

# Методы оценки врождённого иммунитета

Родина А.С. Группа 3.4.01

**Врождённый иммунитет** – наследственно закреплённая система защиты многоклеточных организмов от любых патогенных и непатогенных организмов, а также эндогенных продуктов тканевой деструкции.

### **Характеристика:**

- Обеспечивает распознавание и элиминацию патогенов в первые несколько минут/часов после их проникновения в организм, когда механизмы адаптивного иммунитета еще отсутствуют
- Его функции осуществляются через клеточные ( макрофаги, ДК, нейтрофилы, тучные клетки, эозинофилы, базофилы, НК-и НКТ-клетки, В1-лимфоциты и  $\gamma\delta$ T-клетки) и гуморальные факторы (естественные АТ, цитокины, комплемент, белки острой фазы, катионные противомикробные липиды, лизоцим)

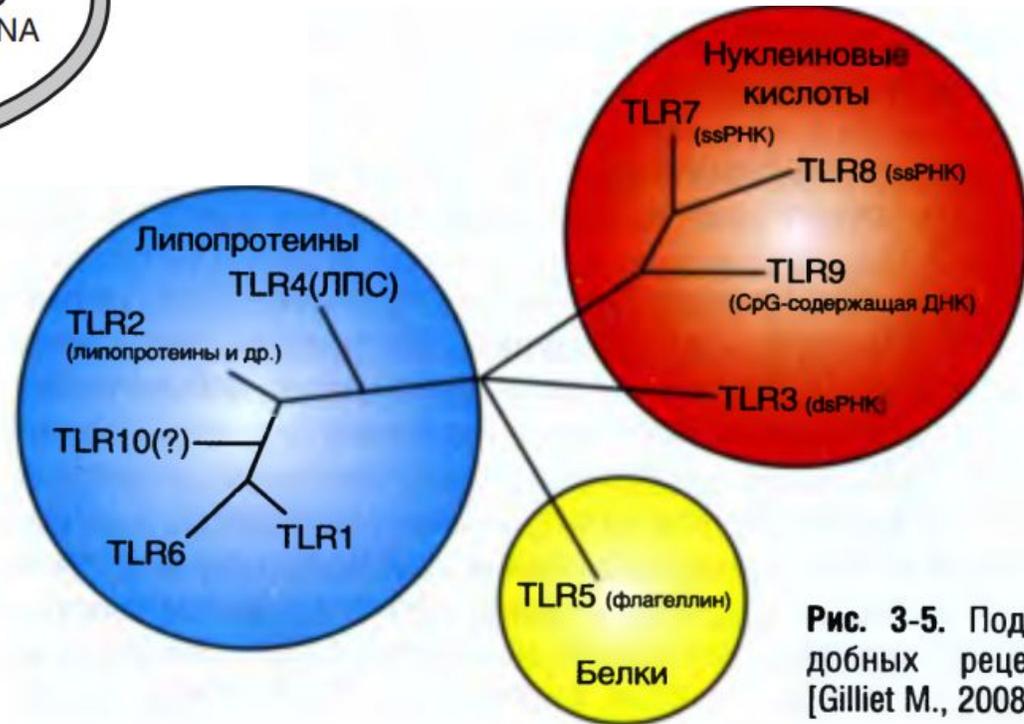
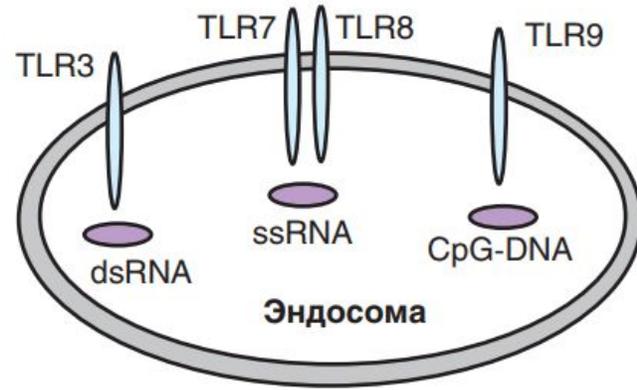
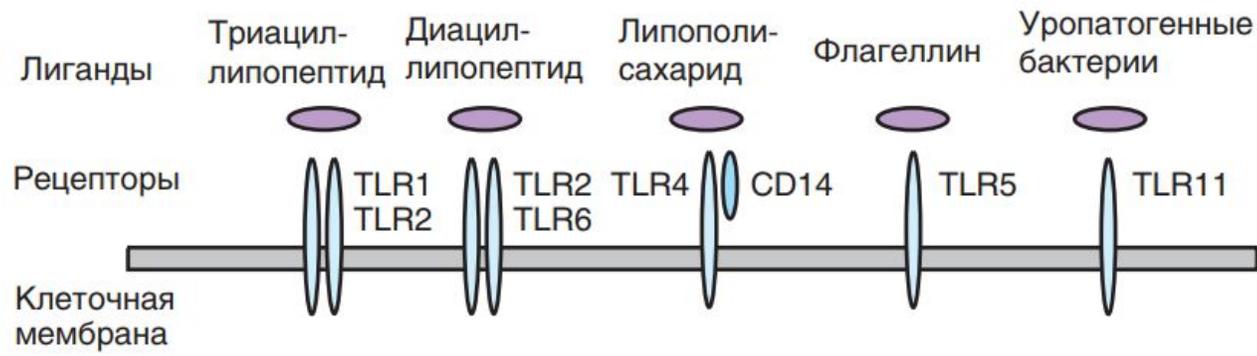
- Клетки врождённого иммунитета не образуют клонов
- Клетки врождённого иммунитета не подвергаются негативной и позитивной селекции
- Распознавание патогенов происходит с помощью многочисленных рецепторных структур ( Scavenger-рецепторы, маннозные рецепторы, рецепторы комплемента, лектиновые рецепторы, PRR )
- Факторы врождённого иммунитета не изменяются в процессе жизни организма, контролируются генами зародышевой линии и наследуются
- Его активация не формирует продолжительной иммунной памяти, но необходима для развития адаптивного и.о.

# Toll-like receptors (TLR)

- TLR — трансмембранные гликопротеины I типа (т.е. с NH<sub>2</sub>-концом, направленным наружу клетки). Их молекулярная масса составляет 90–115 кДа. Внеклеточная часть молекул TLR образована доменом, содержащим 19–25 повторяющихся последовательностей — богатых лейцином повторов — LRR (от *Leucine-rich repeats*). Эти последовательности состоят из 24–29 аминокислотных остатков и содержат мотив xxLxLxL (L — лейцин, x — любые другие остатки), а также дополнительные консервативные остатки лейцина (обычно 4–6 остатков в каждой). Этот внеклеточный домен TLR называют LRR-доменом.

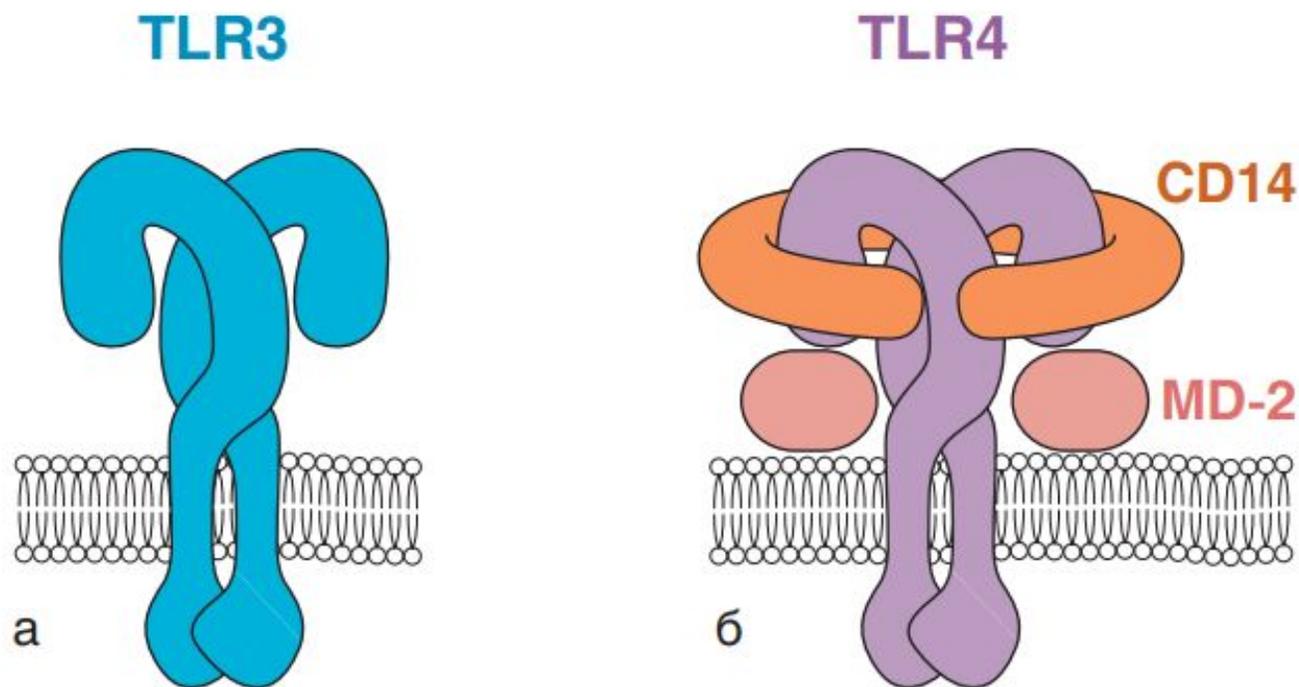


- Цитоплазматическая (С-концевая) часть рецептора представлена TIR-доменом (*Toll/IL-1 receptor and resistance domain*), ответственным за взаимодействие с адаптерными молекулами сигнальных путей. TIR-домен состоит из центрального  $\beta$ -слоя (образован 5  $\beta$ -цепями), окруженного 5  $\alpha$ -спиралями.
- Между LRR- и TIR-доменами расположен короткий трансмембранный участок, отвечающий за выбор типа мембраны (клеточная или лизосомальная) и встраивание в нее.
- В результате TLR, распознающие паттерны на поверхности бактерий, грибов, простейших, а также продукты жизнедеятельности микроорганизмов (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-11), локализованы на внешней клеточной мембране.
- Внутри клетки (в эндосомах/лизосомах) расположены TLR, распознающие нуклеиновые кислоты (TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9), при этом их паттернраспознающая часть направлена внутрь гранулы. Важно отметить, что TLR-4 может присутствовать не только на наружной мембране, но и в эндолизосомах.



**Рис. 3-5.** Подсемейства Toll-подобных рецепторов человека [Gilliet M., 2008].

TLR в покоящихся клетках — мономерные молекулы, но при взаимодействии с лигандами они формируют димеры — обычно **гомодимеры**; однако при распознавании грамположительных бактерий и их липидсодержащих компонентов TLR-1, TLR-2 и TLR-6 формируют **гетеродимеры** состава TLR-2/TLR-1 и TLR-2/TLR-6



Рецептор	Экзогенные лиганды (патогенассоциированные молекулярные паттерны)	Патогены	Эндогенные лиганды
<b>Мембранные</b>			
TLR-2, TLR-1	Триацил-липopeптиды, пептидогликан, тейхоевые кислоты, липотейхоевые кислоты, зимозан, липоарабиноманнан, порин	Грамположи- тельные бактерии, грибы, микобак- терии, спирохеты, трипаносомы, нейссерии, леп- тоспиры, дрожжи, цитомегаловирус	Белки теплового шока (Hsp70, Hsp96), липопротеины, обра- зы опасности (DAMP)
TLR-1, TLR-6	Диацил-липopeптиды, пептидогликан, тейхоевые кислоты, липотейхоевые кислоты, зимозан, липоарабиноманнан	Грамположи- тельные бактерии, микоплазма	Образы опасности (DAMP)
TLR-4	Липополисахарид, липо- тейхоевая кислота, таксол, флаволипид, F-белок рес- пираторно-синцитиаль- ного вируса, фимбрии 1-го и Р-типа	Грамотрицатель- ные бактерии, хламидии, флаво- бактерии, респи- раторно-синцити- альный вирус	Белки теплового шока (Hsp60, Hsp70), β-дефензины, гиалуронан HMGB-1, фибронектин
TLR-5	Флагеллин	Сальмонеллы, жгу- тиковые бактерии	Не описаны
TLR-11	Профилин	Уропатогенная кишечная палочка	Не описаны

Рецептор	Экзогенные лиганды (патогенассоциированные молекулярные паттерны)	Патогены	Эндогенные лиганды
<b>Внутриклеточные</b>			
TLR-3	Двуспиральная РНК, поли(I:C)	Вирусы	Ауто-РНК
TLR-7	Односпиральная РНК виру- сов, аналоги нуклеозидов (имидазохинолины), локсорибин, бромиримин	Вирусы	Ауто-РНК, рибонуклеопро- теины
TLR-8	Односпиральная РНК виру- сов, аналоги нуклеозидов	Вирусы	Ауто-РНК, рибонуклеопро- теинсодержащие иммунокомплексы
TLR-9	ДНК микроорганизмов и синтетические олигонуклео- тинуклеотиды, содержащие неметилированные CpG-тандемы	Бактерии, вирусы	Ауто-ДНК, хроматин и хроматинсодержа- щие иммунокомплек- сы HMGB-1

# Оценка экспрессии TLR

- Взятие периферической крови в гепаринизированные пробирки
- Выделение мононуклеарных клеток на градиенте фиколл-урографина
- Культивирование МНК в среде РПМИ 1640 (24ч)
- Инкубация полученных МНК с FITC-мечеными антителами к CD14<sup>+</sup>, PE-мечеными антителами к TLR2 и TLR4 с соответствующими изотипическими контролями (30 мин при 4<sup>0</sup>C).
- Анализ экспрессии CD14, TLR2 и TLR4 на проточном цитофлуориметре
- Оценка процента моноцитов, несущих на своей поверхности TLR2 и TLR4, и средней интенсивности флуоресценции в усл.ед.

# Определение функциональной

## активности TLR

- Взятие периферической крови в гепаринизированные пробирки
- Выделение мононуклеарных клеток на градиенте фиколл-урографина
- Культивирование МНК в среде РПМИ - 1640 (24ч)
- Выделенные МПК помещаются в 96-ти луночный планшет и культивируются (24ч) с добавлением TLR-лиганда: пептидогликан 5 мкг/мл, зимозан 10,0 мкг/мл, ЛПС 0,1 мкг/мл, флагеллин 0,5 мкг/мл, Poly(I:C) 20 мкг/мл и олигодезоксинуклеотид (ОДН) CpG 1,0 мкг/мл, действующие через TLR1/2, TLR2/6, TLR4, TLR5, TLR3 и TLR9, соответственно.
- Контроль – МНК, культивируемые только в полной среде (спонтанная выработка TNF- $\alpha$ )
- Осаждение МНК центрифугированием при 400 g в течение 15 мин с получением супернатанта
- Определение концентрации цитокинов в супернатанте с помощью ИФА (тест-системы)
- КС(коэф. стимуляции) - отношение концентрации цитокина в супернатантах стимулированных лигандами МНК к концентрации цитокинов в супернатантах нестимулированных МНК.

# γδТ- лимфоциты

Выделяют циркулирующие и резидентные γδТ-лимфоциты.

Циркулирующие γδТ-лимфоциты составляют в среднем 1-10% от мононуклеаров периферической крови (МПК). Экспрессируют:  
CD3+Vγ9Vδ2+TCR

Резидентные γδТ-лимфоциты имеют CD3+Vδ1+ или CD3+Vδ3+TCR и доминируют в слизистых оболочках желудочно-кишечного, респираторного и урогенитального трактов. Большинство резидентных γδТ-клеток развиваются тимуснезависимым способом. Помимо выполнения эффекторной цитотоксической функции, резидентные γδТ-лимфоциты играют большую роль в иммунорегуляции и иммунологическом надзоре организма. Также было показано, что резидентные внутриэпителиальные Т-клетки с γδTCR находятся в дифференцированном, но покоящемся состоянии («activated-yet-resting T-cells») и участвуют в реализации механизмов врожденного иммунитета.

# Определение функциональной активности $\gamma\delta$ T- лимфоцитов

- Взятие периферической крови в гепаринизированные пробирки
- Выделение МПК с помощью центрифугирования в градиенте плотности
- Выделенные МПК помещаются в 96-ти луночный планшет. Часть лунок культивируется только с добавлением среды, другая - с добавлением бактериального антигена (например ЛПС). В лунках отдельного планшета выделенные МПК культивируются с митогеном ФМА (форбол-миристан-ацетат) с иономицином кальция.
- Инкубация обоих планшетов с Брефельдином А, который блокирует транспорт из ЭПР в аппарат Гольджи. (5 часов)
- Пермеабелизация органическими растворителями или детергентами (раствор сапонины, *Triton-X-100*, *Tween-20*) (несколько минут)
- Отмывка, центрифугирование, культивирование мечеными моноклональными антителами на цитокины и маркеры на поверхности мембран: FITC (Pan $\gamma\delta$ T), PE (V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  TCR), PerCP-Cy5.5 (CD3), PE-Cy7 (IL-4), APC (TNF- $\alpha$ ), APC-Cy7 (IFN- $\gamma$ ) (30 мин)
- Отмывка, фиксация параформальдегидом, получение результатов в проточной цитофлуориметрии

Так, было показано, что у ВИЧ-положительных пациентов не только снижено количество  $\gamma\delta$ T- лимфоцитов, но также и способность выработки цитокинов.

# Определение количества $\gamma\delta$ T-лимфоцитов

- Взятие периферической крови в гепаринизированные пробирки
- Выделение МПК с помощью центрифугирования в градиенте плотности
- Культивирование с моноклональными АТ
- Определение методом проточной цитофлуориметрии

В ряде исследований было установлено, что снижение CD3+CD4+ клеток у ВИЧ-инфицированных лиц находится в тесной взаимосвязи с падением количества T-клеток, несущих TCR $\gamma\delta$  рецептор, что подтверждается данными зарубежных исследований о положительной корреляции  $\gamma\delta$ T-клеток с уровнем CD3+CD4+ лимфоцитов. Механизмы количественного и качественного истощения субпопуляции  $\gamma\delta$ T-клеток неизвестны, частично потому, что эти клетки не несут рецептор CD4 и, следовательно, устойчивы к ВИЧ

**Изменение относительного количества  $\gamma\delta$ -клеток памяти**

**Заболевание**

Повышение относительного уровня  $\gamma\delta$ -клеток

Вирусные инфекции:

- ВИЧ
- цитомегаловирус
- вирус Эпштейна-Бар

Бактериальные инфекции:

- туберкулез легких *Mycobacterium*
- легионеллез *Legionella*
- туляриемия *Francisella tularensis*
- сальмонеллез *Salmonella*
- боррелиоз (болезнь Лайма) *Borellia*

Атопический дерматит (у детей)

Болезнь Корна

Болезнь Бехчета

Первичные иммунодефициты

Атопический дерматит (у взрослых)

Понижение относительного уровня  $\gamma\delta$ -клеток

Возрастное снижение относительного уровня  $\gamma\delta$ -клеток

# НК – клетки

- Основные маркёры: CD16 (FcγRIII к IgG), CD56.
- У человека были идентифицированы 2 субпопуляции НК-клеток - CD56<sup>bright</sup> и CD56<sup>dim</sup>
- Большинство CD56<sup>dim</sup> НК-клеток экспрессируют высокий уровень FcγRIII CD16 и перфорины, в то время как CD56<sup>bright</sup> НК-клетки являются CD16<sup>neg/low</sup> и перфориннегативными. CD56<sup>dim</sup> НК-клетки обладают непосредственной цитотоксической активностью, в то время как CD56<sup>bright</sup> НК-клетки приобретают ее только после добавления IL-2.
- CD56<sup>bright</sup> субпопуляция составляет приблизительно 10– 20% от общего количества НК-клеток и преимущественно локализованы в лимфатических узлах и экспрессируют L-селектин и рецепторы хемокинов CCR5 и CCR7.
- CD56<sup>dim</sup> НК-клетки, практически отсутствуют в лимфатических узлах, но составляют 95% НК-клеток крови и 85% НК-клеток селезенки. Они экспрессируют рецепторы для хемокинов CCR4, CXCR1 и CX3CR1
- Основные функции:
  - Лизис опухолевых и инфицированных вирусами клеток
  - Регуляция врожденного и адаптивного иммунных ответов за счет секреции цитокинов (IFN-γ, TNFα и ИЛ-10), ростовых факторов (GM-CSF, G-CSF и ИЛ-3) и хемокинов (CCL3, CCL4, CCL5, XCL1 и CXCL8)

# Оценка цитотоксичности NK-клеток

- Взятие периферической крови в гепаринизированные пробирки
- Выделение моноклеарных клеток на градиенте фикоколлурографина
- Смешивание с культурой клеток K-562, контроль – K-562 в полной среде, инкубация.
- Цитофлуориметрия с использованием двух меток – на живые клетки-мишени и на мертвые клетки
- Процент убитых клеток получается путём вычитания результата контроля из опытного результата

# Оценка выработки цитокинов НК-клетками

- Взятие периферической крови в гепаринизированные пробирки
- Выделение МПК с помощью центрифугирования в градиенте плотности
- Выделение НК-клеток методом иммуномагнитной сепарации
- Культивация на среде РПМИ 1640
- НК-клетки в концентрации 1,5 млн/мл икубируются в 96-луночных иммунологических планшетах в полной питательной среде с цитокинами, IL-2, LPS в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 18 ч.
- Клетки осаждаются, отбираются супернатанты для иммуноферментного анализа,
- Добавляли брефелдин А в концентрации 10 мкг/мл либо моненсин в концентрации 5 мкг/мл и инкубировали клетки дополнительно 4 ч.
- Супернатанты от стимулированных клеток замораживали => *Иммуноферментный анализ продукции IFN-γ*
- Клетки окрашивали флуоресцентномечеными антителами к поверхностным маркерам и проводили их фиксацию 2%-ным раствором параформальдегида.
- Пермеабелизация в растворе PBS, содержащем 1% FCS, 0,02% азида натрия и 1% тритона X-100.
- Клетки окрашиваются флуоресцентномечеными антителами к IFN-γ или TNF-α и анализируется методом проточной цитофлуориметрии. Уровень продукции IFN-γ определяется по доле продуцирующих клеток.

# Методы оценки системы комплемента

1) Определение гемолитической активности комплемента . Для исследования компонентов классического пути активации комплемента определяют его гемолитическую активность. Суть метода заключается в следующем:

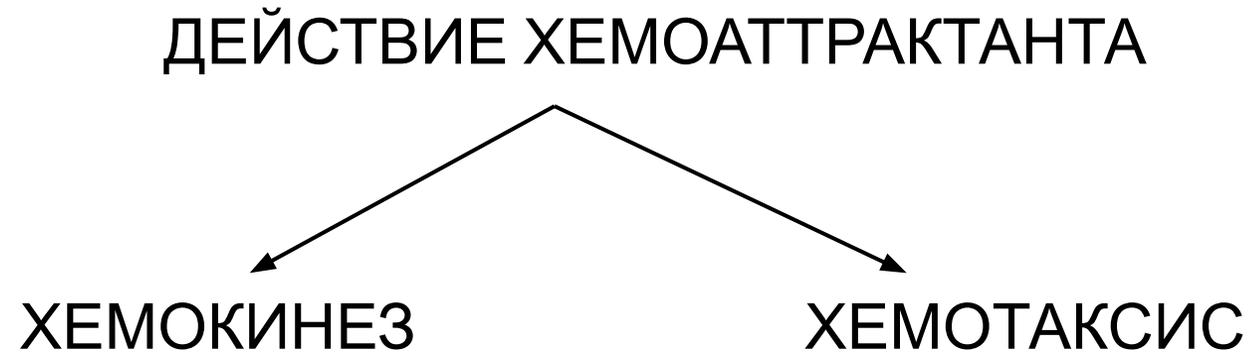
- - разные разведения сыворотки больного и нормальной сыворотки добавляют к эритроцитам барана, покрытым антителами;
- - степень гемолиза оценивают фотометрически по выходу гемоглобина в раствор.
- За единицу гемолитической активности комплемента принимают величину, обратную тому разведению сыворотки, при котором разрушаются 50% эритроцитов.
- Существуют модификации метода, основанные на применении небольших объемов исследуемой сыворотки. Определение гемолитической активности комплемента по 100% гемолизу основано на гемолизе в геле. Суть этого метода заключается в следующем:
  - в геле, содержащем покрытые антителами эритроциты барана, делают лунки;
  - в лунки вносят разные разведения исследуемой и нормальной сывороток;
  - гемолитическую активность комплемента оценивают по диаметру зон гемолиза.
- Активность комплемента зависит от целого ряда факторов, поэтому нарушение правил забора и хранения сыворотки обычно приводит к ошибочным результатам исследования.
- Определение гемолитической активности комплемента позволяет обнаружить недостаточность компонентов комплемента , прежде всего участвующих в образовании мембраноатакующего комплекса.

# Методы оценки системы комплемента

2) Тесты определения ЦИК, используемые в клинической практике, основаны на:

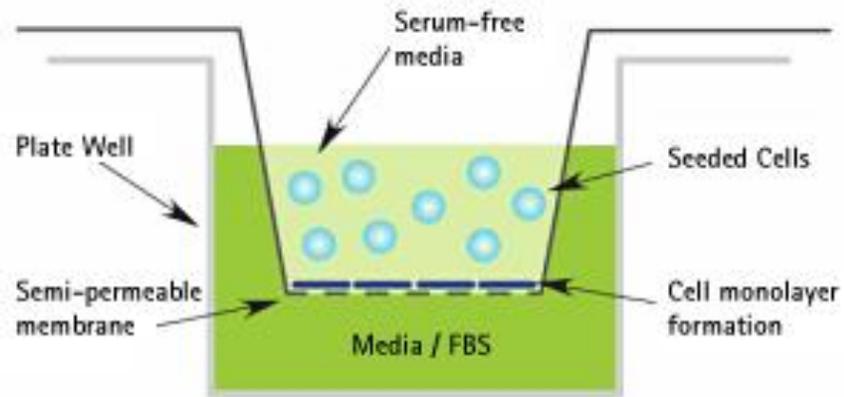
- преципитации ЦИК полиэтиленгликолем 6000 (ПЭГ-6000);
- взаимодействии ЦИК с комплементом (C1q-тест);
- связывании ЦИК с аутоантителами, такими, как моноклональный ревматоидный фактор (mRF-тест)

# Методы определения хемотаксиса

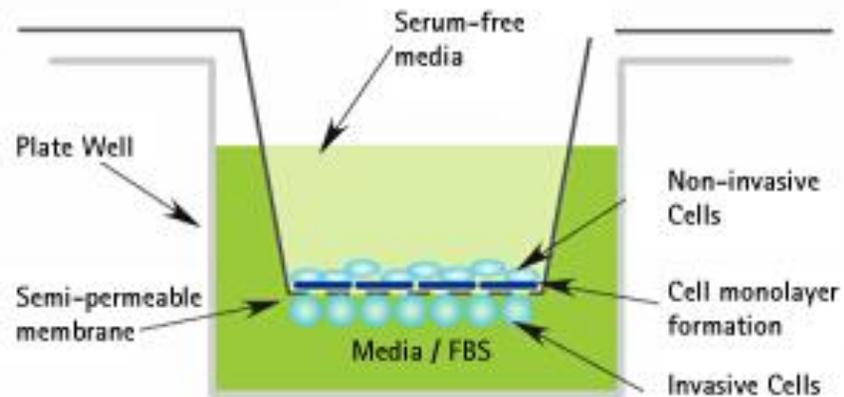


# 1.1.Метод Бойдена

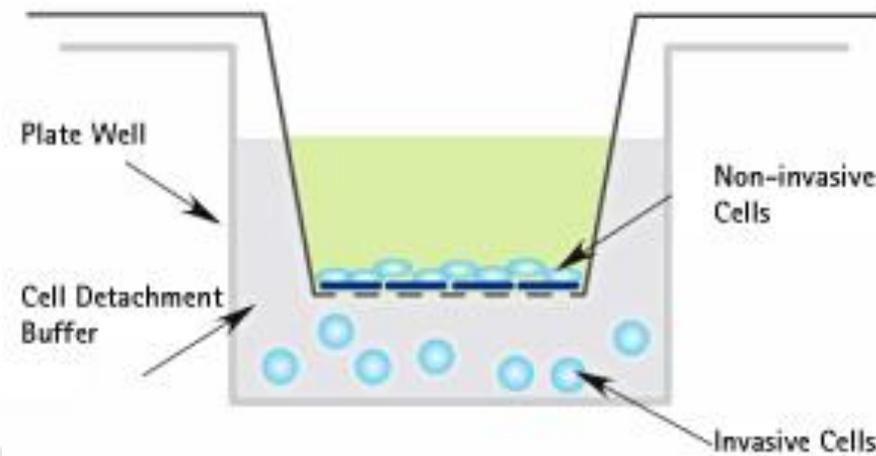
1. Load Cell Suspension into plate well insert



2. Invading cells migrate and attach to bottom brane. Non-invading cells remain above



3. Detach invading cells in cell detachment buffer



4. Lyse cells in Cell Lysis Buffer and detect cell numbers with CyQuant® GR Dye



## 1.2. Трансвелл планшеты



- 24-, 12- или 6-ти луночные планшеты,
- Лунки разделены на две камеры

# Трансвелл планшеты

Суспензия клеток в верхнюю лунку, хемоаттрактант – в нижнюю

Контроль – лунки со средой ( спонтанная миграция )



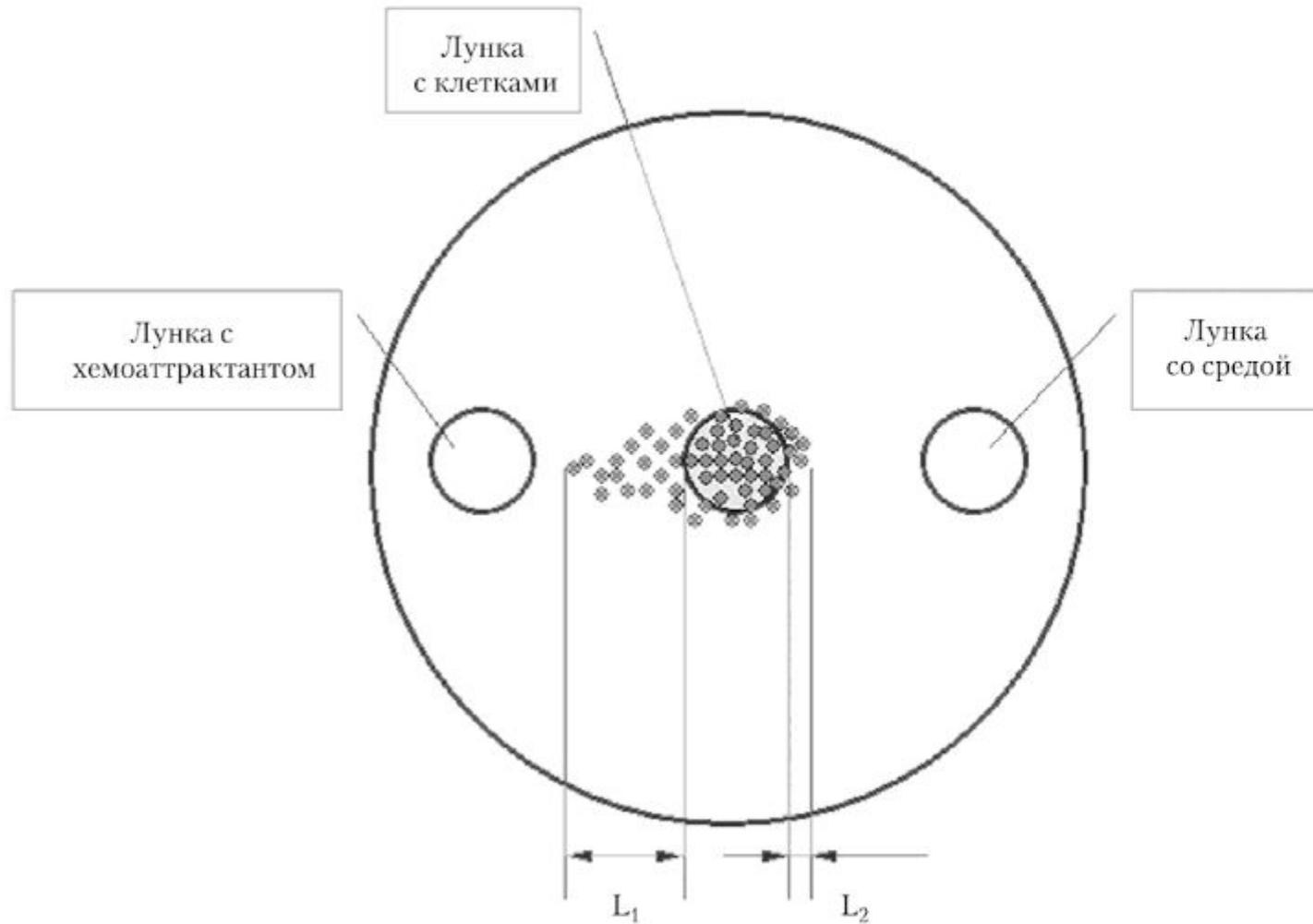
Инкубация : 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> , t= 1-2 ч



Оценка: подсчёт в суспензии или после фиксации с окрашиванием

$$ХИ = \frac{\text{Количество клеток, мигрировавшее в ответ на хемоаттрактант}}{\text{Количество клеток, мигрировавшее в ответ на среду}}$$

# 1.3. Миграция под агарозой



## 2. Определение иммунофенотипа нейтрофилов

Нормативные параметры фенотипа нейтрофилов

	<b>CD16</b>	<b>CD11b</b>	<b>CD18</b>	<b>CD32</b>	<b>CD35</b>
M± ст. отк.	977,5±177,1	220,8±64,9	47,4±17,5	153,3±30,7	46,3±10,7

	<b>CD16</b>	<b>CD11b</b>	<b>CD18</b>	<b>CD32</b>	<b>CD35</b>
№ 05 от 05.11.07	1016	120↓	22,2↓	123	42,6

	<b>CD16</b>	<b>CD11b</b>	<b>CD18</b>	<b>CD32</b>	<b>CD35</b>
АТД 1	2062↑	473↑	103↑	75↓	96↑
АТД 2	1597↑	463↑	105↑	63↓	116↑
Нормативы	977,5± 177,1	220,8± 64,9	47,4± 17,5	153,3± 30,7	46,3± 10,7

### 3. Определение фагоцитарного индекса

Клетки (200млн/мл) + ФИТЦ (0,1 мг/мл) 12ч в карбонатно-бикарбонатном буфере, рН = 9.5, +4 °С. Несвязавшийся ФИТЦ удаляют трёхкратной отмывкой при 1000g.

В лунки 96-ти луночного планшета добавляют взвесь меченного стафилококка и взвешенную лейкоцитарную смесь ( 1 к 10 ).

Инкубация 20 мин при 37 °С. Отмывка ФСБ с 0.02% ЭДТА. Фиксация ФСБ + 2% параформальдегида + 0.02% ЭДТА. Хранение до 2 суток при T = +4 °С.

# Определение фагоцитарного индекса

Фагоцитарный индекс лейкоцитов периферической крови доноров при поглощении стафилококка ( $M \pm \sigma$ )

	Нейтрофилы	Моноциты
Без сыворотки	22,7±5,4	29,5±6,8
Опсонизация IgG	66,8±7,1	60,1±9,7
Опсонизация пуловой сывороткой	90,6±4,5	80,2±6,2

## 4. Определение фагоцитарного числа

Основные этапы реакции те же, что и при определении фагоцитарного индекса.

$$\text{ФЧ} = \frac{(\text{GeoMean фагоцитировавших кл} - \text{GeoMean кл})}{(\text{GeoMeanst} + \text{fitc} - \text{GeoMeanst})}$$

# 5. Определение внутриклеточной гибели микроорганизмов в лейкоцитах

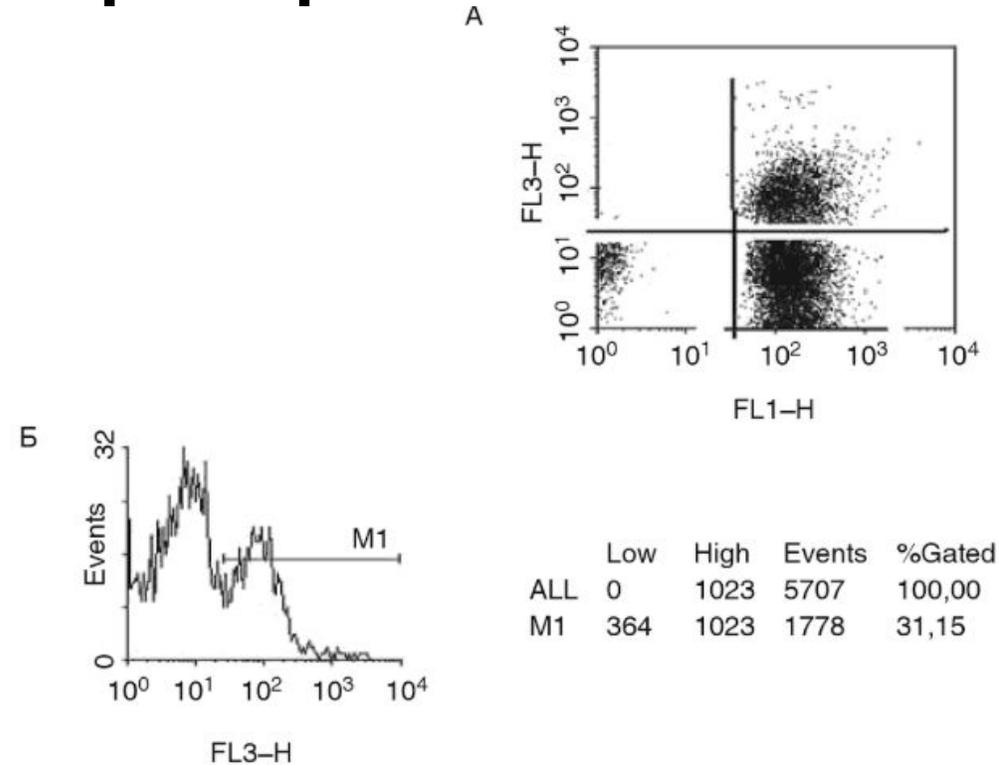
Микроскопический метод (наиболее показательно с *Candida*)

Бактериологический метод (для разрушения лейкоцитов – дистиллированная вода)

$$\frac{(\text{КОЕ}_{\text{контр}} - \text{КОЕ}_{\text{опыт}})}{\text{КОЕ}_{\text{контр}}} \times 100\%,$$

+ Радиометрический метод

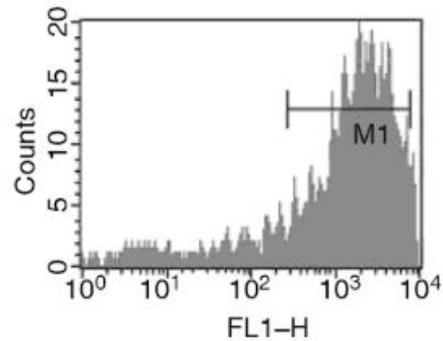
# 6. Определение внутриклеточной гибели микроорганизмов в лейкоцитах



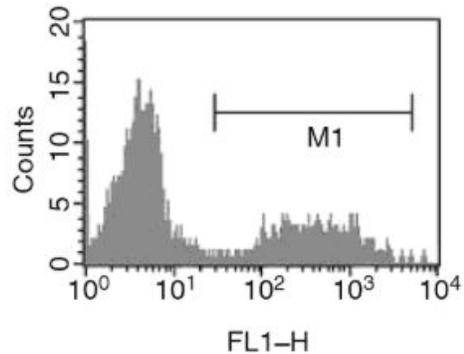
**Рис. 1-1.** Цитофлюорограммы измерения внутриклеточной бактерицидной активности фагоцитов по отношению к *St. aureus*, опсонизированным пуловой сывороткой. А — Dot Plot FL1/FL3, отображающий облако убитых PI-FITC+ (правый верхний квадрант) и живых PI-FITC+(правый нижний квадрант) бактерий. Б — гистограмма по FL3, отображающая распределение живых и убитых (M1) ФИТЦ-меченных бактерий.

# 7. Определение переваривающей способности лейкоцитов

$$\text{ИПС} = \frac{\text{GeoMean 20мин} - \text{GeoMean 3ч} \times 100\%}{\text{GeoMean 20мин}}$$



Marker	Events	%Gated	Geo Mean
ALL	2882	100,00	1381,32
M1	2462	85,43	2178,20



Marker	Events	%Gated	Geo Mean
ALL	212	100,00	16,87
M1	66	31,13	408,07

## 8. Оценка дегрануляции нейтрофилов

Опыт	CD63, MFI			CD66b, MFI		
	Спонтанная экспрессия	ФМЛФ	ФМА	Спонтанная экспрессия	ФМЛФ	ФМА
Доноры (M±σ)	41±29	312±215	100±46	92±43	276±153	247±139

# Использованная литература

- Бердюгина О.В., Ершова А.В. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ТУБЕРКУЛЕМАХ ЛЕГКОГО // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 1.
- Gamma/Delta T-Cell Functional Responses Differ after Pathogenic Human Immunodeficiency Virus and Nonpathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infections. David A. Kosub, Ginger Lehrman, Jeffrey M. Milush, Dejiang Zhou, Elizabeth Chacko, Amanda Leone, Shari Gordon, Guido Silvestri, James G. Else, Philip Keiser, Mamta K. Jain, Donald L. Sodora. *Journal of Virology* Jan 2008, 82 (3) 1155-1165;
- Zurochka A.V., Gavrilova T.V., Shestakova E.V., Kvyatkovskaya S.V., Mirkina T.V., Chereshev V.A. EVALUATION OF INTERDEPENDENCE BETWEEN  $\gamma\delta$ T-CELL LEVELS AND CD3+CD4+ T-LYMPHOCYTE CONTENTS IN HIV-INFECTED PATIENTS. *Medical Immunology (Russia)*. 2010;12(4-5):425-428. (In Russ.)
- Л.В.Ковальчук, М.В.Хореева и др. Рецепторы врожденного иммунитета: подходы к количественной и функциональной оценке TLR человека. *Иммунопатология и клиническая иммунология* 2008, 223-227.
- Ковальчук, Л. В., Хорева, М. В., Никонова, А. С., Константинова, Е. В., Юдин, А. А., & Николаева, М. А. (2010). Изучение системы Toll-подобных рецепторов врожденного иммунитета в острый период после инфаркта миокарда. *Вестник Российского государственного медицинского университета*, (1), 19-24.
- БАХУС Галина Олеговна НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЛАЗЕРНОЙ ЦИТОМЕТРИИ 14.00.36-Аллергология и иммунология АВТОРЕФЕРАТ диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук
-