. Содержание мРНК FOXP3 в 90–100 раз ниже, чем мРНК HPRT1



$$[\text{FOXP3}]/[\text{HPRT1}] = E_{\text{HPRT1}}^{Cp1} / E_{\text{FOXP3}}^{Cp2},$$

где: E — эффективность амплификации; Cp1 — значение порогового цикла в образце для HPRT1; Cp2 — значение порогового цикла в образце для FOXP3.

Нормативы. Экспрессия FOXP3 относительно экспрессии гена HPRT составляет у практически здоровых людей 0,055 (0,041–0,073) [представлены значения Me (L-H), где Me — медиана, L, H — нижний и верхний квартили]. Распределение величин отличается от нормального.

Оценка функции естественных регуляторных Т-клеток

- Выделение Treg при помощи магнитных бус.
 - 1) Отрицательная селекция CD4+
 - 2) Положительная селекция CD25+
- Тест с подавлением пролиферативного ответа на стимуляцию клеток CD4+CD25-

Методика постановки теста

- Активация клеток CD4+CD25- моноклональными антителами к CD3 (фиксир. на пластинке)
- Культивирование 12ч при +4
- + смесь растворимых антител к CD28 и IL-2(рекомбинантный)
- + сингенные мононуклеары (АГ предст. Клетки)
- Культивирование 60 часов при 37
- Добавление 40кБк Тиминина
- Культивирование 12 часов
- Сбор данных

Методы оценки апоптоза.

Апоптоз- один из двух путей клеточной гибели. Он представляет собой гибель клетки, обусловленную нарушением условий существования или прямым повреждающим действием внешних факторов, является активной формой гибели клетки, обусловлена включением через сигнальные пути механизмов, приводящих к деградации генетического материала и истощению энергетических ресурсов.

Различают: внутренний (митохондриальный) и рецепторный.

Роль апоптоза в иммунной системе состоит в контроле численности клеток, клонального состава популяций лимфоцитов, а так же в повышении сродства В- лимфоцитов, а следовательно, и антител к антигену и в ограничении продолжительности иммунного ответа.

- Формирования разрывов ДНК
- Деградация и потеря клеткой части ДНК
- Асимметрия мембраны с экспрессией на поверхности необычных молекул
- Изменения морфологии клетки

Методы оценки:

- Морфологический
- Электрофоретический метод
- TUNEL- метод
- По связыванию аннексина V и окрашиваемости пропидия йодидом
- Регистрация потери ДНК в тесте с применением пропидия йодида

Метод оценки клеточной гибели по связыванию аннексина и окрашиваемости пропидия йодидом

- Принцип: определение экспрессии фосфатидилсерина, появляющегося на поверхности клетки вследствие нарушения асимметрии мембраны в процессе апоптоза, с помощью аннексина V (обладающего сродством к фосфатидилсерину), меченного флуорохромом.
- Параллельно определяют некроз клеток, регистрируя появление проницаемости для пропидия йодида, связывающегося с ДНК клетки.
- Нередко комбинируют с определением субпопуляционной принадлежности.

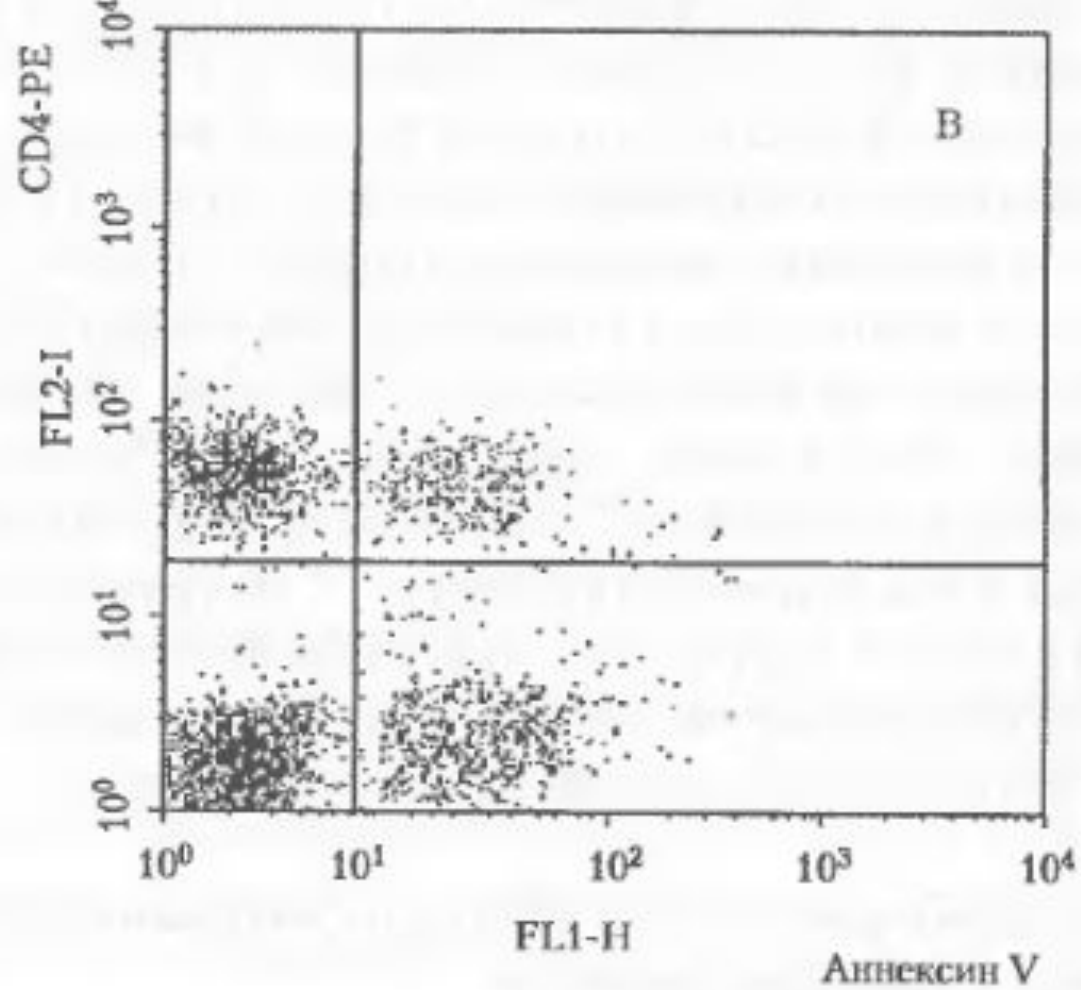


Рис. 5.15. Определение апоптоза лимфоцитов периферической крови по связыванию аннексина V, меченного ФИТЦ (по оси абсцисс), и окрашиваемости пропидия йодидом (по оси ординат) [2].

Апоптотические клетки локализуются в правом нижнем квадранте (8,3%), некротические — в левом верхнем квадранте (34,3%). В правом верхнем квадранте предположительно локализуются клетки со смешанной формой гибели — апоптозом с присоединившемся некрозом (6,6%)

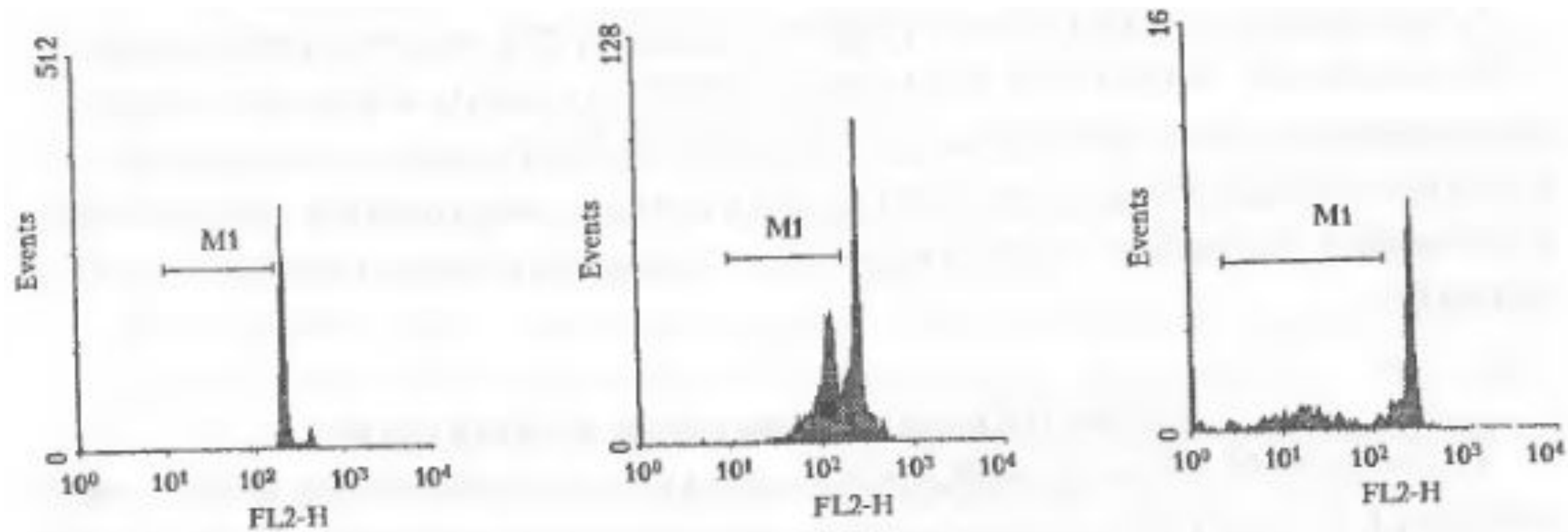


Рис. 5.16. Выявление апоптоза путем оценки потери ДНК, регистрируемой по индукции гиподиплоидной фракции клеток. Окрашивание пропидия йодидом. Гиподиплоидная фракция отмечена курсором M1. Апоптоз тимоцитов — спонтанный (А — 2,1%), индуцированный в кокультуре с эпителиальными клетками тимуса (Б — 49,8%) и в культуре с супернатантом эпителиальных клеток тимуса (В — 34,7%) [188]

Спасибо за внимание.