

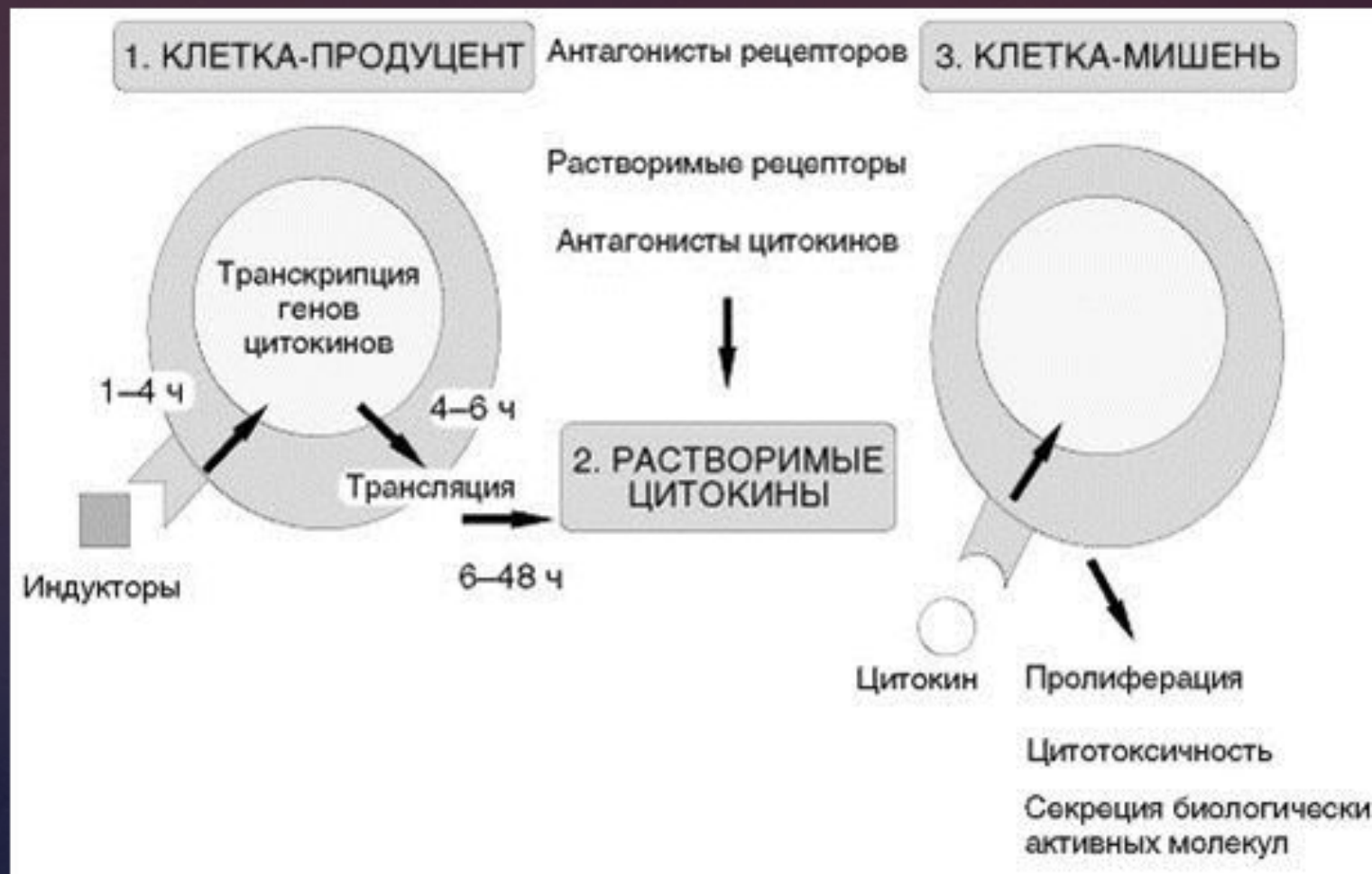
Методы оценки системы цитокинов {

Студентки 3.4.12.группы
Дариенко Кристины

- Цитокины в настоящее время рассматривают как белковопептидные молекулы, продуцируемые различными клетками организма и осуществляющие межклеточные и межсистемные взаимодействия.

В последние годы сложилось представление о системе цитокинов, объединяющей:

- 1) клетки-продуценты;
- 2) растворимые цитокины и их антагонисты;
- 3) клетки-мишени и их рецепторы



В комплексный анализ системы цитокинов входит следующее.

- ▣ I. Оценка клеток-продуцентов.
- ▣ II. Оценка цитокинов и их антагонистов в биологических средах организма.
- ▣ III. Оценка клеток-мишеней.

В настоящее время разработаны многочисленные методы оценки системы цитокинов, которые дают разноплановую информацию.

Среди них различают:

- ▣ 1) молекулярно-биологические методы;
- ▣ 2) методы количественного определения цитокинов с помощью иммуноанализа;
- ▣ 3) тестирование биологической активности цитокинов;
- ▣ 4) внутриклеточное окрашивание цитокинов;
- ▣ 5) метод ELISPOT, позволяющий выявить цитокины вокруг единичной цитокинпродуцирующей клетки;
- ▣ 6) иммунофлюоресценцию.

Молекулярно-биологические методы

С их помощью исследуют:

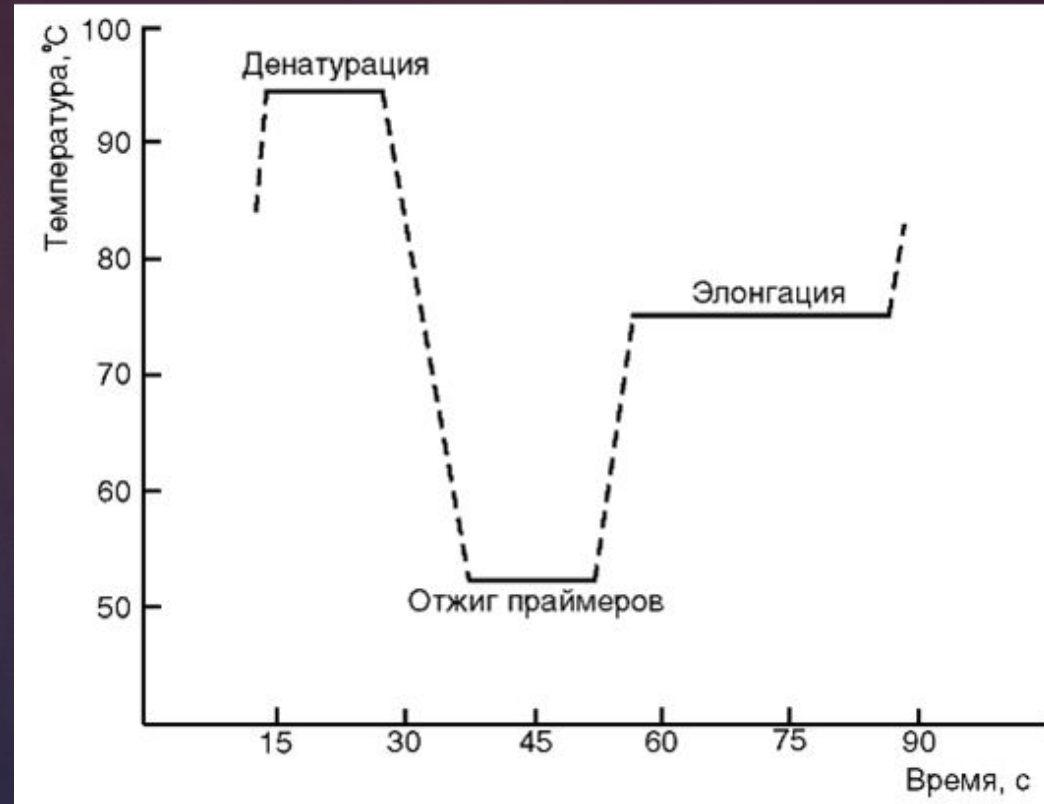
- ▣ экспрессию генов цитокинов
- ▣ рецепторов цитокинов
- ▣ сигнальных молекул
- ▣ изучать полиморфизм указанных генов.

МЕТОДЫ:

- ▣ ПЦР-РВ (амплификатор позволяет детектировать флуоресценцию каждый цикл и наблюдать рост количества ПЦР-продукта в каждой пробирке, и далее по имеющейся калибровке определять точное исходное количество образца в пробе)
- ▣ Метод гибридизации *in situ* (позволяет уточнить тканевую и клеточную локализацию экспрессии цитокиновых генов).

ПЦР-РВ

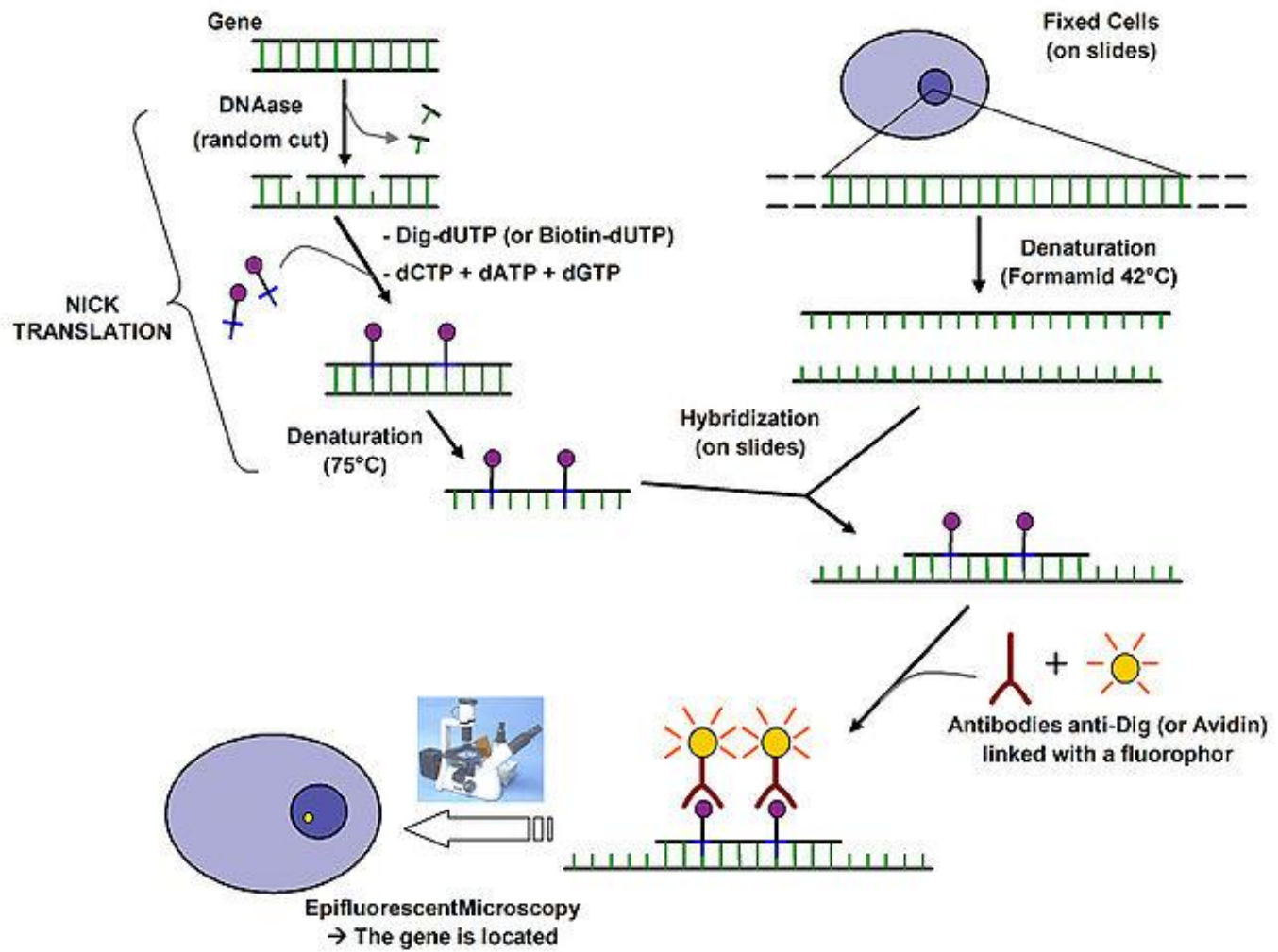
- Компоненты полимеразной цепной реакции.
- Taq-ДНК-полимераза
- Дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
- буферный раствор
- «прямой» и «обратный» праймеры
- ДНК-матрица
- флуоресцентный зонд (TaqMan и др.), или интеркалирующий краситель (SYBR GreenI и др.)



Метод гибридизации *in situ*

- ▣ *Метод гибридизации in situ.* Метод включает:
 - ▣ 1) замораживание органа и приготовление криостатных срезов;
 - ▣ 2) фиксацию параформальдегидом;
 - ▣ 3) выявление мРНК с помощью меченой кДНК.

FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)



Количественное определение цитокинов

- ▣ в биологических жидкостях
- ▣ в культурах моноклеарных клеток периферической крови

МЕТОДЫ:

- ▣ ИФА(позволяет узнать, каковы точные концентрации цитокинов в биологических жидкостях организма)

ИФА

Метод иммуноанализа, базирующийся на количественном определении растворимых веществ, в основе которого лежит взаимодействие антигена с антителом (т.е. иммунологическое распознавание), которое детектируется (визуализуется) с помощью специальной метки, заранее конъюгированной либо с антителом, либо с антигеном.

Метка:

- ▣ Ферменты, катализирующие превращение *бесцветного* субстрата в *цветной* или *флюоресцирующий* продукт.

Результат реакции определяют на флюориметре, измеряющем излучение в определенном диапазоне длин волн.

ELISA

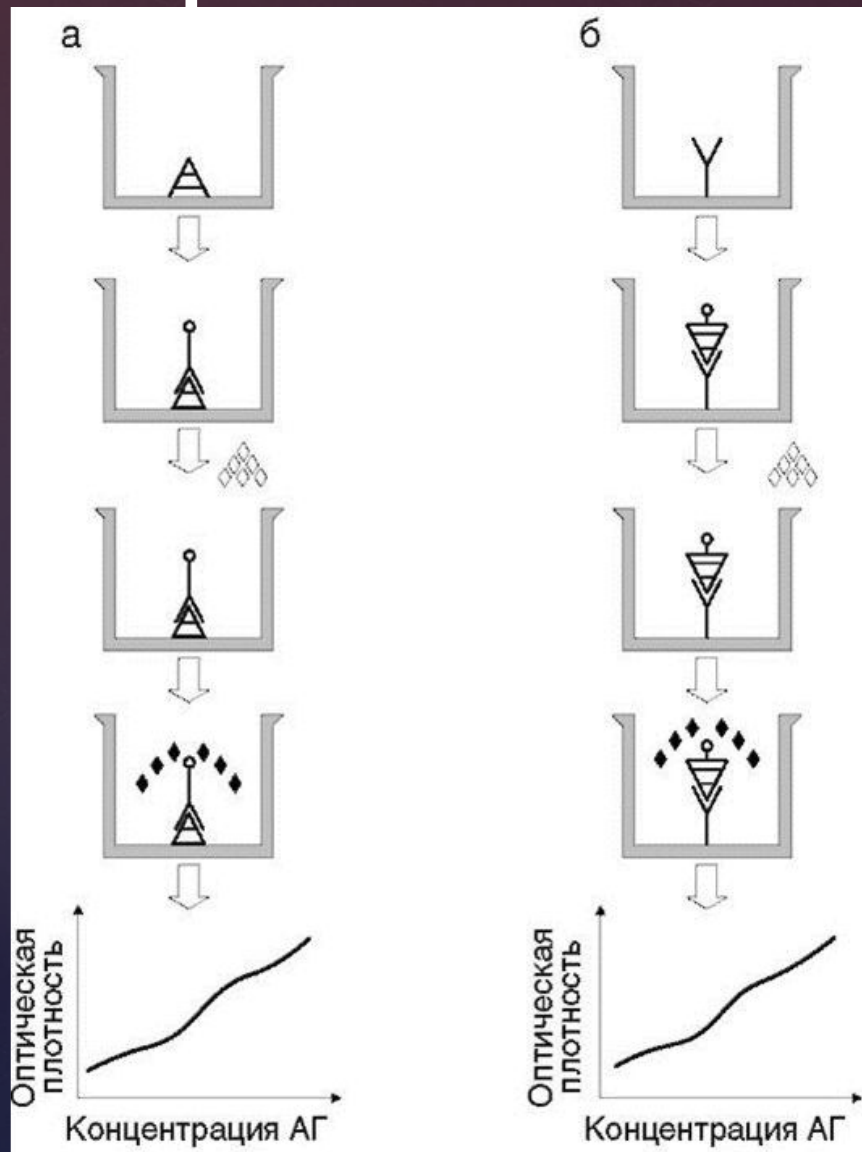
В технологии иммуноанализов используют твердую фазу, на которой методом спонтанной сорбции из раствора фиксируется антиген или антитело. Анализ называется твердофазным, или иммуносорбентным (англ. ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay).

В качестве «твердой фазы» используют следующие материалы:

- пластмассу (полистирол, поливинилхлорид и др.) в виде стандартно штампованных микроплашек с 96 или 60 лунками (или шарики, колпачки и прочее - для постановки единичных проб);
- пористые материалы типа нитроцеллюлозы в виде наполнителей в объеме или в виде плоских листов или полосок стрипов

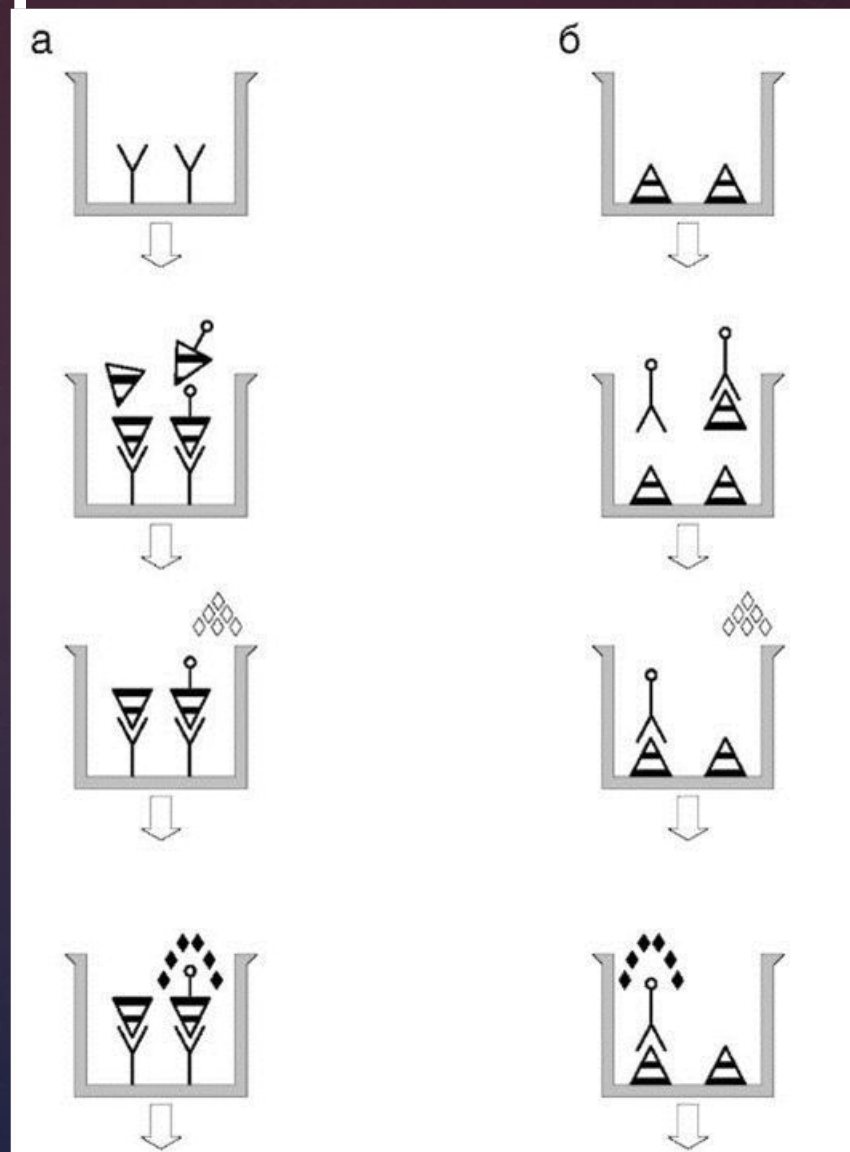
Прямой метод ИФА: а -

для выявления антител; б -
для выявления антигена



Принцип конкурентного

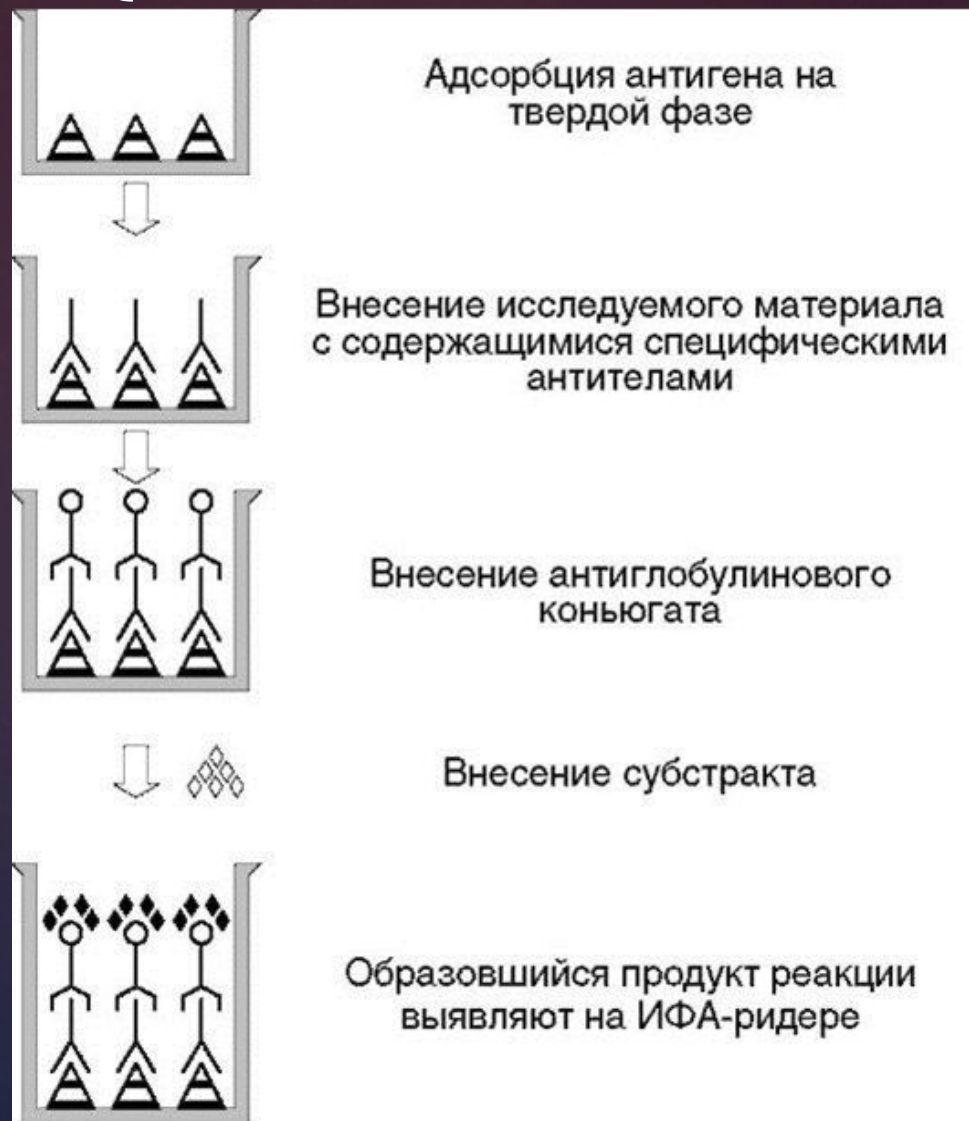
(а) и ингибиторного (б)
ИФА



Принцип «сэндвич»-ИФА



Принцип не прямых иммуноанализов



Ферменты-метки в ИФА

- 1. *Пероксидаза из корней хрена* субстрат - орто-фенилендиамин (продукт желто-коричневый, растворимый, поглощает при 492 нм)
- 2. *β -Галактозидаза* (субстрат - 4-метилумбеллиферил- β -D-галактозин).
- 3. *Щелочная фосфатаза* (субстрат - p-нитрофенил фосфат, продукт желтый, растворимый, поглощает при 405 нм).
- 4. *Уреаза* (субстрат - мочеви́на в комбинации с бромкрезолом пурпурным, продукт образуется очень быстро, пурпурного цвета, растворимый, поглощает при 590 нм).

Тестирование биологической активности цитокинов

Четыре разновидности тестирования
цитокинов:

- ▣ 1) по индукции пролиферации клеток-мишеней
- ▣ 2) по цитотоксическому эффекту;
- ▣ 3) по индукции дифференцировки костно-мозговых предшественников;
- ▣ 4) по противовирусному действию.

Как определяют активность ЦИТОКИНОВ?

- **ИЛ-1** - по стимулирующему действию на пролиферацию мышинных тимоцитов, активированных митогеном *in vitro*;
- **ИЛ-2** - по способности стимулировать пролиферативную активность лимфоцитов;
- **ФНОα и лимфотоксины** - по цитотоксическому действию на мышинные фибробласты (L929) тестируют.
- **Колонiestимулирующие факторы** - по способности поддерживать рост костномозговых предшественников в виде колоний в агаре
- **ИФН** - по угнетению цитопатического действия вирусов в культуре диплоидных фибробластов человека и опухолевой линии фибробластов мышей L-929.

Использование биоанализа для выявления интерферона

Используют клетки, чувствительные к действию ИФН:

- ▣ первично трипсинизированные клетки-фибробласты эмбрионов кур и человека,
- ▣ перевиваемые клетки диплоидных фибробластов человека
- ▣ культура мышинных клеток (L929).

Определение активности интерферона

- Взвесь диплоидных фибробластов плода человека на среде с 10% сывороткой эмбрионов коров разливают в стерильные 96-луночные плоскодонные планшеты по 100 мкл в лунку; помещают в CO₂-инкубатор при температуре 37 °С.
- После формирования монослоя удаляют ростовую среду и в каждую лунку добавляют по 100 мкл поддерживающей среды.
- Титрование активности ИФН в исследуемых образцах проводят методом двукратных разведений на монослое фибробластов.

Одновременно с образцами в лунки вносят вирус энцефаломиеелита мышей (ВЭМ) в дозе, вызывающей 100% поражение клеток через 48 ч после заражения.

- Планшеты с разведениями образца инкубируют 24 ч при температуре 37 °С в атмосфере с 5% содержанием CO₂.
- Уровень активности ИФН определяют величиной, обратной значению максимального разведения тестируемого образца, задерживающего цитопатическое действие вируса на 50%, и выражают ее в единицах активности на 1 мл.
- Для определения типа ИФН в систему добавляют антисыворотку против ИФН α , ИФН β или ИФН γ . Антисыворотка отменяет действие соответствующего цитокина, что позволяет идентифицировать тип ИФН.

МИФ (миграции ингибирующего фактора)

- один из важнейших биологических медиаторов (функции цитокина, гормона, фермента)
- действие МИФ на клетки-мишени реализуется через CD74-рецептор или через неклассический путь эндоцитоза.
- важный медиатор воспаления, активирующий функцию макрофагов (выработку цитокинов, фагоцитоз, цитотоксичность)
- участвует в патогенезе многих воспалительных заболеваний, включая сепсис, ревматоидный артрит (РА), гломерулонефрит

Определение МИФ-активности

- ▣ Основан на формировании на дне лунок 96-луночного плоскодонного планшета клеточных микрокультур (лейкоцитов или макрофагов)
- ▣ Культивирование в питательной среде и определение изменения площади этих микрокультур при действии МИФ
- ▣ Определение биологической активности МИФ проводят с помощью устройства для формирования клеточных микрокультур (рис. 7.7) - МИГРОСКРИН

- В лунки 96-луночного планшета добавляют по 100 мкл разведенной на культуральной среде пробы. В ней определяют МИФ-активность (каждое разведение в 4 параллелях, опытные пробы).

Культуральная среда включает RPMI 1640, 2 mM L-глутамина, 5% сыворотки эмбриона коровы, 40 мкг/мл гентамицина.

- В контрольные лунки добавляют культуральную среду (в 4 параллелях) по 100 мкл.
- Готовят клеточную суспензию перитонеальных макрофагов(2 мышам-гибридам (СВАхС57В1/6)F1 внутрибрюшинно вводят по 10 мл раствора Хенкса с гепарином (10 ЕД/мл), массируют брюшко в течение 2-3 мин, животное забивают декапитацией, прокалывают брюшную стенку и через иглу шприцем отсасывают экссудат. Клетки перитонеального экссудата дважды отмывают раствором Хенкса, центрифугируя их 10-15 мин при 200 g. Затем готовят суспензию клеток с концентрацией 10 ± 1 млн/мл среды RPMI 1640.

- ▣ Собирают систему МИГРОСКРИН, представляющую собой штатив для направленной и стандартной фиксации наконечников с клеточными культурами в строго вертикальном положении на заданной высоте над центром лунки 96-луночного культурального планшета, а также включающую 92 наконечника.



Схема МИГРОСКРИН - устройства для количественной оценки миграции клеточных культур

- Клеточную суспензию набирают автоматической пипеткой в наконечники - по 5 мкл в каждый, ополаскивают от избытка клеток однократным опусканием в среду и вставляют вертикально в гнезда штатива системы. Заполненный штатив с наконечниками выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч на строго горизонтальной поверхности. За это время происходит оседание клеток суспензии на дно лунок, где формируются стандартные клеточные микрокультуры.

- ▣ Штатив с наконечниками осторожно снимают с планшета. Планшет с микрокультурой клеток помещают в строго горизонтальном положении в CO_2 -инкубатор, где культивируют в течение 20 ч. В ходе культивирования клетки мигрируют по дну лунки.
- ▣ Количественный учет результатов (на бинокулярной лупе, оценивая размер колонии по шкале внутри окуляра. Микрокультуры имеют форму круга.)

$$\text{ИМ} = \frac{\text{Квадрат среднего диаметра для опытных микрокультур}}{\text{Квадрат среднего диаметра в контроле}} .$$

Проба обладает МИФ-активностью, если значения ИМ равны $0,6 \pm 0,2$.

Биологическая активность ФНО α

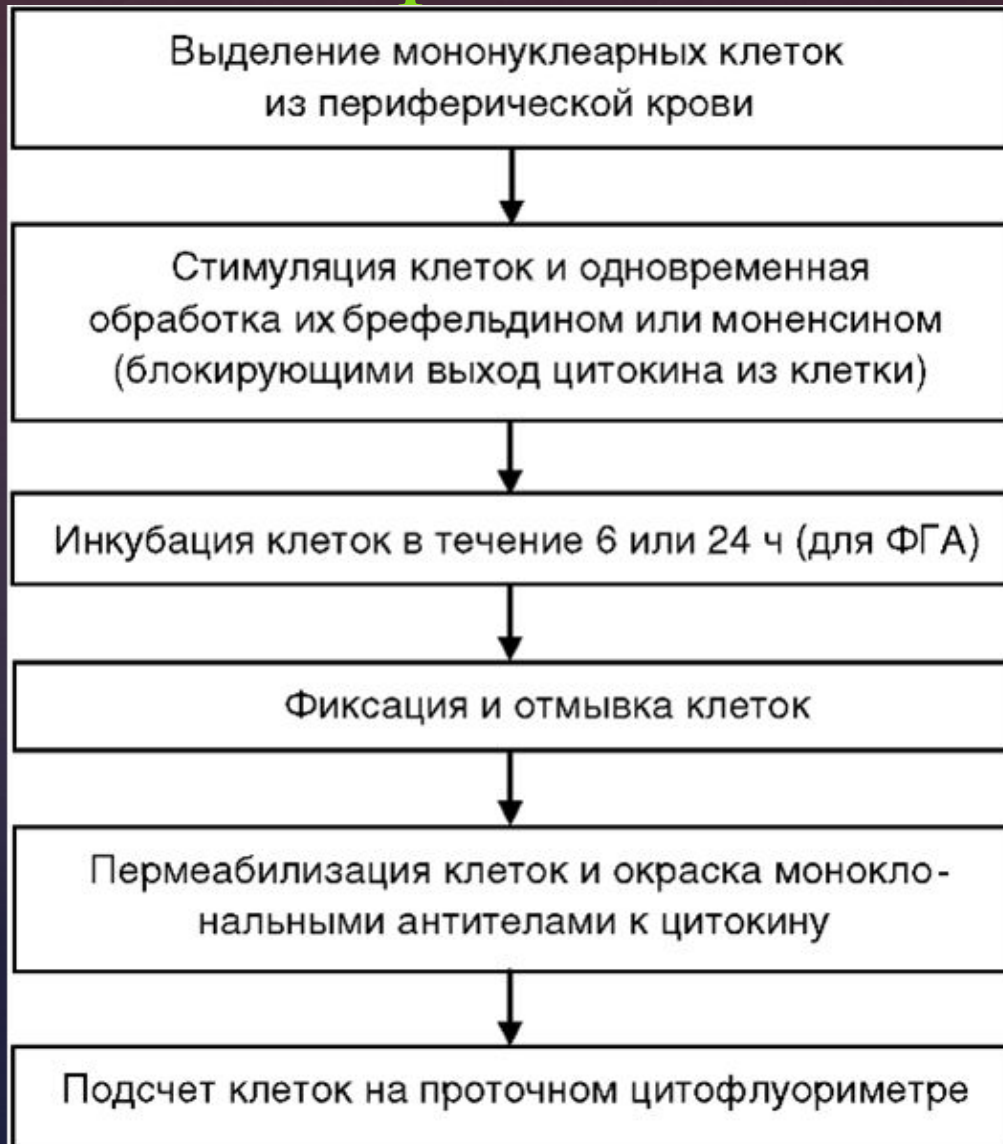
Оценивают по цитотоксическому его действию на линию трансформированных фибробластов L-929. В качестве положительного контроля используют рекомбинантный ФНО α , а в качестве отрицательного контроля - клетки в культуральной среде. Клетки окрашивают красителем (метиленовым синим), который включается только в погибшие клетки.

Цитотоксический индекс

$$\text{ЦИ} = \frac{a - b}{a} \times 100\%,$$

где a - количество живых клеток в контроле; b - количество живых клеток в опыте.

Внутриклеточное окрашивание цитокинов



- Индуктор цитокинов –
- активатор протеинкиназы C
- форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) в комбинации с ионофором кальция иономицином (ИН).
- митоген (ФГА) (для Т-лимфоцитов)
- ЛПС(для В-клеток)

ELISPOT

- Для определения частоты цитокин-продуцирующих клеток в популяции применяют вариант иммуноферментного анализа ELISPOT

1



2



3



4



5



6



7



- На нитроцеллюлозе сорбируют интересующий антиген, в лунки помещают лимфоциты в полноценной культуральной среде и культивируют их в оптимальных для живых клеток условиях
- Через несколько часов/суток клетки вымывают из лунок в проточной системе физраствором
- Если какие-то клетки секретировали антитела против антигена, сорбированного на дне, то на этом дне фиксируются иммунные комплексы «антиген-антитело»
- добавляют антииммуноглобулиновый конъюгат с ферментом, инкубируют, промывают, добавляют бесцветный субстрат.
- Фермент, остающийся после промывок только в точках, в которых лежали во время культивирования антителообразующие клетки, катализирует образование цветного продукта.
- На дне лунок образуются окрашенные пятна в тех точках, над которыми лежали антителообразующие клетки (АОК).

Иммунофлюоресценция

Метод включает:

- ▣ 1) замораживание органа и приготовление криостатных срезов;
- ▣ 2) фиксацию;
- ▣ 3) обработку срезов мечеными флуоресцеином антицитокинновыми антителами;
- ▣ 4) визуальное наблюдение флуоресценции.

Оценка клеток-продуцентов

1. Определение экспрессии:

- ▣ • рецепторов, распознающих патоген или антиген (ТКР, TLR) на уровне генов и молекулы белка (ПЦР);
- ▣ • генов цитокинов (ПЦР);

2. Количественное определение субпопуляций клеток, содержащих те или иные цитокины: Th1, Th2 Th17 (метод внутриклеточного окрашивания цитокинов); определение количества клеток, секретирующих определенные цитокины (метод ELISPOT)

Оценка цитокинов в биологических средах организма

- ▣ Тестирование биологической активности цитокинов.
- ▣ Количественное определение цитокинов с помощью ИФА.
- ▣ Иммуногистохимическое окрашивание цитокинов в тканях.

Оценка клеток-мишеней

- ▣ Определение экспрессии рецепторов цитокинов на уровне генов и белковой молекулы (ПЦР).
- ▣ Определение сигнальных молекул во внутриклеточном содержимом.
- ▣ Определение функциональной активности клеток-мишеней.

Иммунопатология

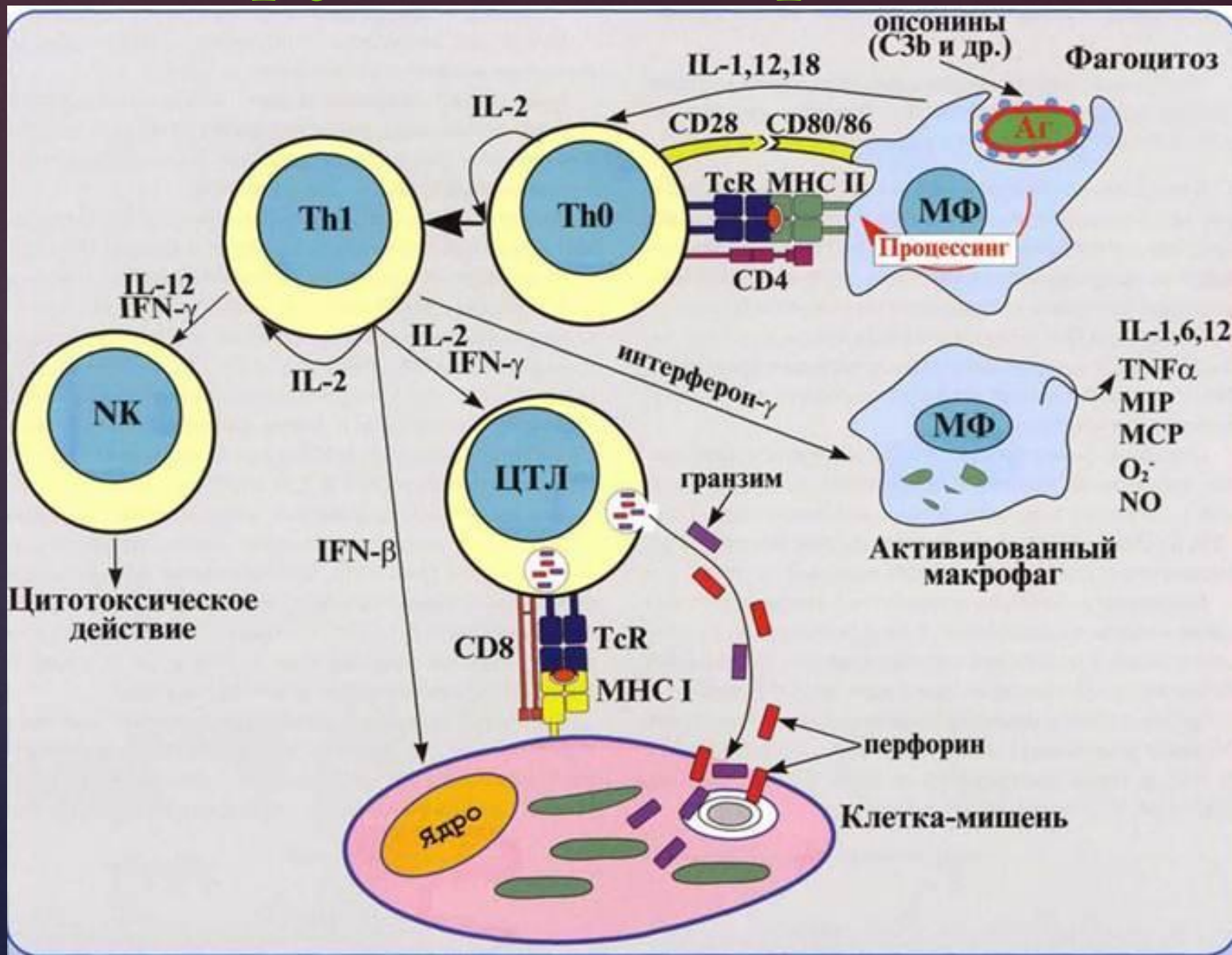
- ▣ **Иммунопатология** – область иммунологии, изучающая патологические процессы и заболевания иммунной системы
- ▣ Как правило, сопровождается **воспалением**

Цитокины и воспаление

В зависимости от воздействия на воспалительный процесс **цитокины** делят на:

- Провоспалительные (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-а, ИЛ-12)
- Противовоспалительные (ИЛ-4, ИЛ-10, ТФР-в)

Вирусные инфекции



СПИД

- ВИЧ принадлежит к семейству РНК-содержащих вирусов
- В составе оболочки вируса содержится белок gp160, состоящий из мембранной части gp120 и внутримембранной gp41.
- Gp120 связывается с CD4, проникает в клетку-мишень.
- Основные мишени ВИЧ – CD4+ Т-клетки человека, количество которых снижается в результате заболевания.
- Для инфицирования клеток-мишеней ВИЧ необходим корецептор(хемокиновый): CCR5, который экспрессируется мононуклеарными фагоцитами.
- Мутации CCR5 защищают от инфицирования ВИЧ

Роль цитокинов при СПИД

- ▣ Снижается уровень ИФН- γ , ИЛ-2(который регулирует пролиферацию и дифференцировку Т- и В-лимфоцитов)
- ▣ Снижается уровень ИЛ-12, ИЛ-16, ИЛ-13
- ▣ Повышается уровень ФНО-а (вырабатывают мононуклеарные фагоциты)
- ▣ ФНО-а способствует прогрессированию заболевания, но и подавляет экспрессию ССR5
- ▣ ИЛ-10 угнетает репликацию ВИЧ в макрофагах
- ▣ Уменьшается образование цитокинов Th1-клетками

Аллергия

Это сверхчувствительность иммунной системы организма при повторных воздействиях аллергена на ранее сенсibilизированный этим аллергеном организм.

Аллерген - Аг или гаптены, которые вызывают образование IgE у генетически предрасположенных организмов.

Аллергический ринит

- Одно и наиболее распространенных аллергических заболеваний
- Характеризуется IgE-опосредованным воспалением слизистых оболочек носовой полости и наличием хотя бы двух из симптомов: заложенность носа, выделения из носа, чиханье, зуд в носу.

Роль цитокинов

СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ:

- Аллерген □ захват АГ-презентирующими клетками и фрагментация □ презентация Т-клеткам □ Th2-лимфоциты вырабатывают цитокины □ связывание CD40 с CD40L □ В-клетки вырабатывают IgE □ IgE фиксируется на тучных клетках и базофилах слизистой носа

ПОВТОРНЫЙ КОНТАКТ:

- Связывание аллергена с IgE □ активация тучных клеток, дегрануляция □ выделение медиаторов, в том числе хемотаксических (ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-13) □ привлечение воспалительных клеток в слизистую оболочку полости носа

Аутоиммунное заболевание

- Это болезнь иммунной системы, обусловленная тем, что под влиянием генетически обусловленных факторов и/или факторов внешней среды утрачивается толерантность к антигенам собственного организма, что ведет к развитию иммуноопосредованных, органоспецифических или системных патологических процессов.
- В основе лежит самоподдерживающийся иммунный ответ против собственных антигенов, вызывающий повреждение клеток и тканей, экспрессирующих эти антигены

Диабет I типа

- Органоспецифическое аутоиммунное заболевание, при котором наблюдается дефицит инсулина из-за повреждения В-клеток (АФК, TNF α/β , FASL)

Ревматоидный артрит

- Хроническое АИЗ, характеризующееся воспалением синовиальной оболочки сустава
- В качестве аутоантигенов выступают IgG (IgM антитела против IgG выступают как ревматоидный фактор)
- Цитруллинатные белки(белки,содержащие цитруллин, образующийся из орнитина)
- Появляются АТ к цитруллинатным белкам
- Th1-клеточный иммунный ответ
- Разрушение хряща: TNF-а, ИЛ-6,ИЛ-8,ИЛ-17, ИФН-γ, АФК.