

Клеточные механизмы иммунного ответа

Главный комплекс ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ

HLA - human leucocyte antigens - антигены тканевой совместимости. (синоним: MHC - major histocompatibility complex - главный комплекс гистосовместимости)

Комплекс генов, расположенных на коротком плече 6 пары хромосом человека.

Гены основных локусов имеют свое представительство на поверхности клетки в виде антигенов HLA

Классы HLA

Выделяют два основных класса генов главного комплекса гистосовместимости:

I класс включает гены локусов A, B, C;

II класс - D-область (сублокусы DR, DP, DQ)

Названия генов и антигенов HLA состоят из одной или нескольких букв и цифр, например A3, B45, DR15, DQ4. Буква обозначает ген, а цифра аллель этого гена. Гены HLA обладают высоким полиморфизмом.

Классы HLA

- HLA I класса – экспрессированы на всех ядродержащих клетках человека. Обеспечивают взаимодействие между любыми клетками
- HLA II класса – гены, отвечающие за реализацию и силу иммунного ответа. Антигены HLA II класса представлены на АПК, В-лимфоцитах

МНС I класса

- Экспрессия на всех ядерных клетках
- Распознаются ТкР цитотоксических Т-лимфоцитов
- CD8 – рецептор к МНС I
- Основные подклассы HLA-A, B, C
- Презентация вирусных и цитоплазматических антигенов

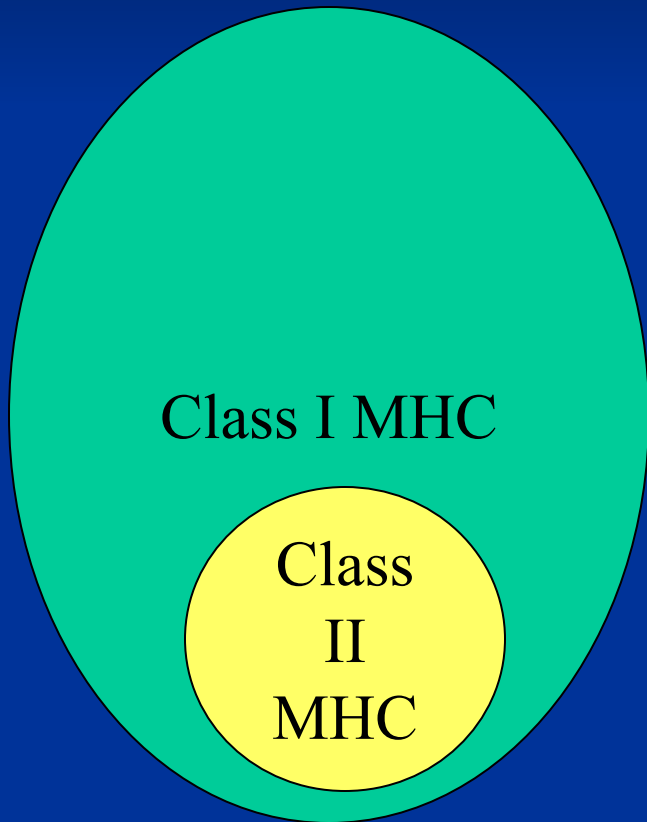
МНС II класса

- Экспрессия на некоторых клетках, в основном на антиген-презентирующих клетках
- распознаются ТкР Т-хелперов
- CD4 – рецептор к МНС II
- Основные подклассы HLA-DR, DP, DQ
- Презентация бактериальных антигенов

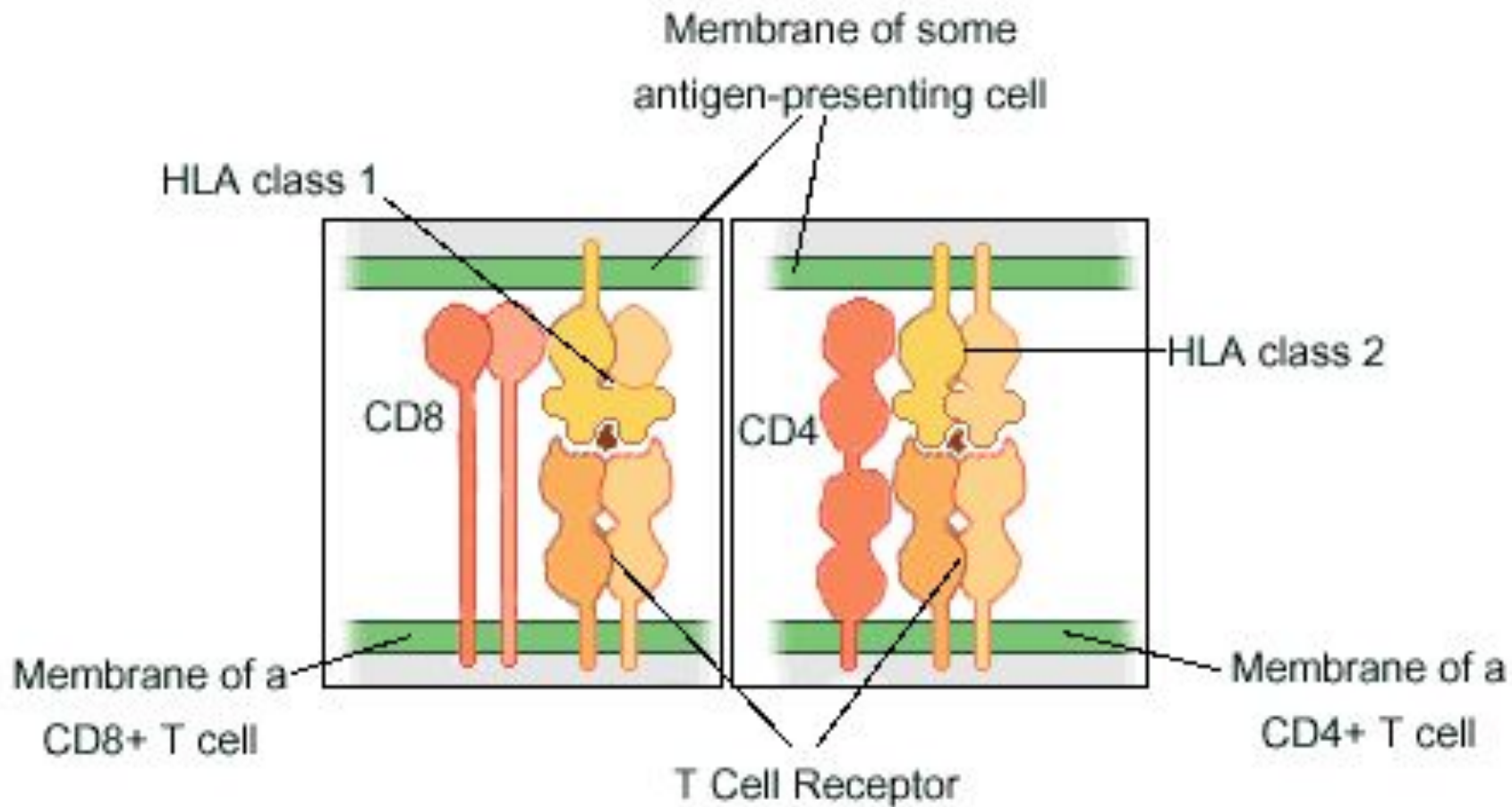
Экспрессия молекул МНС I и МНС II

Все ядерные клетки
экспрессируют МНС I

Клетки
экспрессирующие МНС
II, также экспрессируют
и МНС I



Классы HLA

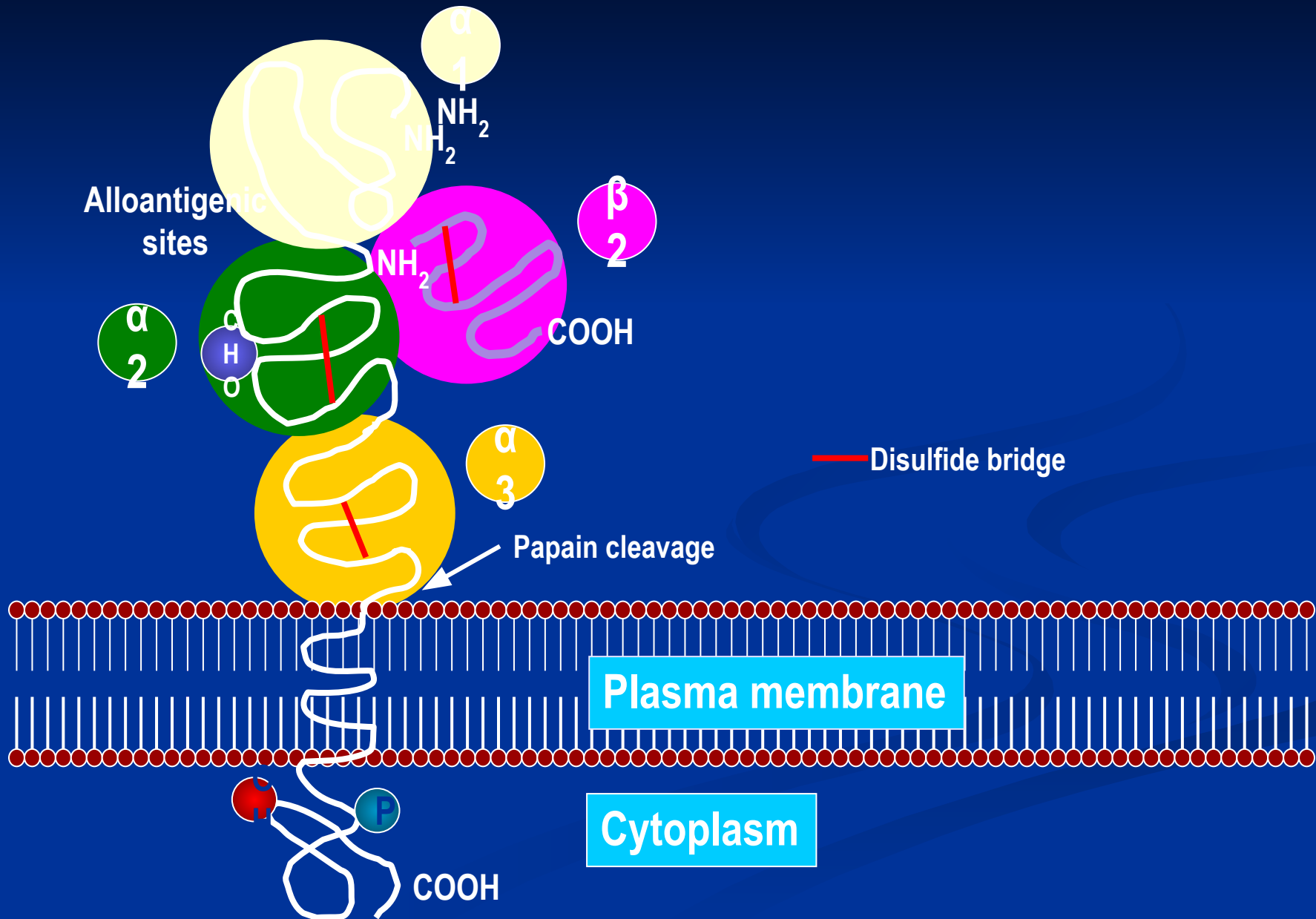


Функциональная активность Т- и В-лимфоцитов, киллерная активность НК, поглотительная активность фагоцитов, уровень Ig являются наследственными факторами и находятся в ассоциативной связи с HLA-антигенами.

Структура HLA I класса

Антигены I класса являются мембранными гликопротеинами, состоящими из двух частей: гликозилированной полипептидной тяжелой цепи с молекулярной массой 44000 и β 2-микроглобулина с молекулярной массой 12000.

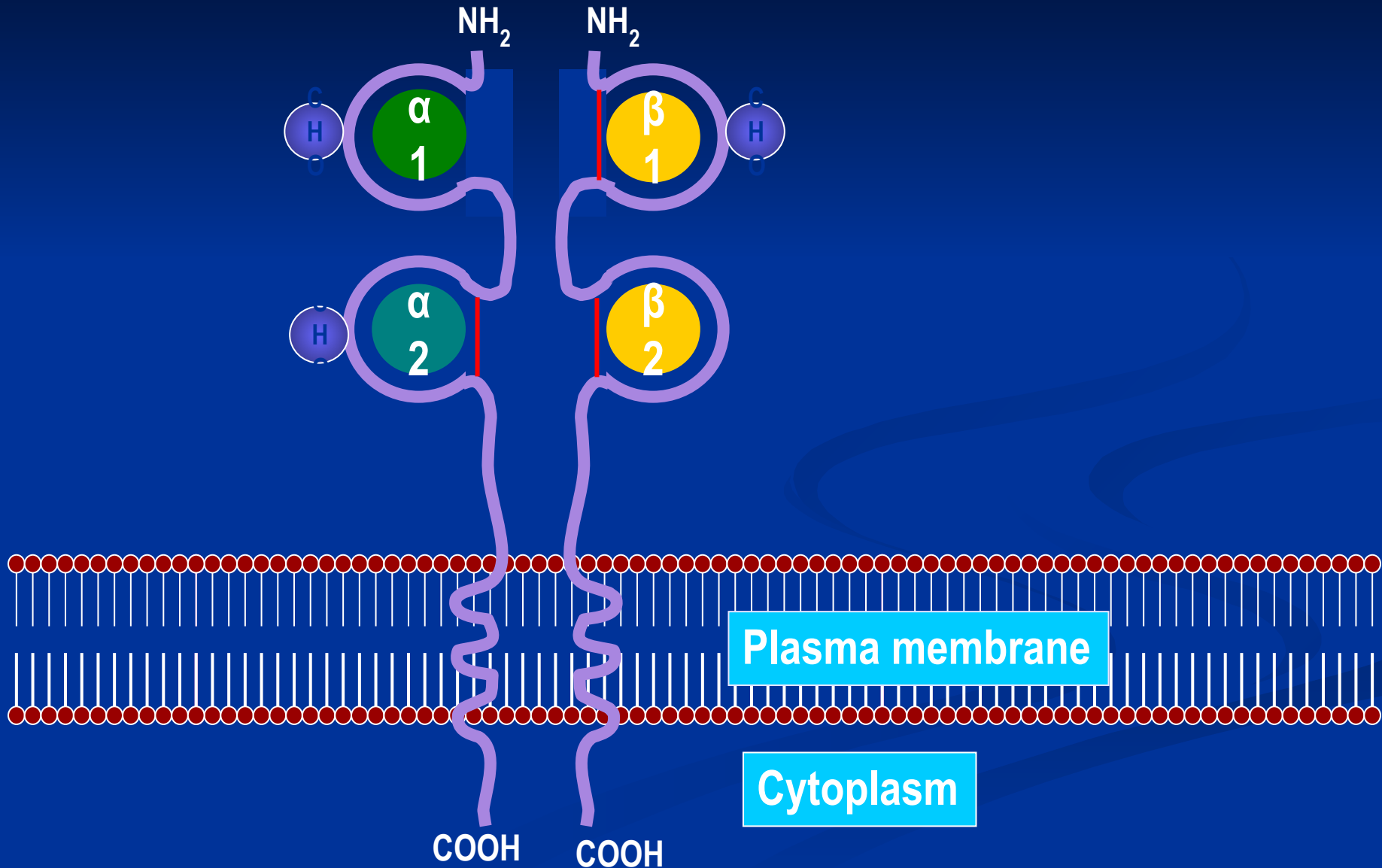
Структура HLA I класса



Структура HLA II класса

Молекулы HLA II класса также являются гликопротеинами, но состоят из двух нековалентно соединенных цепей α и β с молекулярной массой 34000 и 29000 соответственно.

Структура HLA II класса



Клиническая значимость HLA

Трансплантология

Гены HLA связаны с предрасположенностью к определенным заболеваниям.

Описано более 200 заболеваний с повышенной экспрессией того или иного антигена.

Нормальное развитие плода обусловлено степенью антигенного различия родителей.

Клиническая значимость HLA

Disease	Alleles	Frequency in		Relative Risk
		Patients	Control	
Ankylosing spondylitis	B27	90	9	87.4
Reiter's disease (syndrome)	B27	79	9	37.0
Acute anterior uveitis	B27	52	9	10.4
Psoriasis vulgaris	Cw6	87	33	13.3
Dermatitis herpetiformis	DR3	85	26	15.4
Celiac Disease	DR3	79	26	10.8
Insulin-dependent diabetes mellitus	DR3/4	91	57	7.9

Определение антигенов HLA

- Серологические методы.
- Молекулярно-генетические методы.
- Клеточные методы.

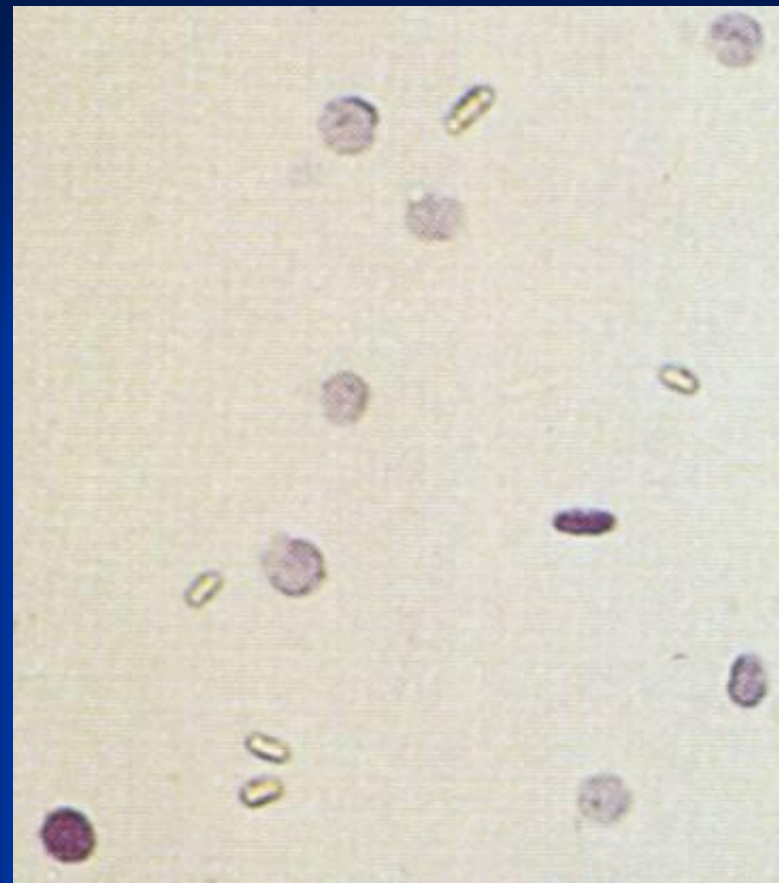
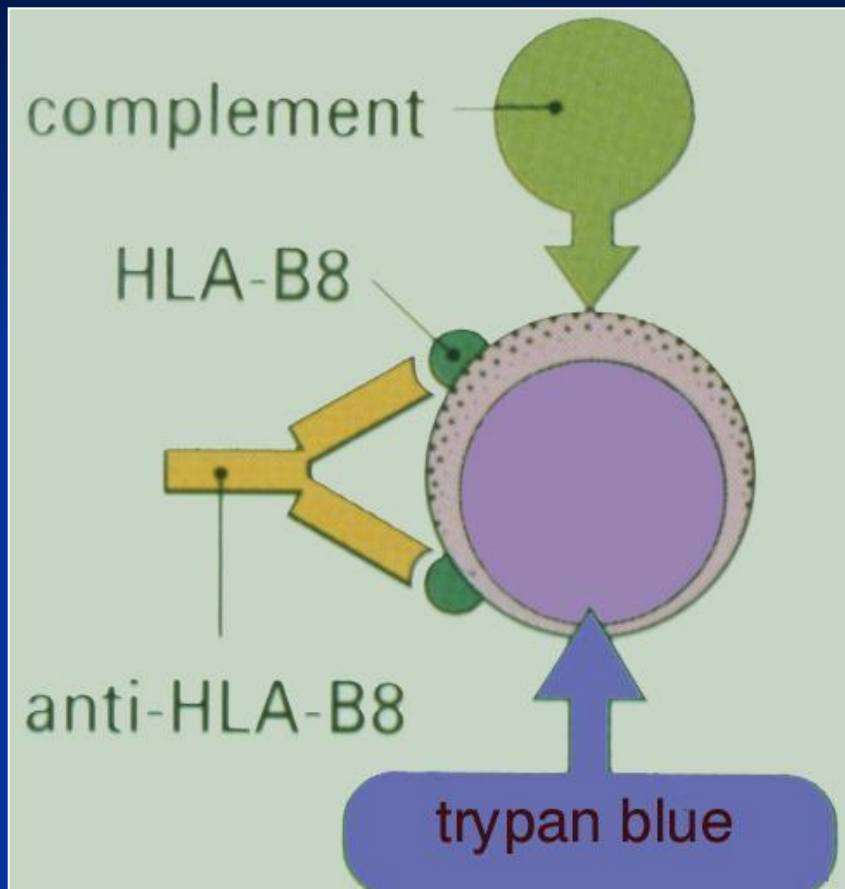
Определение антигенов HLA

Серологические методы.

Основной серологический метод типирования антигенов HLA — лимфоцитотоксический тест.

- 1) к сывороткам против разных антигенов HLA добавляют по 2000 исследуемых лимфоцитов;
- 2) после инкубации добавляют комплемент (его источником может служить кроличья сыворотка);
- 3) лимфоциты, несущие антиген, против которого направлена сыворотка, под действием комплемента разрушаются;
- 4) затем к лимфоцитам добавляют краситель, который окрашивает только живые клетки. Результат оценивают по относительному числу погибших лимфоцитов.

Лимфоцитотоксический тест



Недостатки серологических методов

- Для типирования антигенов класса I необходимо не менее 15 мл, а для типирования антигенов класса II — не менее 30 мл крови.
- Жизнеспособность выделенных лимфоцитов должна составлять не менее 80%.
- Загрязнение, длительное и неправильное хранение приводят к снижению качества сывороток и комплемента, используемых для исследования.
- Получение диагностических сывороток — трудоемкий и дорогостоящий процесс. Особенно трудно получить сыворотки к редким антигенам HLA. Наименее доступны сыворотки к антигенам HLA класса II, особенно к антигенам HLA-DP.

Молекулярно-генетические методы

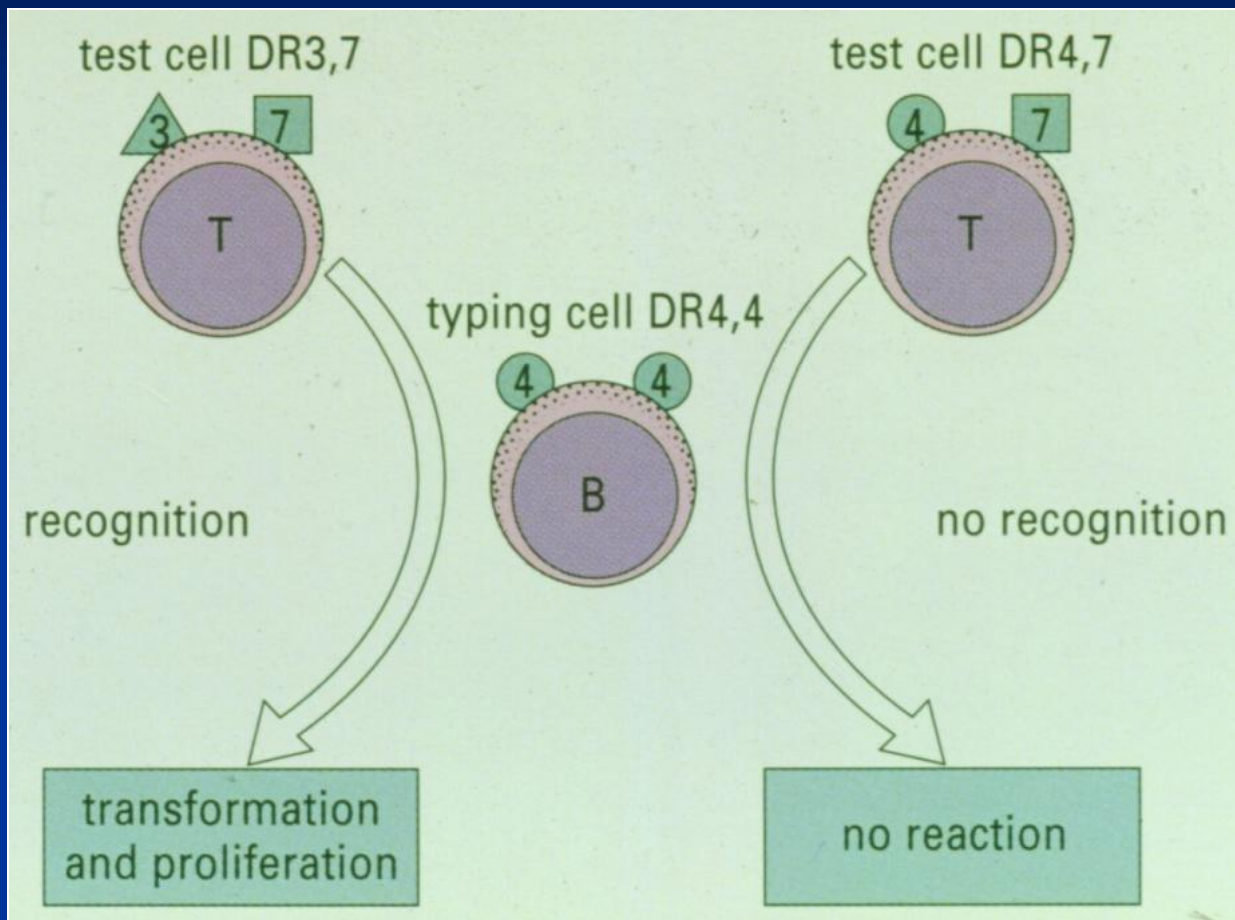
- Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.
- Определение специфических олигонуклеотидных последовательностей.
- ПЦР

Клеточные методы

Смешанная культура лимфоцитов.

- 1) смешивают исследуемые лимфоциты и лимфоциты с известным гаплотипом;
- 2) инкубация с радиоактивной меткой - 3H-тимидина ;
- 3) оценка результатов проводится аналогично РБТЛ

Смешанная культура лимфоцитов.



Недостатки клеточных методов

- Большие затраты времени (около недели).
- Плохая воспроизводимость.
- Очень мало доноров гомозиготных клеток.

Популяции лимфоцитов

T-лимфоциты

T-лимфоциты

Тимус

T-хелперы, Th0
(наивные)

T цитотоксические

Контакт с
антигеном

Th1

Th2

Т-лимфоциты

Th0

АПК, НК-клетки

Тучные клетки,
тромбоциты, Th2

IL-12,
IL-18,

IL-21, IFN- γ

IL-4

Th1

Th2

Цитокины

Цитокины – небольшие белки (8-80 кДа), действующие аутокринно или паракринно.

- Интерлейкины
- Интерфероны
- Колониестимулирующие факторы
- Факторы некроза опухолей
- Факторы роста
- Хемокины

Т-цитотоксические

- Поверхностный маркер – CD3 (сигнальный комплекс, связанный с TкР), CD8 (рецептор к МНС I)
- Происхождение – из клеток-предшественников в тимусе
- Основные медиаторы – IL-2, TNF- α , IFN- γ
- Роль в иммунном ответе – уничтожение вирус-инфицированных клеток

Th0-лимфоциты

- Поверхностный маркер – CD3, CD4 (рецептор к МНС II)
- Происхождение – из клеток-предшественников в тимусе
- Основные медиаторы – IL-2, IL-4, IFN- γ
- Роль в иммунном ответе – первичное распознавание антигена и превращение в Th1 или Th2

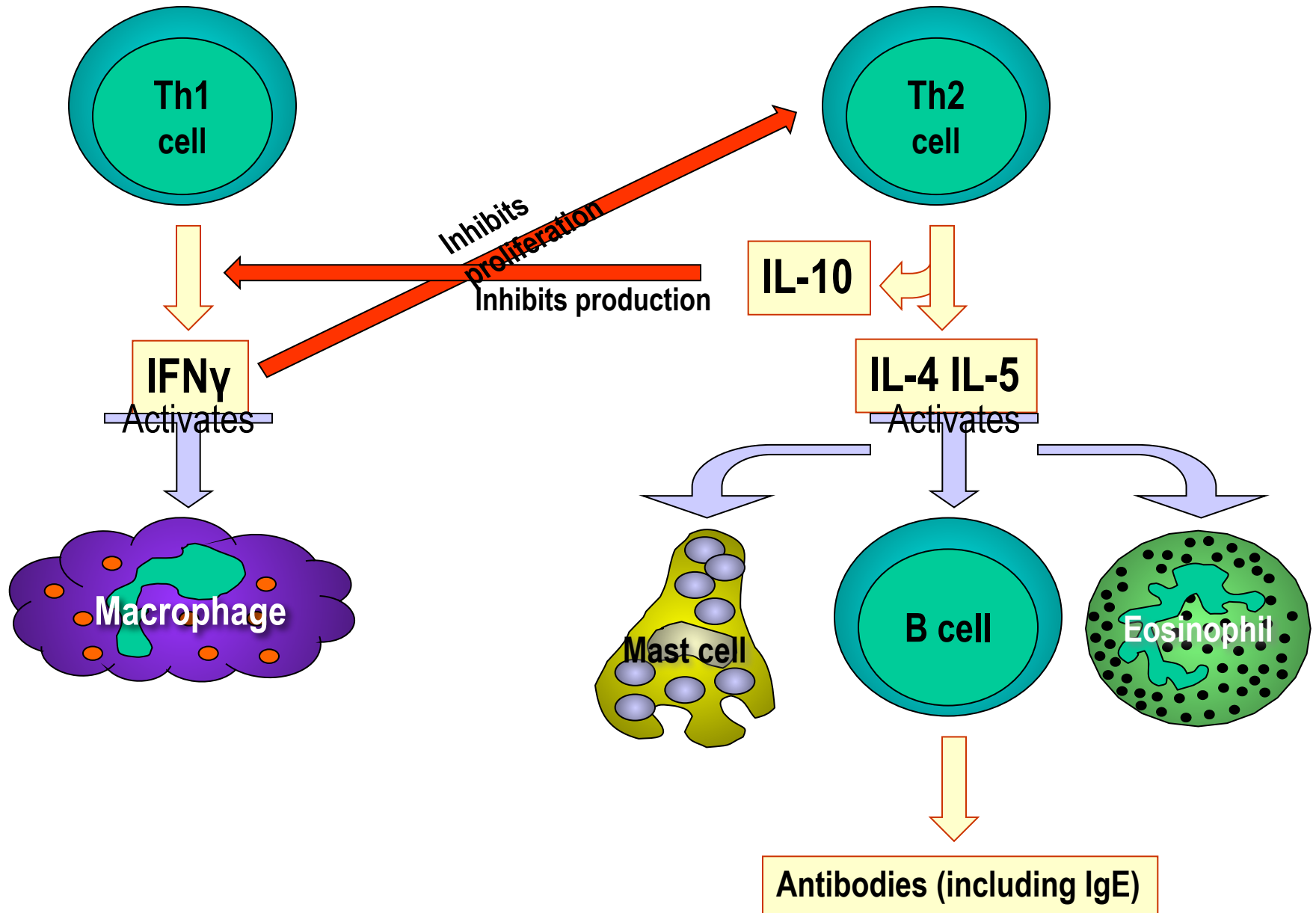
Th1-лимфоциты

- Поверхностный маркер – CD4, LAG-3 (антиген суперсемейства иммуноглобулин-подобных молекул)
- Происхождение – из Th0
- Основные медиаторы – IL-2, TNF- α , IFN- γ
- Роль в иммунном ответе – стимуляция макрофагов при хроническом воспалении (реакции ГЗТ), торможение функций Th2

Th2-лимфоциты

- Поверхностный маркер – CD4, CD30 (семейство рецепторов для TNF- α)
- Происхождение – из Th0
- Основные медиаторы – IL-4, IL-5, IL-6, IL-10
- Роль в иммунном ответе – стимуляция В-лимфоцитов и секреции Ig (в т.ч. IgE), торможение функций Th1

Functions of Th1 and Th2 Cells



В-лимфоциты

- CD19, CD21 (субъединицы В-клеточного рецептора), CD20 (образование Ca^{2+} -каналов)
- Две популяции В1 (CD5+) и В2 (CD5-)
- В1 – появляются до рождения, секретируют преимущественно IgM, локализуются в лимфоидных скоплениях слизистых оболочек и кожи
- В2 – появляются после рождения, являются главной популяцией В-лимфоцитов в периферических лимфоидных органах

НК-лимфоциты

- Фенотип – CD3- CD16+ CD56+ CD94+
- CD16 – рецептор к Fc, CD56 – молекула адгезии нервных клеток, CD94 – связывание с МНС I
- Роль в иммунном ответе – распознают клетки, у которых отсутствует экспрессия молекулы МНС I, антителозависимая цитотоксичность

Иммунный ответ

Периферические лимфоидные органы являются фильтрами, барьерами, где происходит захват антигена, его расщепление и распознавание.

Лимфатические узлы

- Фильтрация лимфы и тканевой жидкости
- Т-клетки 60-75%, В-клетки – 15-20% всех лимфоцитов
- Преимущественно, клеточный иммунный ответ
- Гуморальный – преобладают IgM и IgG

Селезенка

- Фильтрация крови
- Т-клетки 45-60%, В-клетки – 35-45% всех лимфоцитов
- Клеточный иммунный ответ = гуморальный иммунный ответ
- Гуморальный – преобладают IgM и IgG

MALT

- Лимфоидные скопления по ходу слизистых оболочек
- Т-клетки 50-70%, В-клетки – 25-40% всех лимфоцитов
- Преимущественно, гуморальный иммунный ответ
- Гуморальный – преобладают IgA и IgE

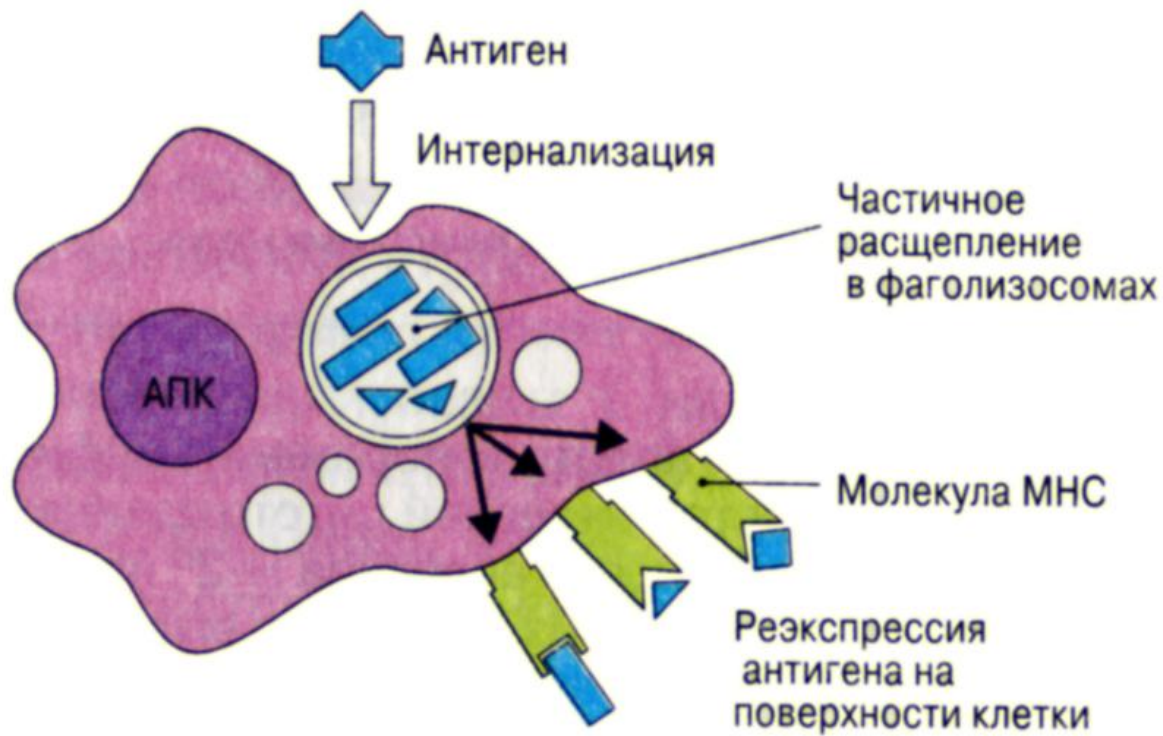
Антиген-презентирующие клетки

- Макрофаги
- Дендритные клетки
- В-лимфоциты

Презентация антигена

- Поглощение антигена – фагоцитоз, пиноцитоз, макропиноцитоз
- Расщепление антигена на короткие пептидные фрагменты (процессинг антигена)
- Предъявление антигенных фрагментов в ассоциации с МНС Т-лимфоцитам
- Экспрессия дополнительных молекул активации Т-лимфоцитов и секреция цитокинов

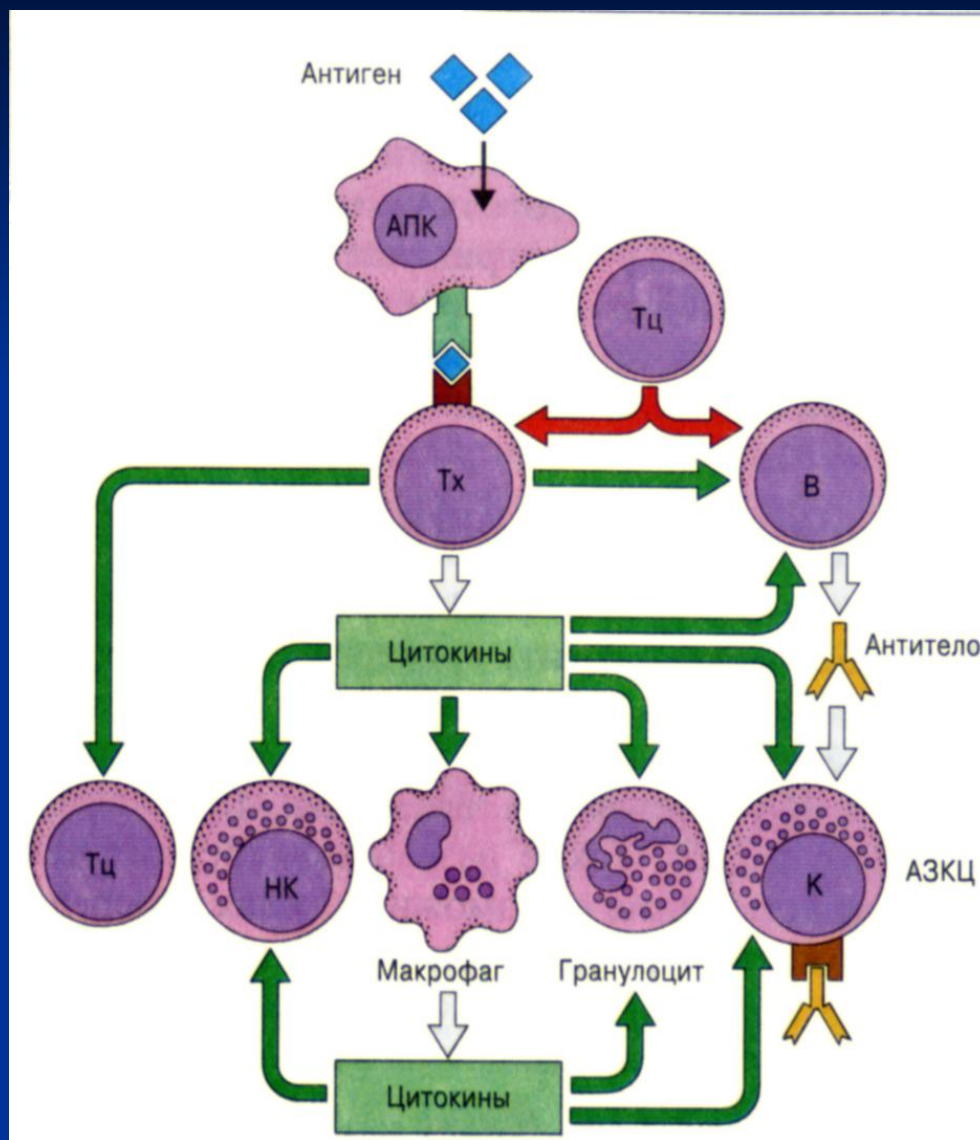
Презентация антигена



Эффекторные механизмы

- Цитотоксическое действие Т-клеток CD8+ или NK-лимфоцитов
- Активация макрофагов, регулируемая Th1
- Синтез антител, стимулируемый Th2

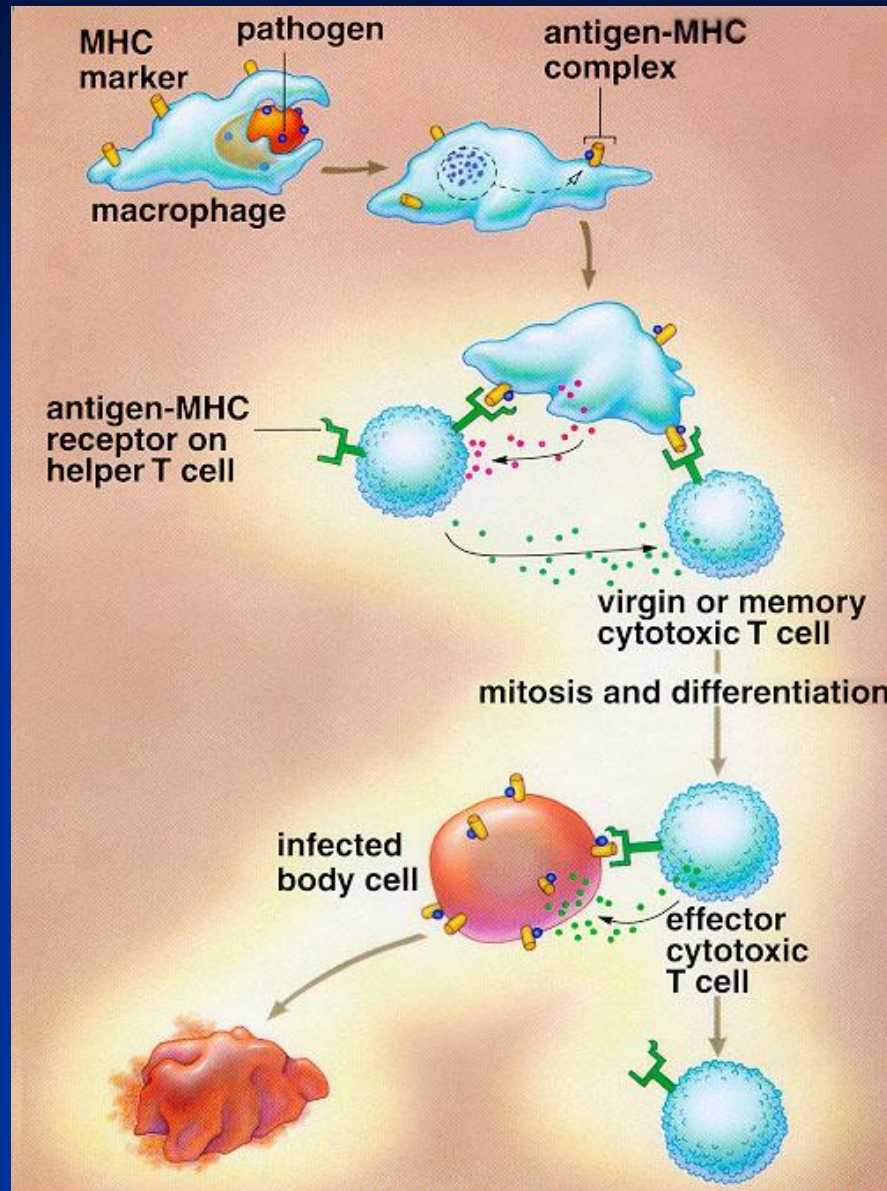
Эффекторные механизмы



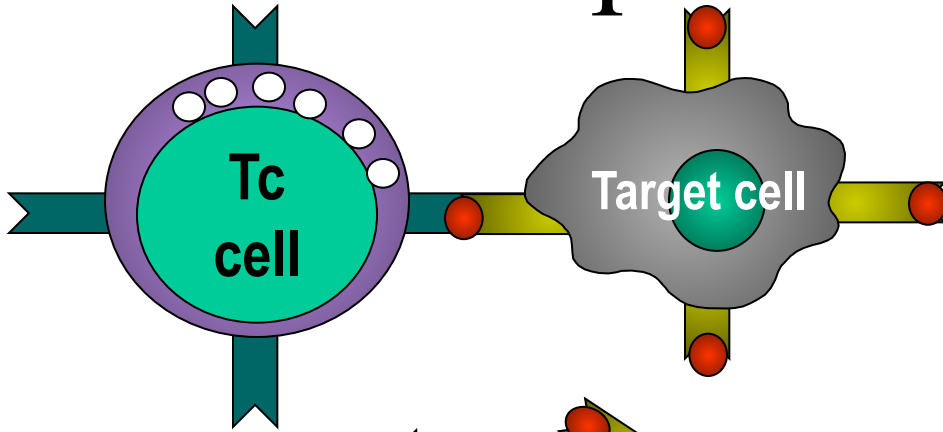
Цитотоксичность Т- и НК-лимфоцитов

- Внутриклеточно локализованные возбудители, в основном вирусы
- CD8+, НК-клетки, иногда клетки миелоидного ряда
- Презентация через МНС I (для CD8)
- Секреция IL-2, TNF- α , IFN- γ
- Результат – лизис инфицированной клетки (ферментативное повреждение – перфорин, гранзимы; либо передача сигнала к апоптозу при непосредственном контакте или через цитокины)

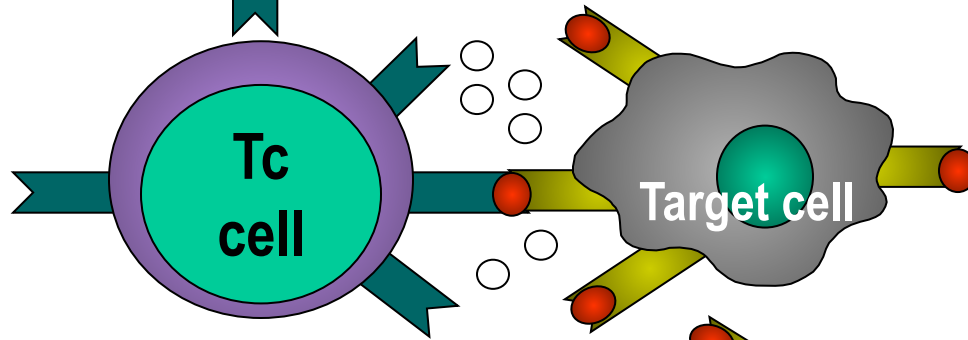
Клеточный иммунный ответ



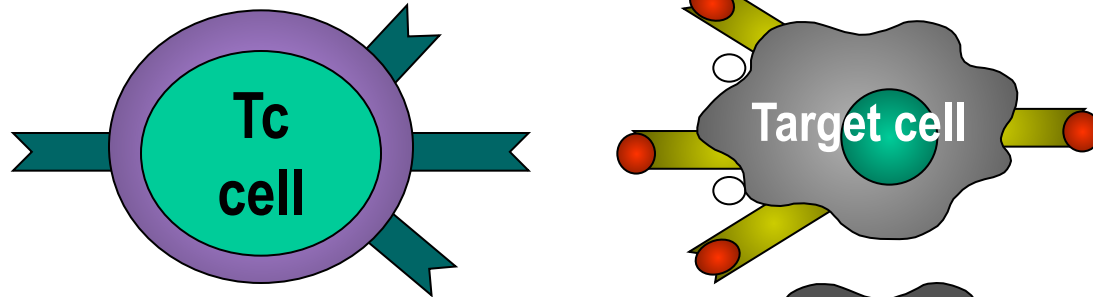
Steps in Tc Killing



1. Tc recognizes antigen on target cell



2. A lethal hit is delivered by the Tc using agents such as perforin or granzyme B



3. The Tc detaches from the target cell



4. Target cell dies by apoptosis

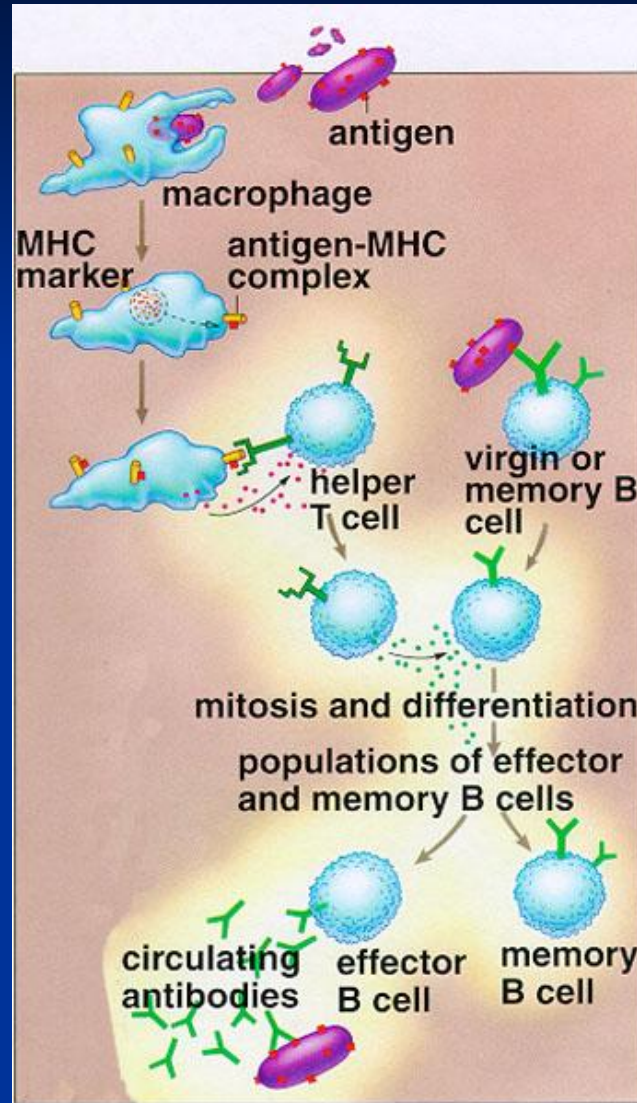
Хроническое воспаление (реакция ГЗТ)

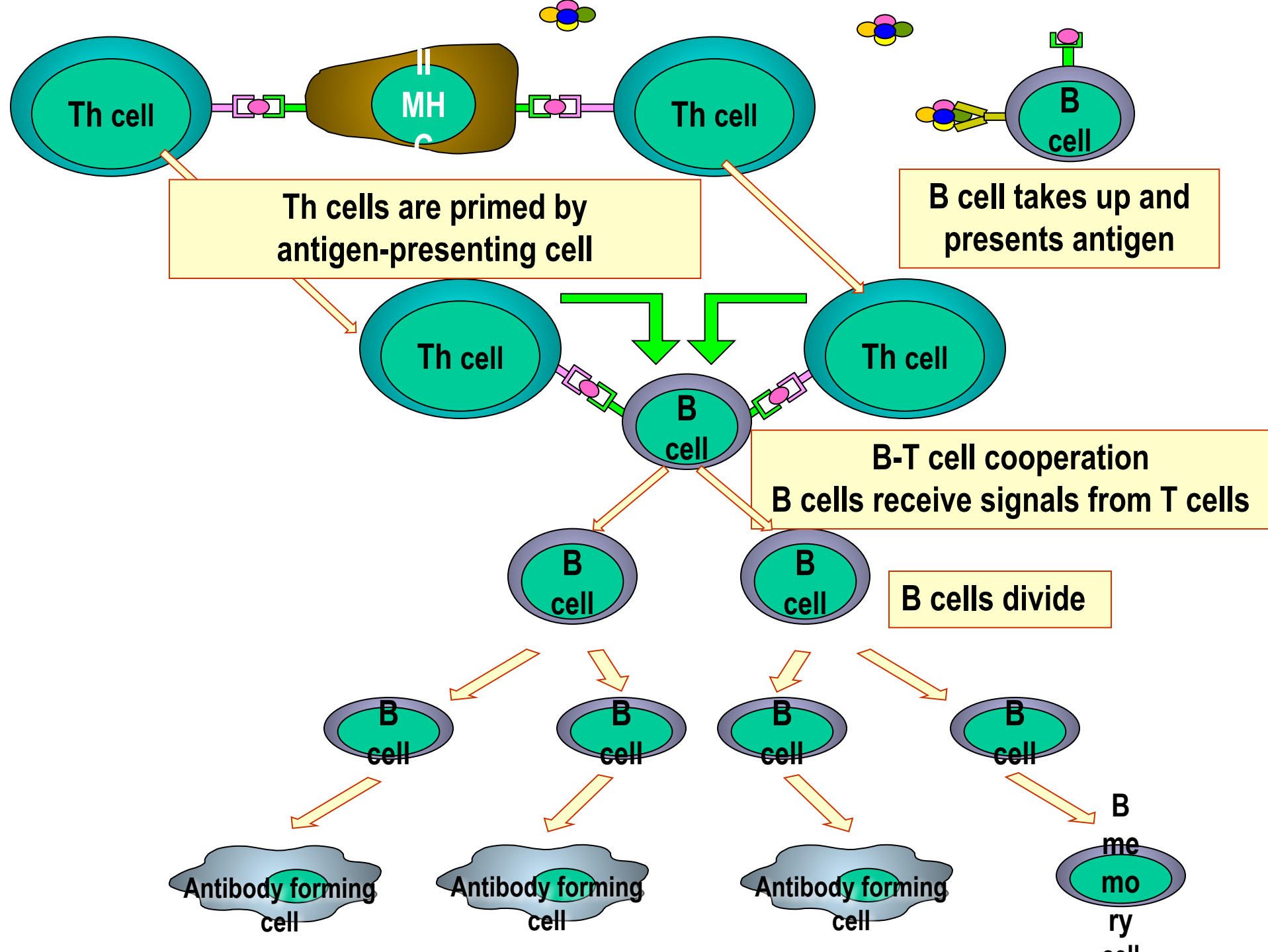
- Микроорганизмы, опухолевые клетки
- Макрофаги, CD4+ (Th0 → Th1)
- Презентация через МНС II
- Секреция IL-2, TNF- α , IFN- γ
- Результат – переваривание антигена в гранулеме либо ее осумковывание и кальцификация

Гуморальный иммунный ответ

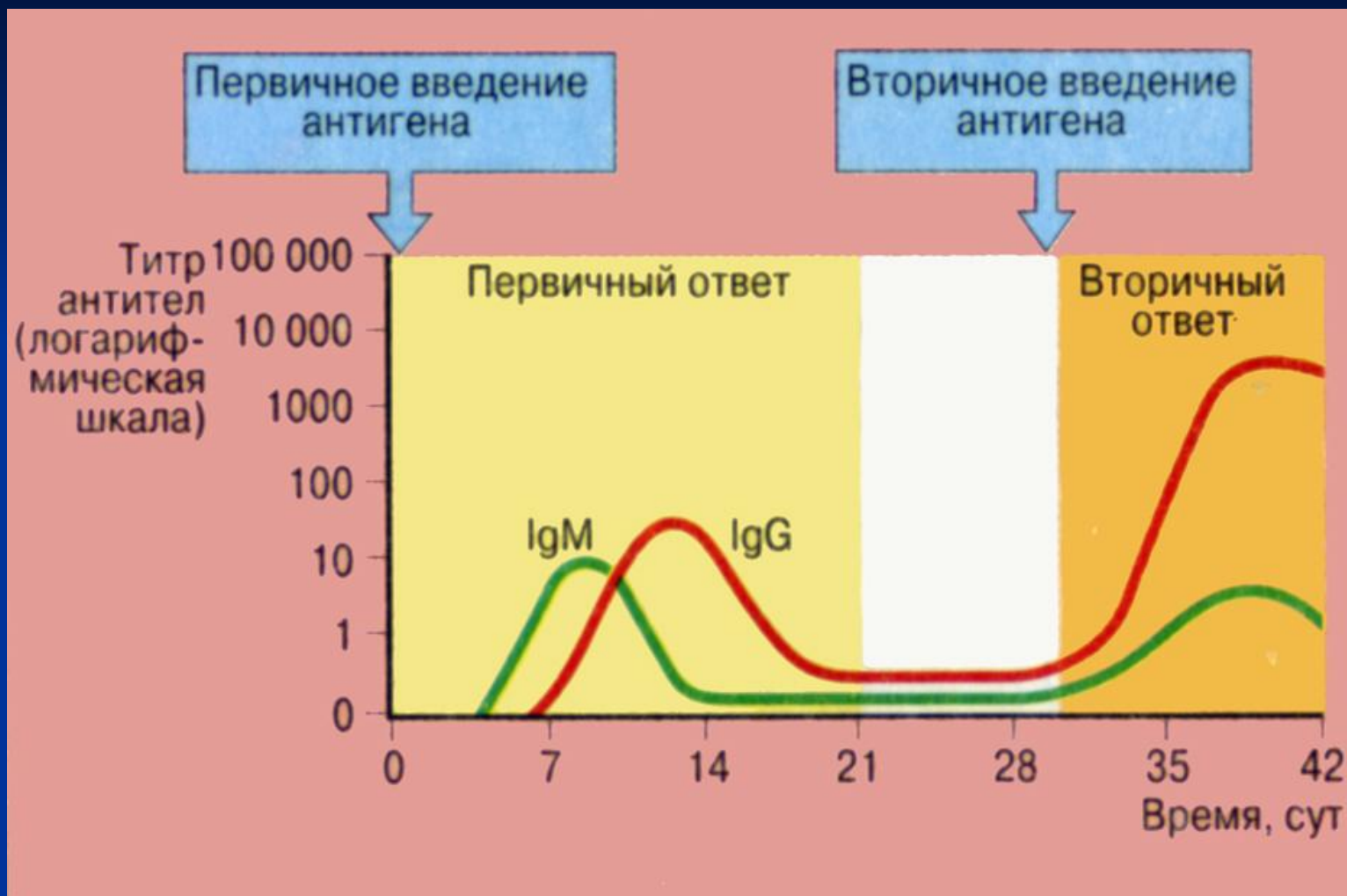
- Т-зависимые, Т-независимые антигены
- АПК, CD4+ (Th0 → Th2),
В-лимфоциты → плазматические клетки
- Презентация через МНС II
- Секреция IL-4, IL-5, IL-6, IL-10
- Результат – связывание антител с бактериями, вирусами, токсинами, их лизис и фагоцитоз

Гуморальный иммунный ответ





Гуморальный иммунный ответ



Формирование иммунологической памяти

- Срок жизни – месяцы, годы.
- CD8+, CD4+ Th1, CD4+ Th2, В-клетки
- Предактивированное состояние
- Высокоаффинные антитела

Методы исследования клеточного иммунитета

Реакция розеткообразования

Т-лимфоциты (Е-РОК) – образование розеток с эритроцитами барана

Примерно соответствует CD2+ (рецептор для LFA-3, молекула адгезии)

Теofilлинрезистентные – Th, CD4+

Теofilлинчувствительные – CD8+

В-лимфоциты (М-РОК) – образуют розетки с эритроцитами мыши

Реакция бласттрансформации

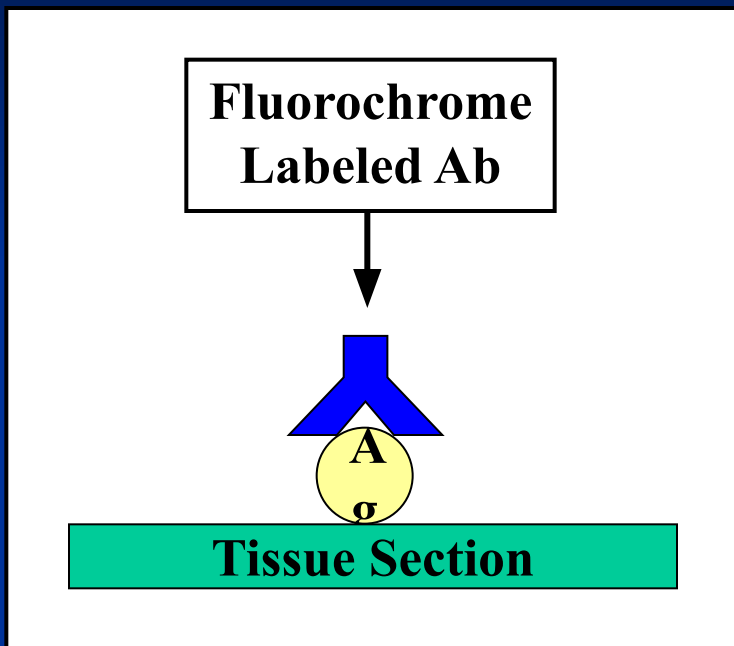
Активация лимфоцитов под воздействием митогенов (ФГА для Т-лимфоцитов, митоген лаконоса для В-лимфоцитов) или специфических антигенов.

Наиболее распространен вариант с включением меченного тимидина

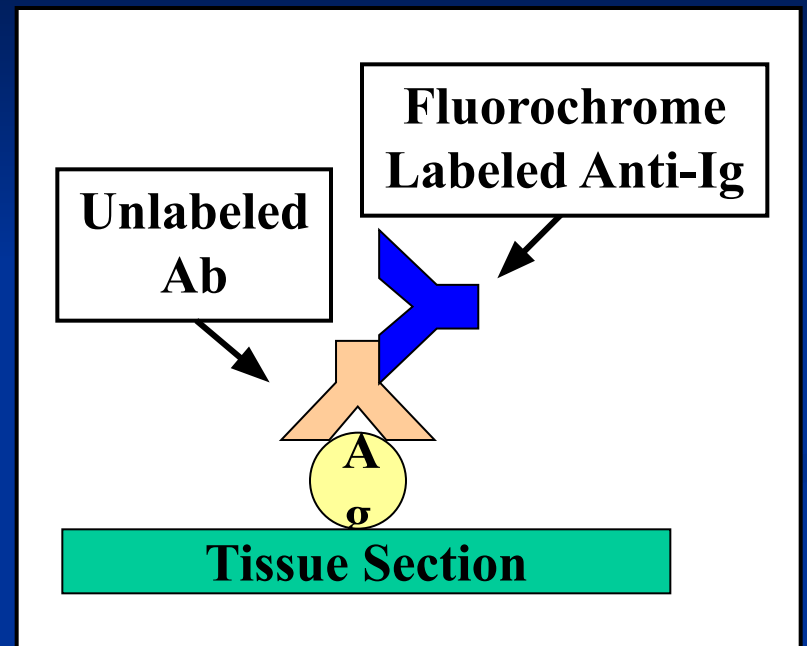
Реакция торможения миграции лейкоцитов

Выявление факторов торможения, секретлируемых активированными лимфоцитами – либо фактора торможения миграции макрофагов, либо фактора торможения миграции лейкоцитов, после контакта с антигеном или митогенной стимуляции.

Иммунофлюоресценция

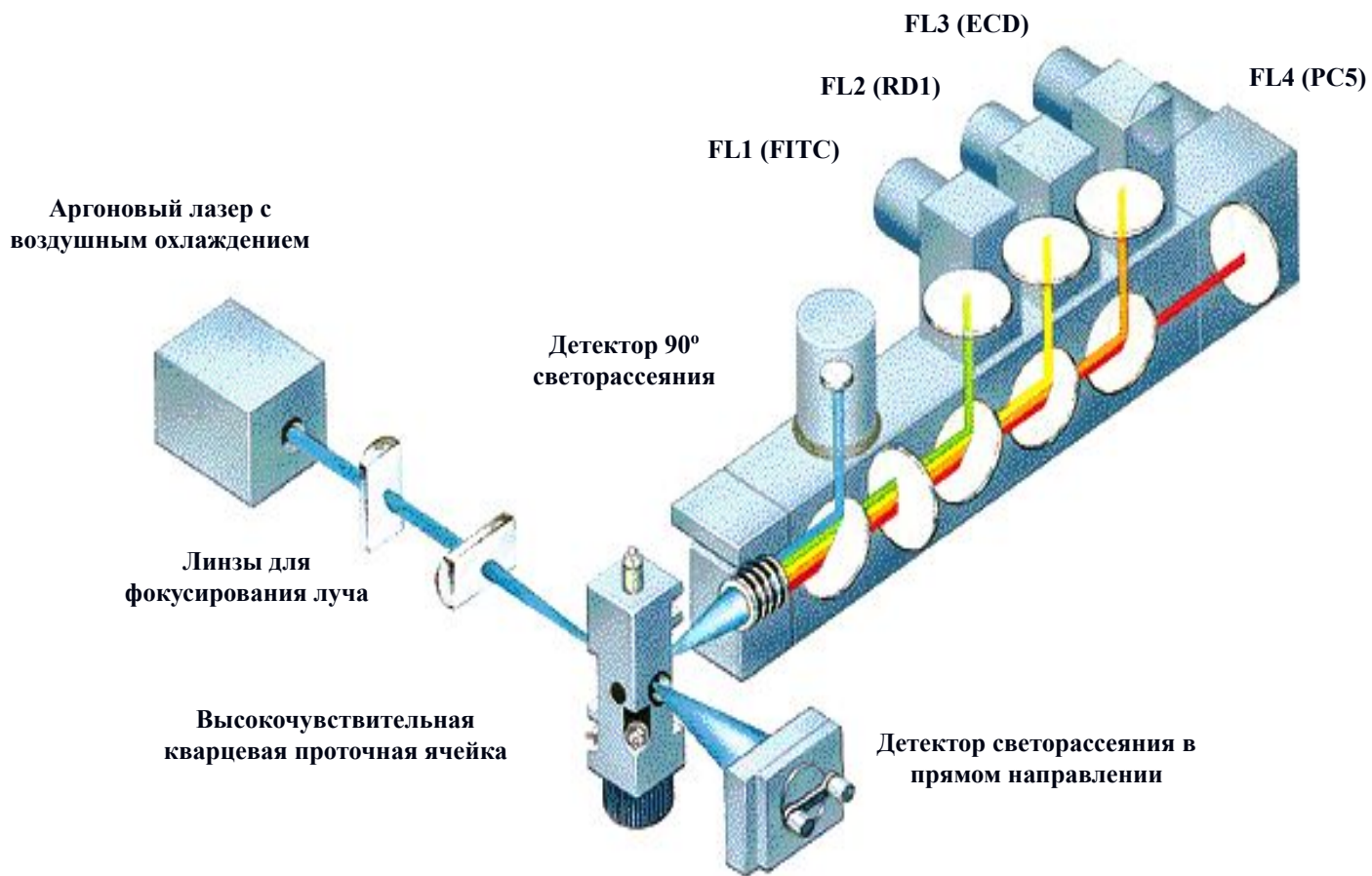


Прямая



Непрямая

Проточная цитофлюорометрия

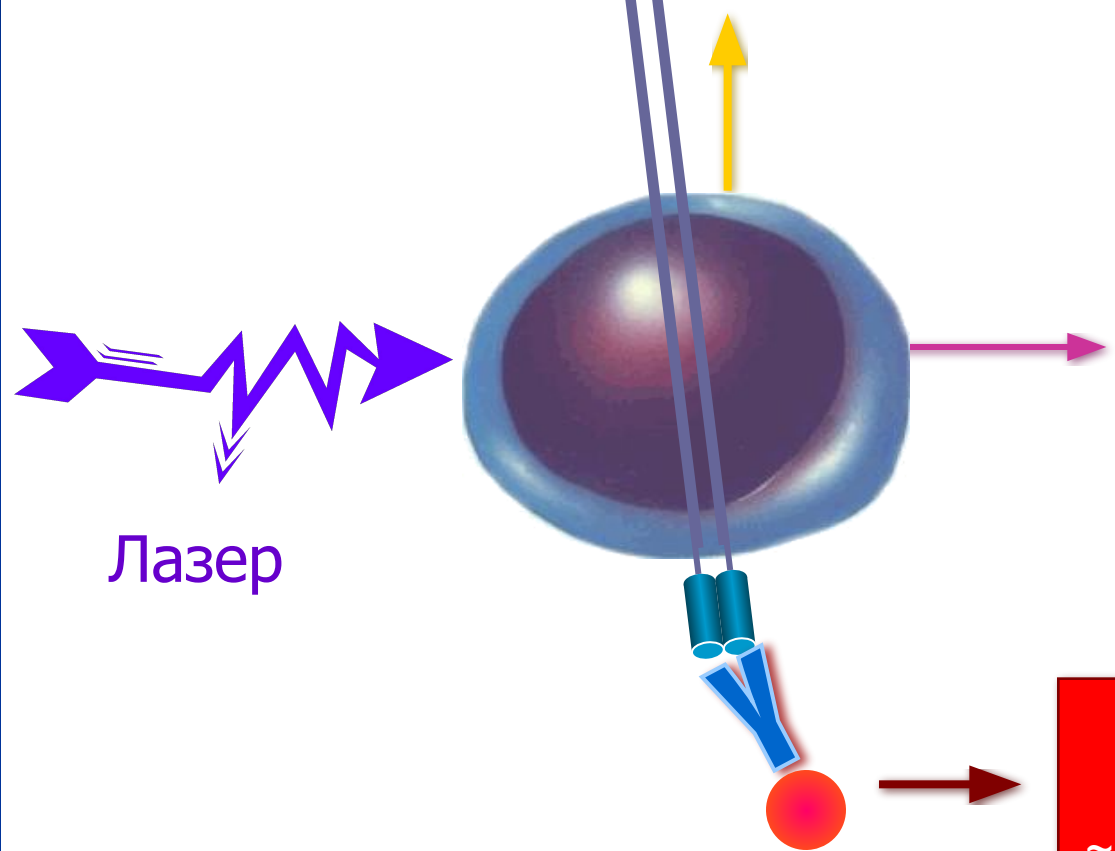


Проточная цитофлюорометрия

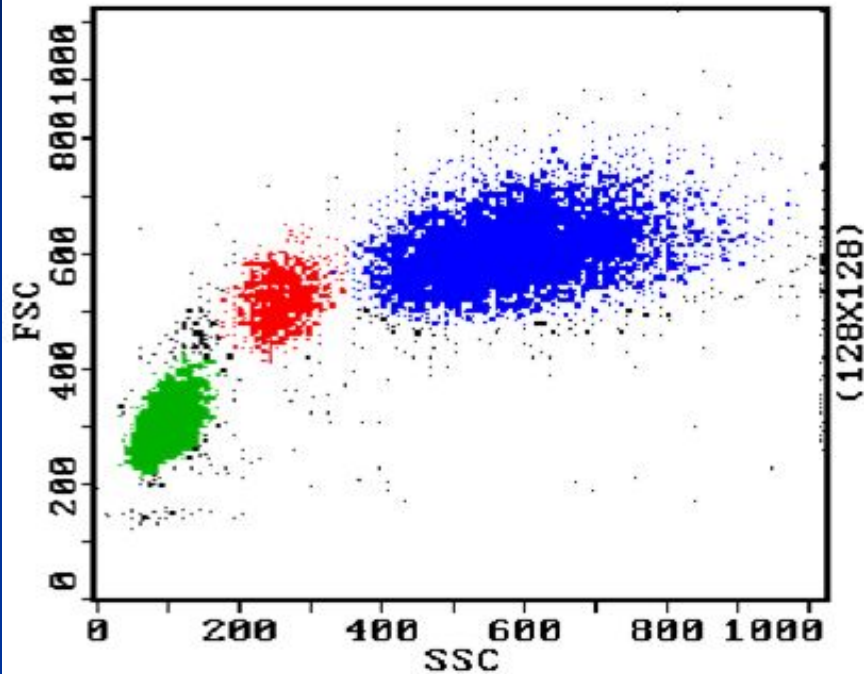
Side Scatter (SSC)
90° deflection
~ структура

Forward Scatter (FSC)
< 10° deflection
~ размер

Интенсивность
флюоресценции
~ непрозрачность антигена



Проточная цитофлюорометрия



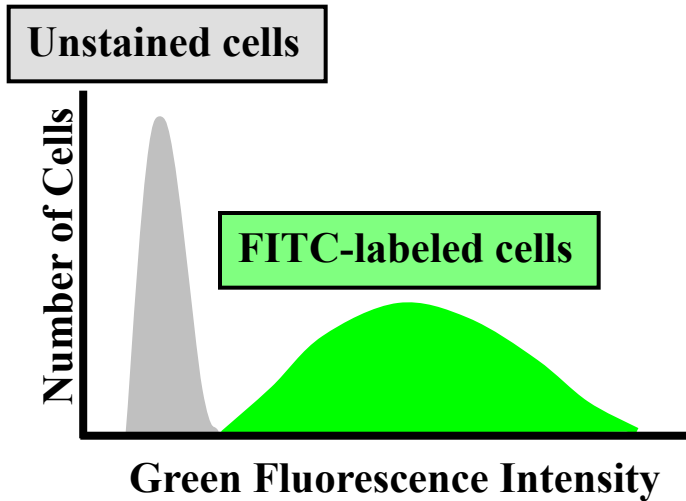
Lymphocytes

Monocytes

Granulocytes

Проточная цитофлюорометрия

One Parameter Histogram



Two Parameter Histogram

