

# Методы оценки функционирования системы ЦИТОКИНОВ

Вахрушев Н.С.  
3.4.01 МБФ

Изучение системы цитокинов проводится на различных уровнях в зависимости от конкретных задач и включает следующие основные подходы:

- Генетический анализ на предмет отсутствия мутаций в генах цитокинов, их рецепторов и белков внутриклеточных сигнальных систем запуска синтеза и передачи сигнала;
- Анализ полиморфизма генов цитокинов;
- Изучение экспрессии генов цитокинов;
- Изучение уровня продукции цитокинов клетками в культуре;
- Определение концентраций цитокинов в биологических жидкостях;
- Изучение синтеза цитокинов на уровне отдельных клеток и тканей.

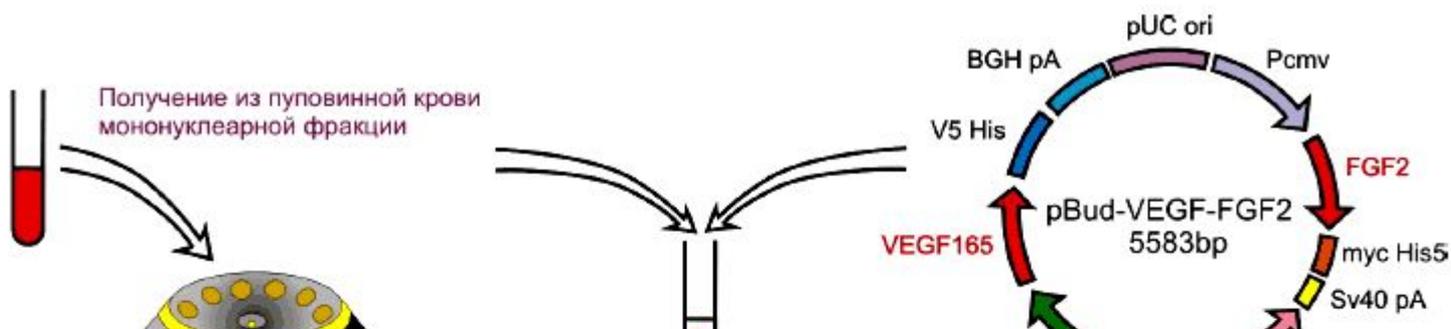
# Биологические методы

Для биологического тестирования многих цитокинов получены длительно культивируемые трансформированные линии клеток, отвечающие на действие цитокинов.

Таблица 1. Культуры клеток для оценки биологической активности цитокинов

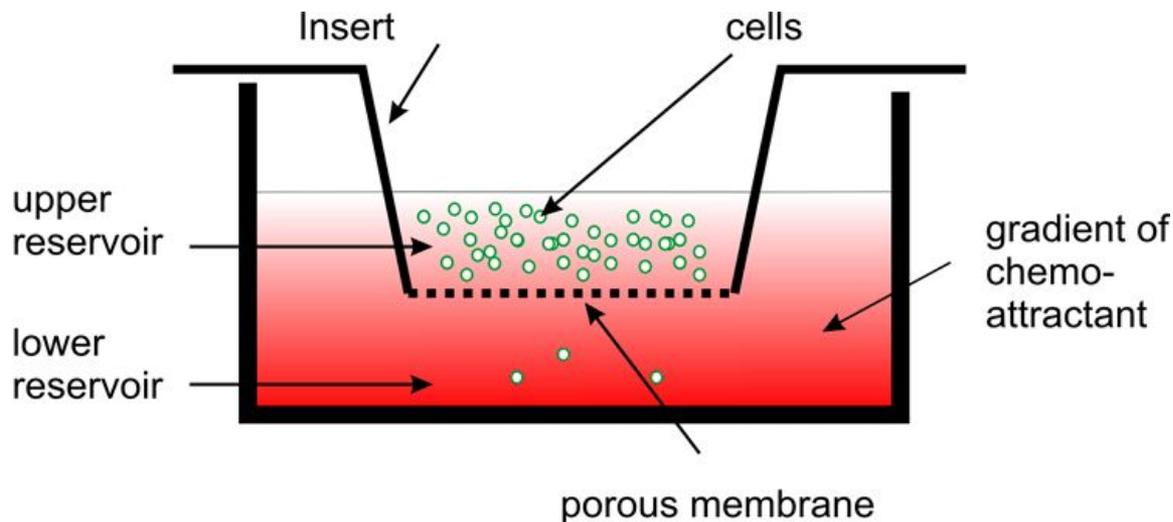
Цитокины	Клеточные линии	Тканевое происхождение	Способ оценки активности	Другие цитокины, активные в данном тесте
IL-1	Первичные культуры	Тимоциты мыши	Пролиферация	IL-2, IL-6; IL-4, TNF – видоспецифично
	D10S	Лимфома	Пролиферация	IL-2
IL-2	CTLL-2	Лимфома	Пролиферация	IL-15, TGFβ
IL-3	TF-1	Костный мозг	Пролиферация	IL-4, 5, 9, 13, GM-CSF
IL-4	CTLL-2	Лимфома	Пролиферация, видоспецифично	IL-15, TGFβ
IL-6	B9	Миелома	Пролиферация	IL-11, IL-13
IL-7	2E8	Лимфома	Пролиферация	–
IL-8	Первичные культуры	Нейтрофилы	Миграция	Некоторые CXC хемокины
IL-12	KIT-225	T-лимфома	Пролиферация	IL-2, 4, 7, 15, 21
IL-18	KG-1	Миелолейкемия	Синтез IFN-γ	IL-12, IL-21
TNF	L929	Фибробласты	Цитотоксичность	Лимфотоксин
GM-CSF	TF-1	Эритролейкемия	Пролиферация	IL-3, 4, 5, 9, 13, ЭПО
IFN-α	Первичные культуры	Фибробласты пуповины человека	Антивирусная активность	Другие типы IFN, видоспецифично
	A-549, 2D9, Daudi	Карцинома легких, глиобластома, лимфома	Антивирусная активность, продукция белка MxA	
IFN-γ	A-549	Карцинома легких	Антивирусная активность	Другие типы IFN, видоспецифично
	WiDr	Карцинома толстой кишки	Подавление пролиферации	–

- Большинство клеточных линий не обладают строгой специфичностью в отношении одного цитокина, а могут отвечать на действие других медиаторов, что снижает специфичность определения биологической активности цитокинов;
- Производятся клеточные линии, трансфецированные генами рецепторов определённого цитокина, способные специфически отвечать на действие низких концентраций нужного цитокина;
- Клеточные линии, используемые для оценки уровня цитокинов в основном лейкемического происхождения;
- Некоторые цитокины человека невидоспецифичны →



# Оценка биологической активности in vitro

1. Оценка пролиферативной активности клеток
2. Оценка цитотоксичности
3. Определение экспрессии мембранных рецепторов, синтеза других цитокинов и т.п.
4. Оценка влияния на функциональную активность клеток (хемотаксис)



## 5) Оценка противoinфекционного действия, как в случае интерферона

- Тест-система для определения уровня активности ИФН- $\alpha$  в сыворотке крови человека, включает диплоидные клетки, вируссодержащую жидкость и стандартный интерферон- $\alpha$  (ИФН- $\alpha$ ) человека;
- В качестве диплоидных клеток тест-система включает клетки охарактеризованной линии диплоидных клеток - фибробластов человека М-20;
- в качестве вируса - адаптированный к клеткам линии М-20 вирус везикулярного стоматита (ВВС);
- витальный краситель на основе двух флюорохромов - трипафлавина и родамина С;
- Сравнивают яркость свечения монослоя клеток в лунках с коммерческим препаратом человеческого ИФН- $\alpha$  с яркостью свечения монослоя клеток в лунках с исследуемым образцом сыворотки крови человека;

## Преимущества

Высокая чувствительность

Более правильны с биологической точки зрения: измеряет только биологически активные формы цитокинов → наиболее адекватно отражает работу цитокинов *in vivo*

## Недостатки

Трудоемки и сложны в исполнении

Большие затраты времени

Особые стерильные условия и оборудование

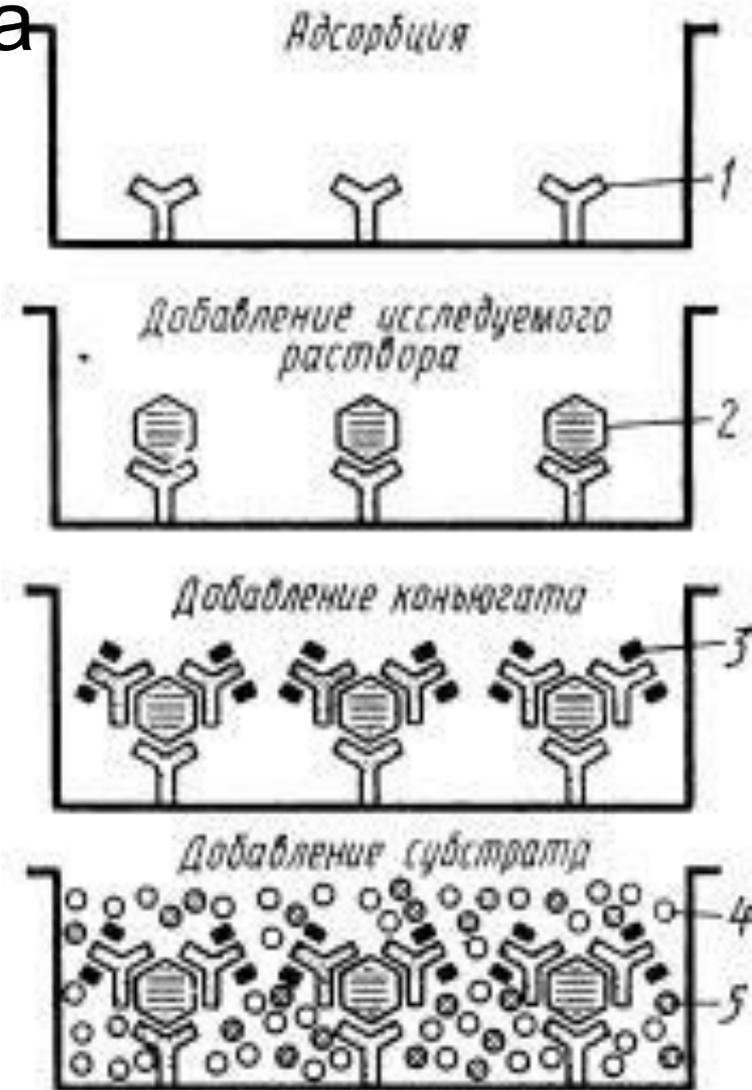
Менее специфичны, чем иммунохимические методы

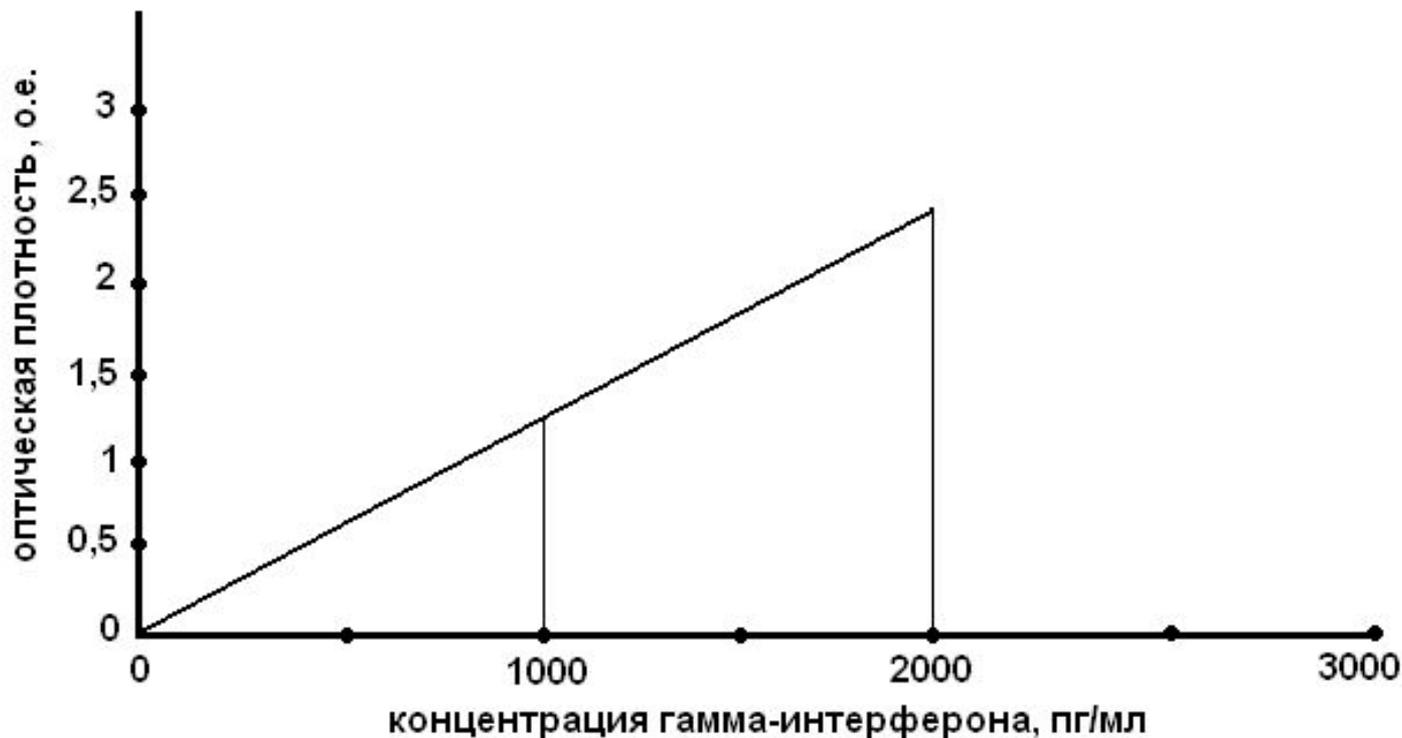
# Иммунохимические методы

1. **Иммуноферментный анализ** в различных модификациях;
2. **Радиоимунный анализ**;
3. **Мультифакторный анализ** (определение до 100 белков при помощи микрочастиц, микрочипов);
4. **Цитофлюориметрический метод** (анализ экспрессии поверхностных молекул и определение цитокинов в цитоплазме);
5. Метод оценки продукции цитокинов единичными клетками в культуре (**ELISPOT**);
6. **Иммуноцитохимия и иммуногистохимия** (оценивает содержание цитокинов в цитоплазме клеток на мазках и на срезах тканей)

# «Сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа

- 1- антитело иммобилизованное на твердой фазе;
- 2- цитокин, специфически связывающийся с АТ;
- Отмывка буфером с детергентом;
- 3- биотин, конъюгированный с антителами;
- 4- биотин пероксидаза, взаимодействующая с биотином;
- 5- субстрат для фермента пероксидазы, меняющий цвет под действием фермента (тетраметилбензидин)



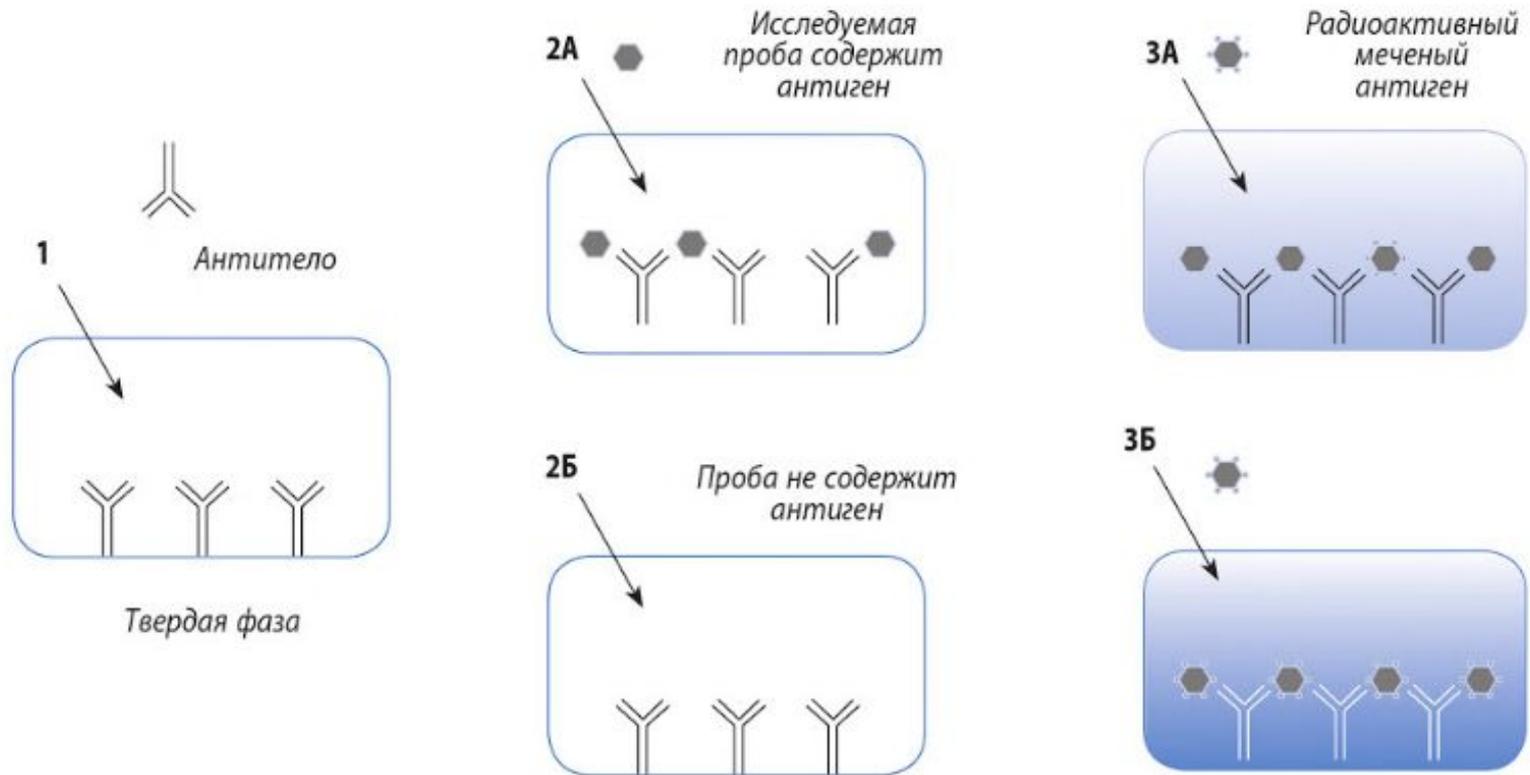


Количественную оценку концентрации цитокинов в пробах совершают, сравнивая результаты с калибровочной кривой зависимости оптической плотности раствора от концентрации стандартного образца цитокина

Поскольку цитокины являются локальными медиаторами, целесообразней измерять их уровни в интересующих исследователя тканях после экстракции тканевых протеинов *in vitro* или в биологических жидкостях. Но при развитии воспаления, аллергии или аутоиммунных процессах могут быть обнаружены в слезе, жидкости десневых карманов, смывов из полостей, моче, спинномозговой жидкости, конденсате выдыхаемого воздуха.

Преимущества	Недостатки
Высокоспецифичный	Измеряет все цитокины, которые связались с АТ, а не только биологически активные
Быстрый (менее 5 часов)	
Простота исполнения	
Порог чувствительности 0,5 пкг/мл	

# Радиоиммунный анализ



## Преимущества

Чувствительность до  $10^{-14}$  моль/л

Простота исполнения

Быстрый

## Недостатки

Дорогостоящие счетчики радиоактивности

Ограниченный срок хранения, зависящий от полураспада

Облучение

# Определение продукции цитокинов клетками

Позволяет определить:

- Общий уровень синтеза цитокинов;
- Цитокиновые профили (поляризацию Т-хэлперных клонов, соотношение агониста и антогониста);
- Оценка синтеза цитокинов в ответ на специфический АГ

# Методика определения синтеза ЦИТОКИНОВ ИЗОЛИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ

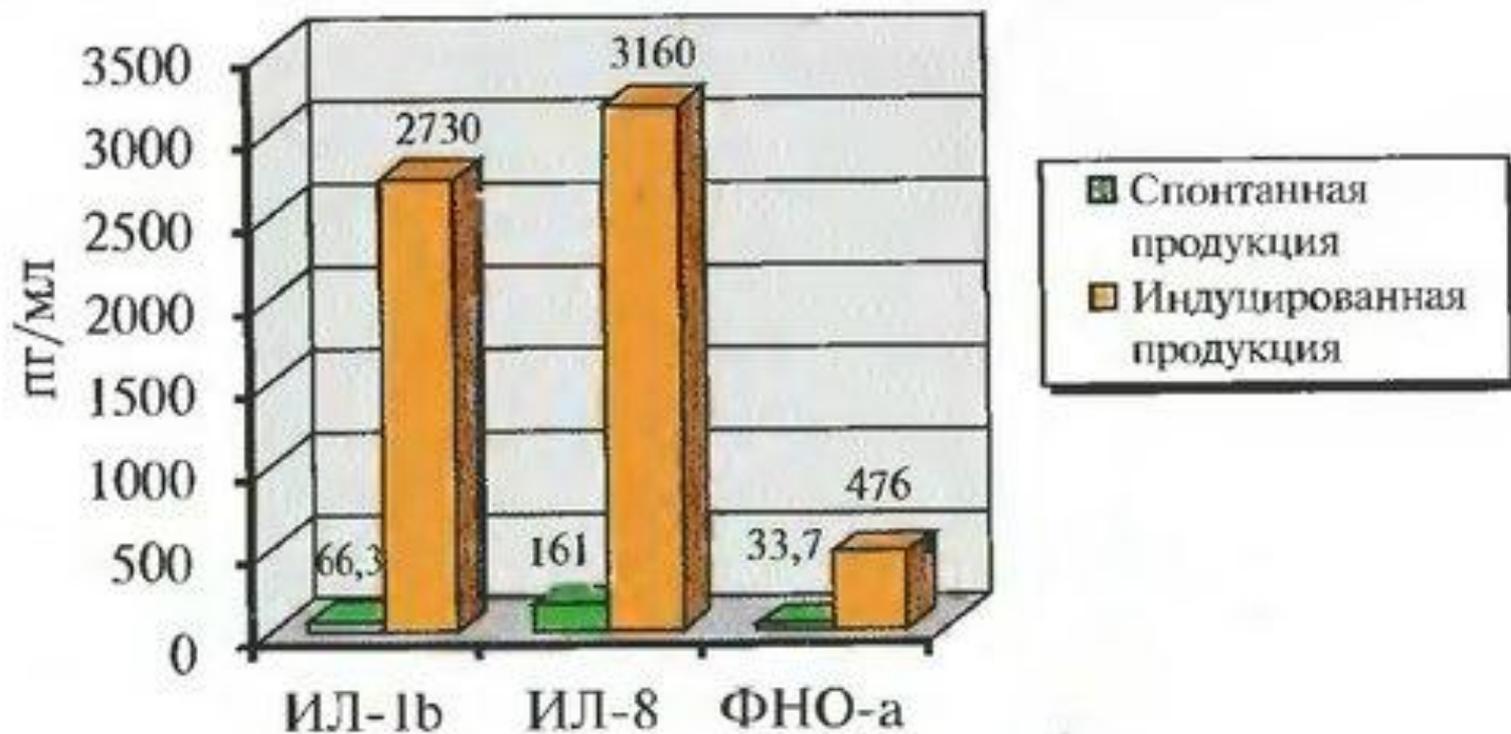
1. Венозную кровь в 5 раз разводят средой RPMI 1640 с добавлением глутамина и гентамицина;
2. Добавляют препараты ЛПС для индукции провосполительных цитокинов ( IL-1,IL-6,TNF)и хемокинов;
3. Фитогемагглютинин-М (ФГА)- универсальный индуктор (провосполительные цитокины, IL-2, IL-4, IFN);
4. Культивируют сутки, отбирают супернатант и исследуют содержание цитокинов;
5. Подсчитывают клетки и полученные данные о концентрациях цитокинов пересчитывают на 1 млн интересующих клеток в 1 мл с учетом разведений крови

# Причины присутствия невысоких концентраций провоспалительных цитокинов в плазме здоровых доноров:

- Тяжелые физические нагрузки;
- Стрессовые факторы неинфекционной природы;
- Вялотекущие скрытые воспалительные процессы
- Иммунопатологические состояния (ранние стадии аутоиммунных и аллергических заболеваний);
- Цитокины связаны с белками переносчиками и факторами связывания (специфические и неспецифические) и не обладают биологической активностью, но выявляются иммунохимически

Спонтанная продукция цитокинов в культуре свидетельствует:

- Клетки активированы in vivo
- Манипуляции в процессе выделения (загрязнение среды или крови)



# Анализ продукции цитокинов изолированными клетками (ELISPOT)

1. Выделенные клетки культивируют в присутствии индуктора синтеза цитокинов в планшетах, на дне которых АТ;
2. Клетки на дне планшета синтезируют цитокины, и определенный связывается с окружающими АТ;
3. Как ИФА, но используется нерастворимый цветной субстрат ферментативной реакции, выпадающий в осадок там, где цитокин связался с сорбированными АТ

Разработаны методы с субстратами разных цветов для оценки синтеза 2-3 цитокинов одновременно



# Определение уровней цитокинов в тканях

- Диссоциация ткани и приготовление тканевого экстракта, который затем тестируется ИФА (не дает информации о том, какие клетки продуцируют цитокины и где локализованы в ткани);
- Иммуногистохимический метод (обнаружение цитокинов в мазках клеточных суспензий и кусочках



# Молекулярно-биологические методы изучения цитокинов

Определение экспрессии генов цитокинов по накоплению мРНК

- Гибридизация мРНК с специфическими олигонуклеотидными зондами с радиоактивными, флюоресцентными или ферментативными метками (РНК-РНК-гибридизация);
- Определяет количество и тип клеток, экспрессирующих цитокины;
- Цитокиновую мРНК определяют ПЦР в варианте обратной транскрипции

**Спасибо за внимание**