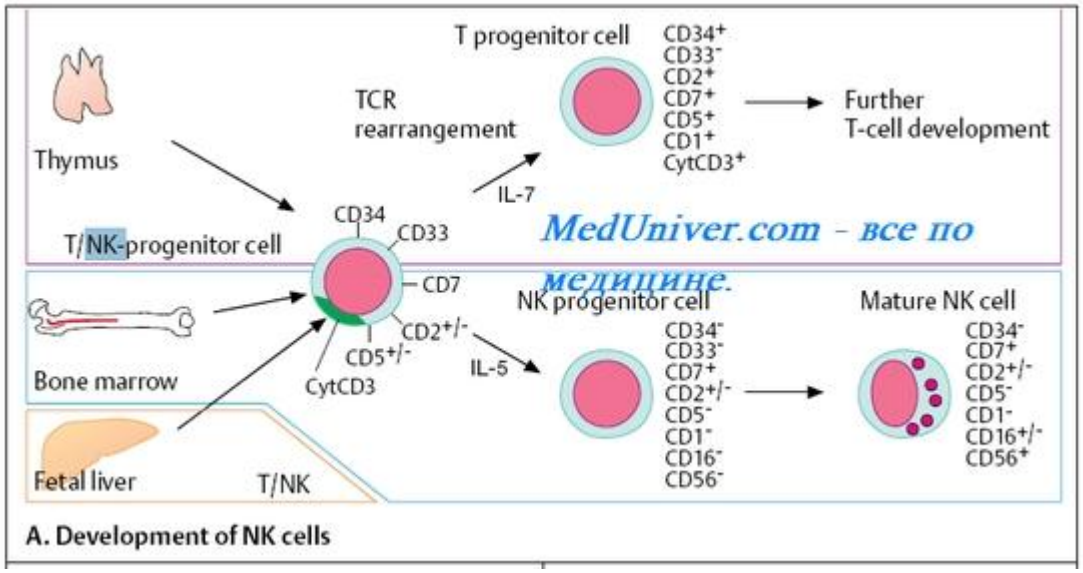
# NK-клетки

- большие гранулярные лимфоциты, обладающие цитотоксичностью противопухолевых клеток и клеток, зараженных вирусами. В настоящее время NK-клетки рассматривают как отдельный класс лимфоцитов. NK выполняют цитотоксические и цитокин-продуцирующие функции. NK являются одним из важнейших компонентов клеточного врождённого иммунитета.

# Характеристика

- Задача- выявлять и уничтожать собственные клетки организма, в которых что-то нарушилось.
- Составляют 5% лимфоцитов периферической крови
- Фенотип: CD3-CD16+CD56+CD94+ и гаметное (неперестроенное) расположение генов.



MedUniver.com - все по медицине.

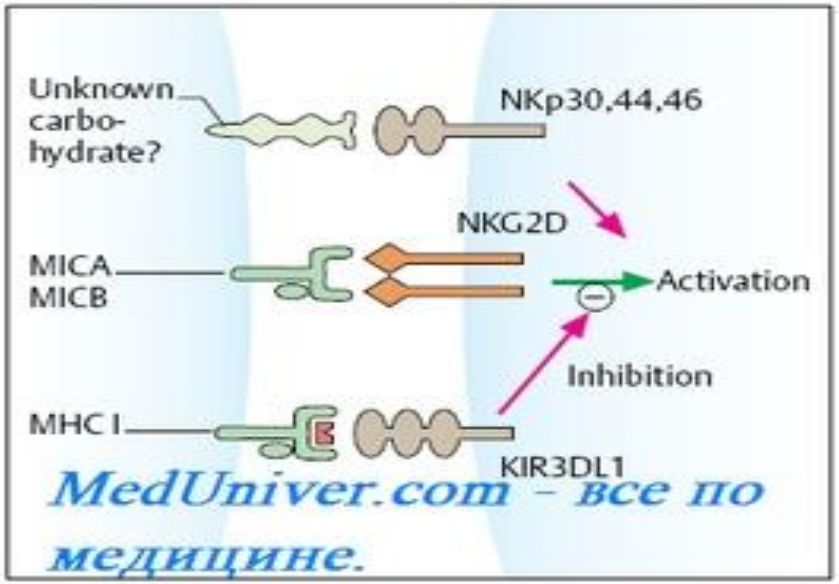
A. Development of NK cells

# Маркёры

- NK-клетки не имеют основных маркёров Т- или В-лимфоцитов (поэтому их также называют нулевые лимфоциты), но экспрессируют дифференцировочные CD2, CD56 и CD16 (рецептор Fc-фрагмента АТ) Аг. В отличие от цитотоксических лимфоцитов, способность NK-клеток к цитолизу связана со самостоятельным распознаванием «своё-чужое» на поверхности мишени.

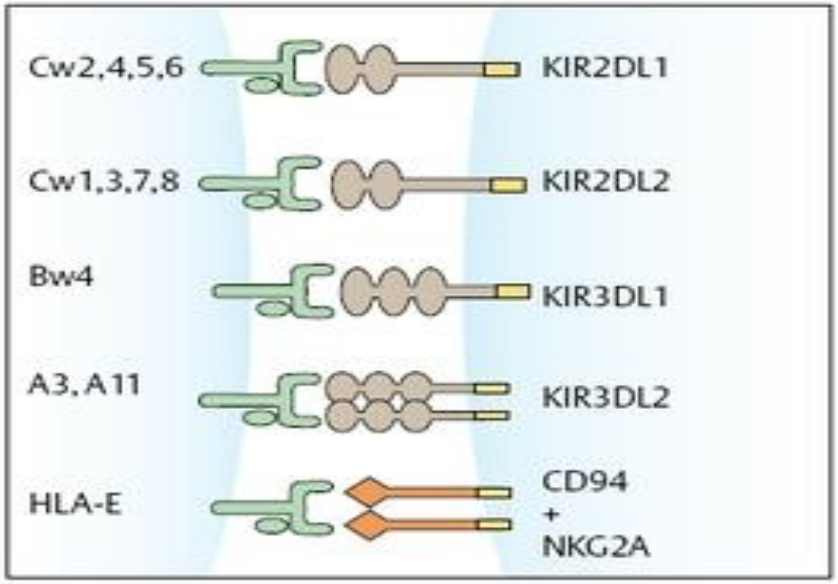
# Рецепторы

- NK-клетки уничтожают клетку-мишень после установления с ней прямого контакта при помощи специальных белков — перфоринов. Перфорины встраиваются в мембрану чужеродной или трансформированной клетки, образуя в ней «дыру», приводящую к необратимому и гибельному выравниванию ионного состава между цитоплазмой и внешней средой.

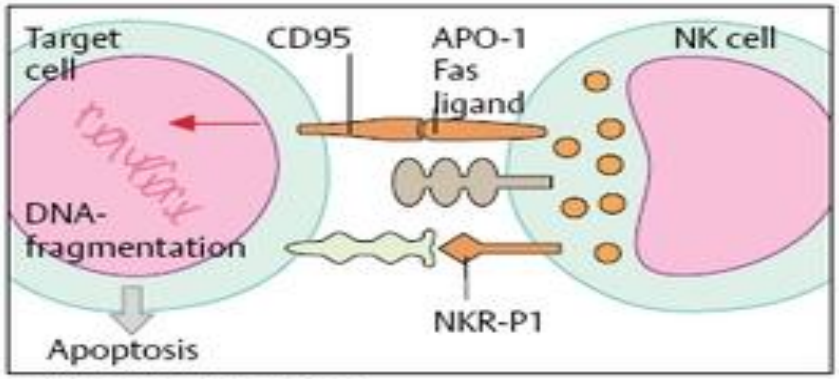


MedUniver.com - все по медицине.

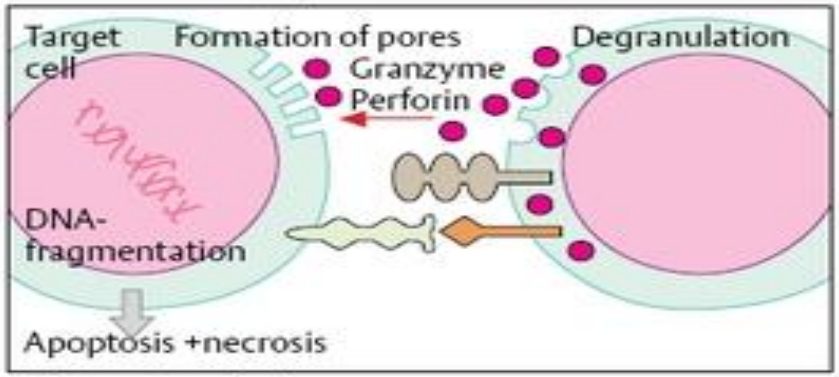
B. Target recognition by NK cells



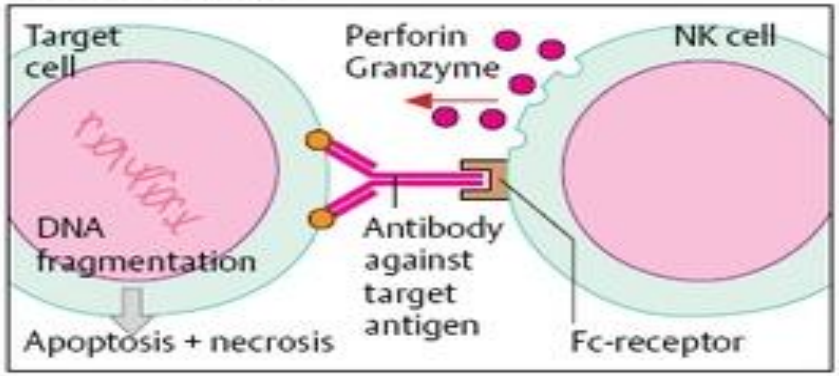

C. Inhibitory receptors of NK cells




1. Nonsecretory lysis




2. Secretory lysis

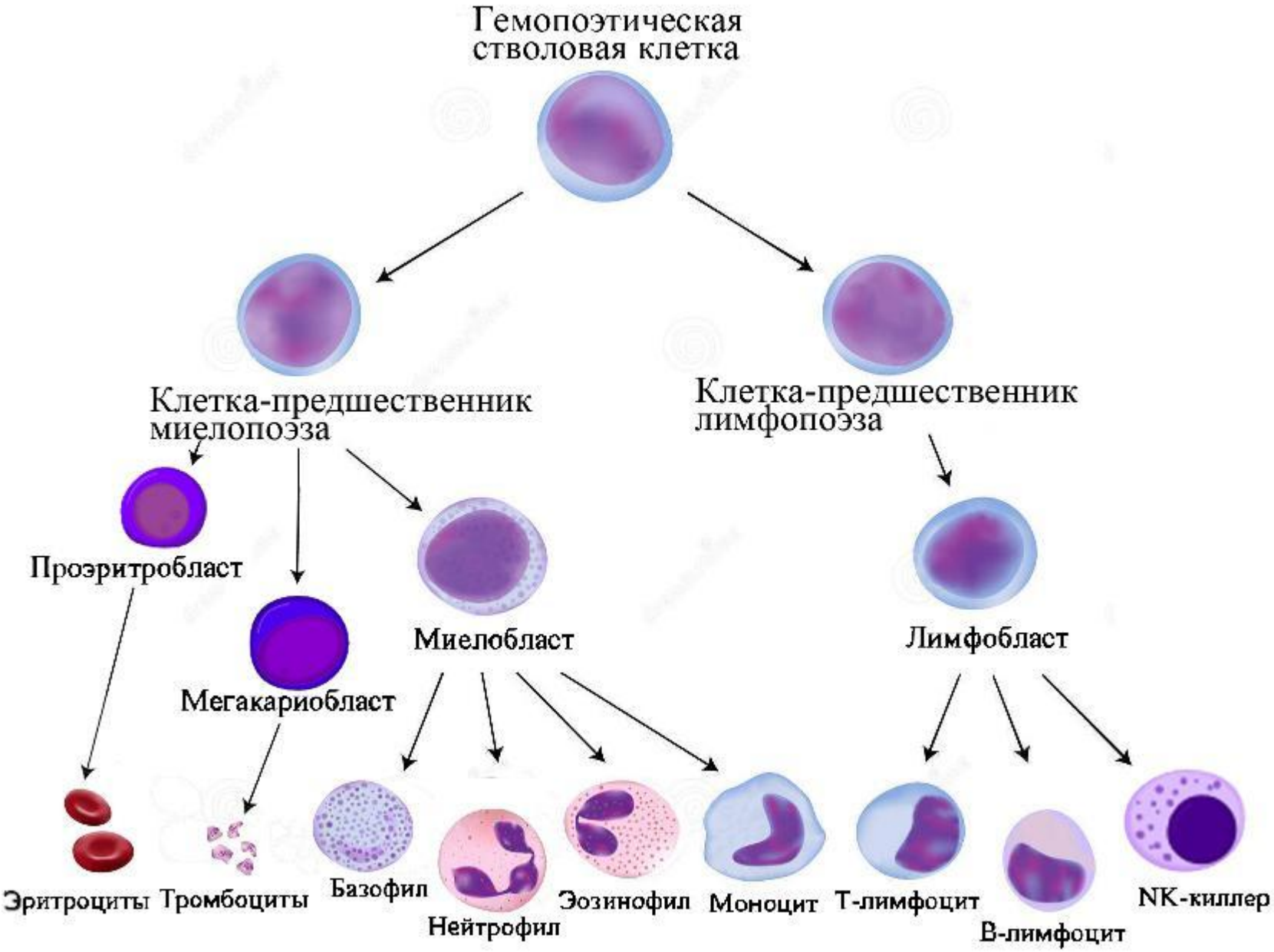



3. ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity)

D. Cytolytic mechanisms of NK cells

# Роль цитокинов

- Активность NK-клеток регулируют цитокины (γ-ИФН и ИЛ-2 усиливают их цитолитическую активность). Наряду с макрофагами, нейтрофилами и эозинофилами они также участвуют в антителозависимом клеточно-опосредованном цитолизе. Для этого NK-клетки экспрессируют на своей поверхности рецептор Fc-фрагмента IgG (GD16). Реакция зависит от присутствия АТ, узнающих клетку-мишень и связывающихся с ней. Fc-фрагмент связанных с клеткой-мишенью АТ взаимодействует с рецептором Fc-фрагмента, встроенным в плазматическую мембрану NK-клетки. Природа агента, убивающего клетку-мишень в этом случае, неизвестна.


Гемопоэтическая
стволовая клетка
Клетка-предшественник
миелопоэза
Клетка-предшественник
лимфопоэза
Проэритробласт
Мегакариобласт
Миелобласт
Лимфобласт
Эритроциты
Тромбоциты
Базофил
Нейтрофил
Эозинофил
Моноцит
Т-лимфоцит
В-лимфоцит
NK-киллер

- Современные методы выделения лимфоцитов и других клеток

- Для выделения мононуклеаров крови наиболее широкое распространение получил метод дифференциального центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографин (с плотностью 1.077 г/см3). После центрифугирования образуется осадок эритроцитов и гранулоцитов на дне пробирки, над ним находится слой смеси фиколл-верографин, а на границе между этим слоем и верхним слоем плазмы крови располагается тонкий слой (в виде кольца) мононуклеаров крови, которые отличаются от других форменных элементов значительно меньшей плотностью. После отмывания мононуклеаров от смеси фиколл-верографин и от плазмы подсчитывают количество выделенных клеток, среди которых обычно 70—90 % составляют лимфоциты, а на долю моноцитов приходится от 10 до 30 % (примесь гранулоцитов не должна превышать 2 %, жизнеспособность выделенных клеток, по данным теста с трипановым синим, должна быть не ниже 98 %).

- Для выделения моноцитов из суммарной фракции мононуклеаров самый простой и доступный метод основан на избирательной способности моноцитов (в отличие от большинства лимфоцитов) быстро и прочно прикрепляться к поверхности стекла или пластика. Инкубация смеси моноцитов с лимфоцитами в течение 2—24 ч используется для их разделения на прилипающую (моноциты) и неприлипающую (лимфоциты) фракции.

# Разделение клеток в градиенте плотности

- **Материалы и оборудование**. Для работы необходимы: центрифуга с охлаждением, бакет-ротор, градиентный смеситель, вещества для формирования градиента, такие, как альбумин, сыворотка эмбрионов коров, фиколл, лимфопреп, перколл (Pharmacia, Швеция), визотраст или другие рентгеноконтрастные вещества.

# Центрифугирование в градиенте плотности

- Ввиду разнообразия применяемых методов фракционирования клеток в градиенте плотности невозможно в рамках настоящей главы дать их детальный разбор. В зависимости от биологического вида, органного происхождения, стадии жизненного цикла и активации плотность лимфоцитов, макрофагов, гранулоцитов варьирует в пределах 1,04—1,12 г/мл. Обычно разброс величин плотности составляет около половины этого интервала. Условия центрифугирования подбираются индивидуально в зависимости от характера эксперимента, основные варианты представлены в таблице:

Таблица 19. **Изопикническое центрифугирование клеток в градиенте плотности фиколла**

| Градиент | Биологический вид | Тип клеток | g | Время, мин |
|---|---|---|---|---|
| 5,5—43% | Морская свинка | Лимфоциты/макрофаги | 800 | 90 |
| 4—48% | Мышь | Лимфоциты/макрофаги | 600 | 120 |
| 4,1—43% | Человек | Лимфоциты/гранулоциты | 850 | 90 |
| 4,1—43% | Мышь | Лимфоциты/гранулоциты/макрофаги/тучные клетки | 2200 | 30 |

# ступенчатый градиент плотности

- Одновременное разделение эозинофилов, нейтрофилов и моноцитов человека в градиенте фиколл/гипак:
- (А) 15,0 мл 9% фиколла + 10,0 мл 50% гипака; плотность 1,14 г/мл.
- (Б) 17,5 мл 9% фиколла + 10,0 мл 50 гипака; плотность 1,13 г/мл.
- (В) 20,0 мл 9% фиколла+10,0 мл 50% гипака; плотность 1,12 г/мл.
- (Г) 24,0 мл 9% фиколла + 10,0 мл 50% гипака; плотность 1,06 г/мл.

- Составляют градиент осторожно, наслаивая друг на друга по 2,0 мл растворов уменьшающейся плотности. Сверху наслаивают 2,0 мл гепаринизированной крови, разведенной в соотношения 1:2 0,15 М NaCl. Центрифугируют 40 минут при 1000 g и 22°С. Клетки распределяются тогда между различными слоями следующим образом: между плазмой и слоем Г — моноциты и лимфоциты с 97—100% чистотой, между Г и В — нейтрофилы с 94—99% чистотой, между В и Б — непрофилы (50—98%) и эозинофилы (2—50%), между Б и А —эозинофилы с 80—99% чистотой.

# Разделение гранулоцитов и фракции лимфоциты/моноциты человека в градиенте фиколл/триомбраст:

- (А) 10 объемов 34% триомбраста плотность 1,075 г/мл при 22°С
- 24 объема 9% фиколла (Б) 10 объемов 34% триомбраста плотность 1,097 г/мл при 22°С 24 объема 14,6% фиколла
- На градиент, составленный из 5 мл фракции А и 5 мл фракции Б, наслаивают 10 мл разведенной в соотношении 1:2 гепаринизированной крови. Центрифугируют 40 минут при 400 g и 22°С. Легкая фракция содержит лимфоциты (свыше 60%), моноциты (свыше 35%) и гранулоциты (около 1%).
- Плотная фракция содержит 98% гранулоцитов, их выход составляет 60%.

# Изокинетическое разделение

- Изокинетическое разделение используют при необходимости разделять клетки одинаковой плотности, но различной величины. Если используется градиент фиколла 2,6—5,5%, то центрифугирование проводят при 18,7 и 97 g в течение 30—14 мин. Результаты можно существенно улучшить, дополнив изокинетическое центрифугирование изо-пикническим.

- Все многообразие методов разделения клеток можно видеть на примере разделения моноцитов и лимфоцитов человека в градиенте перколла. Раствор перколла (30 мл) с плотностью 1,060 г/мл в среде, не содержащей $Ca^{2}+$ и $Mg^{2}+$, центрифугируют в течение 1 ч при 26 000 g для формирования градиента плотности. На этот градиент наслаивают 3,0 мл суспензии моноциты/лимфоциты ($15x10^{6}$/мл). Разделение моноцитов и лимфоцитов происходит в ходе изокинетического центрифугирования в течение 5 минут при 400 g. Выход высокогомогенной фракции моноцитов составляет около 50% от их содержания в крови.

# Седиментация в градиенте плотности

- Фракционирование клеток различной величины чаще всего проводят в седиментационной камере по принципу Miller и Phillips. Диаметр таких камер обычно варьирует от 11 до 21 см, но известны и камеры меньшего размера. Для стабилизации разделяющей жидкости и предотвращения конвенции градиент формируют из сыворотки эмбрионов коров. Готовят суспензию клеток ($10^7$/мл) в 3% сыворотке эмбрионов коров. В камере диаметром 11 см седиментируют 20 мл, диаметром 21 см—100 мл суспензии клеток. Градиент формируется в процессе центрифугирования, которое происходит при 4° С н длится 3,5—4,5 ч. Клетки сорбируют фракциями по 12—15 мл.

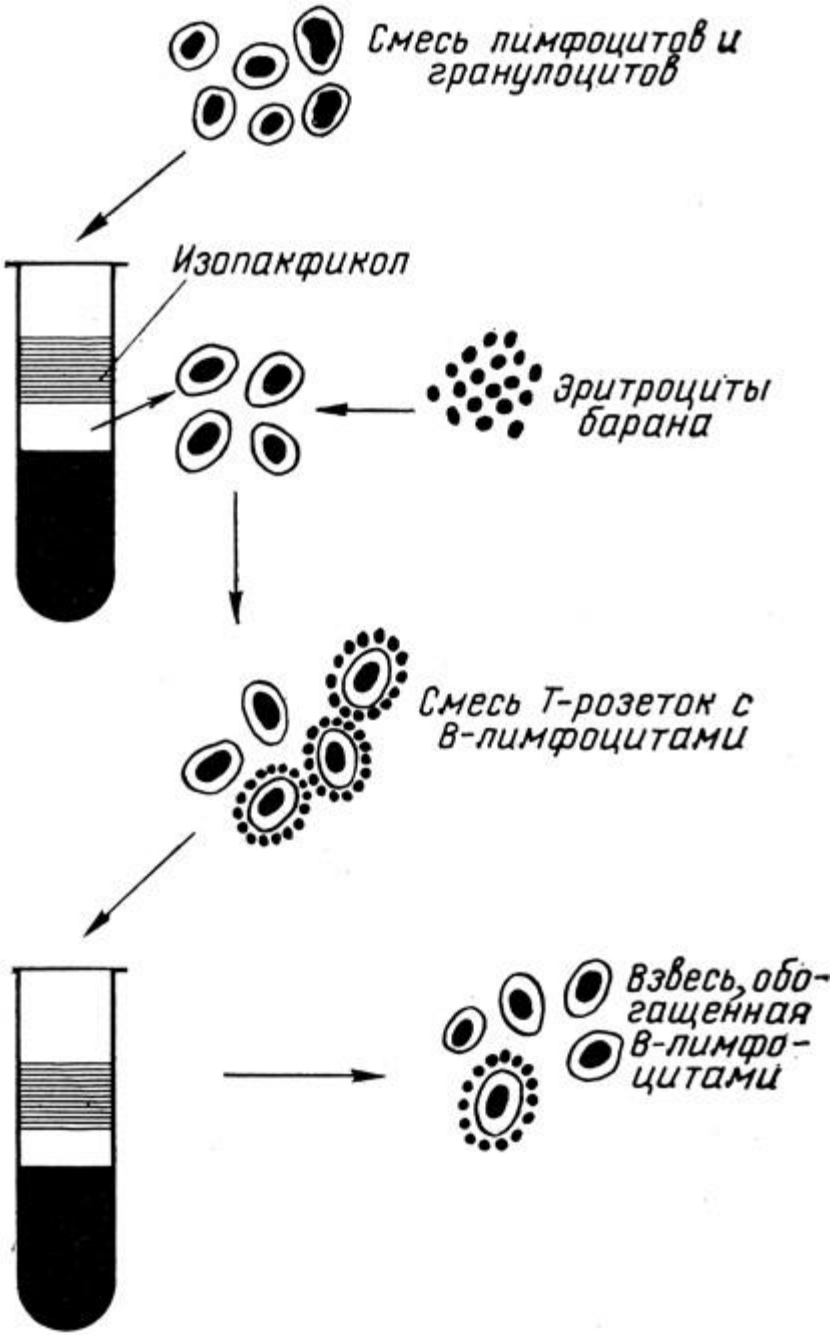
# Идентификация Т-лимфоцитов

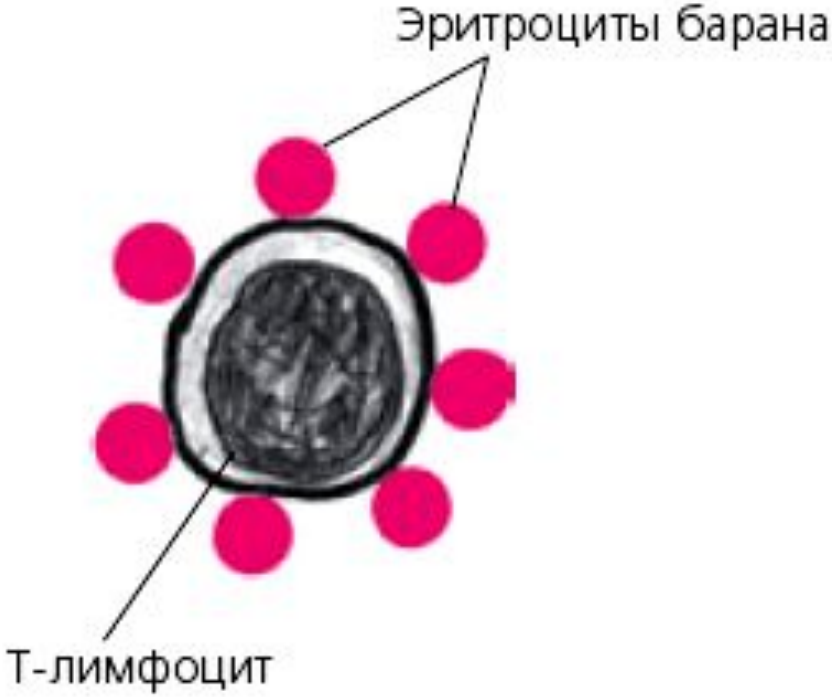
- 1. Выделение чистых лимфоцитов в градиенте определенной плотности (различной для разных видов животных) методом дифференциального центрифугирования.
  2. Получение рабочей взвеси лимфоцитов в концентрации 3—4 млн клеток в 1 мл в забуференном фосфатами физиологическом растворе (pH 7,41) с добавлением 2,5% эмбриональной телячьей сыворотки.
  3. Приготовление 0,5%-ной суспензии трижды отмытых физиологическим раствором эритроцитов барана.

- 4. Постановка реакции. К 0,25 мл рабочей взвеси лимфоцитов добавляют 0,25 мл 0,5%-ной взвеси отмытых эритроцитов. После выдерживания при температуре 18—20 °С в течение 20—25 мин центрифугируют при режиме 300—400 g и снова инкубируют при 4 °С в течение 15—18 ч. Осадок осторожно взбалтывают и добавляют по каплям 0,3 мл 0,6%-ного раствора глютарового альдегида на забуференном физиологическом растворе и фиксируют 15—20 мин. Затем трехкратно отмывают водой или физиологическим раствором, центрифугируя по 5 мин при 250—300 g и каждый раз осторожно ресуспензируя. После последнего центрифугирования надосадочную жидкость частично сливают и осадок вновь осторожно взбалтывают.

- 5. Готовят мазки па предметных стеклах методом толстой капли; фиксируют метиловым спиртом 3—5 мин и окрашивают по Романовскому — Гимза или другими красителями (водные растворы эозина, прочный или светлый зеленый и др.).

- 6. Учет реакции. Под иммерсионной системой микроскопа подсчитывают 100 лимфоцитов (увеличение 90х7), неприсоединившие и присоединившие 3 и более эритроцита. Определяют их процент к общему числу лимфоцитов и абсолютное содержание в 1 мл крови.

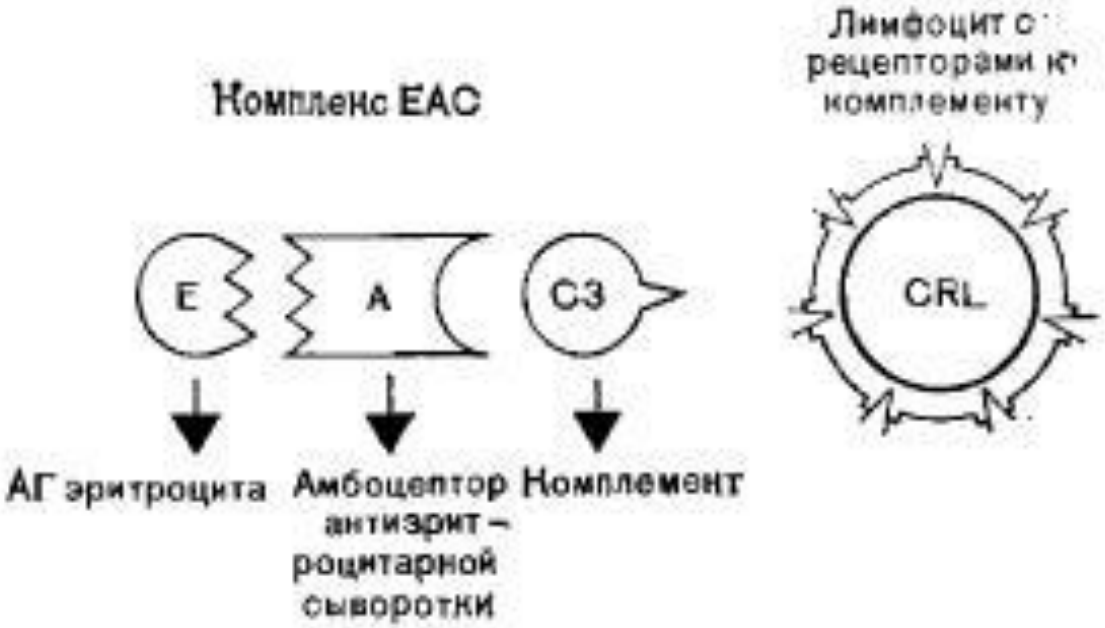

Смесь лимфоцитов и гранулоцитов
Изопакфикол
Эритроциты барана
Смесь Т-розеток с в-лимфоцитами
Взвесь, обогащенная в-лимфоцитами


Эритроциты барана
Т-лимфоцит

# Идентификация В-лимфоцитов

- 1. Эритроциты барана трижды отмывают раствором Хенкса и готовят 5%-ную взвесь в этом растворе.
  2. Получают рабочую взвесь лимфоцитов с концентрацией 3—4 млн клеток в 1 мл.
  3. Сухую гемолитическую сыворотку против эритроцитов барана разводят раствором Хенкса до титра 1:500.
  4. Смешивают в равных объемах (1:1) 5%-ную взвесь эритроцитов барана и разведенную гемолитическую сыворотку, инкубируют при 37 ° С в течение 30 мин и отмывают трижды путем центрифугирования при 80 g в течение 5 мин.

- 5. Отмытые эритроциты инкубируют с равным объемом комплемента при 37 °С в течение 30 мин и отмыкают трижды в том же режиме.
  6. Смешивают рабочую взвесь лимфоцитов с отмытыми сенсибилизированными эритроцитами барана в соотношении 1:50. Инкубируют при 37 °С в течение 30 мил при слабом перемешивании.
  7. Готовят препараты на покровных стеклах, фиксируют метиловым спиртом и окрашивают по Романовскому — Гимза.
  8. Определяют процент и абсолютное число лимфоцитов, образовавших розетки (клетки, присоединившие 3 и более эрифоцита). Можно также подсчитывать ЕАС-розетки в любой счетной камере.


Комплекс ЕАС
Лимфоцит с рецепторами к комплементу
E
A
C3
CRL
АГ эритроцита
Амбоцептор антизрит – роцитарной сыворотки
Комплемент

- ***Оценка функциональной активности NK-клеток с использованием проточной цитометрии***

- В качестве метки для КМ применяют флуоресцентный краситель 5-, 6-карбоксифлуоресцеин диацетатсукцинилмидиловый эфир (КФДЭ), который образует прочную ковалентную связь с внутриклеточными белками и в используемой концентрации не влияет на жизнеспособность клетки.

- Первоначально нефлуоресцирующий КФДЭ проникает через клеточную мембрану. Карбоксифлуоресцеины связываются с внутриклеточными молекулами, формируя конъюгаты, обеспечивая стойкое флуоресцентное окрашивание клетки. Окрашенные таким образом КМ К-562 смешивают с КЭ и инкубируют в течение нескольких часов.

- После окончания культивирования клетки окрашивают пропидий йодидом для определения убитых в ходе реакции КМ. По количеству убитых К-562 определяют активность NK-клеток. Анализ проводят на проточном цитофлуориметре и определяют количество КМ, включивших КФДЭ (зеленое свечение), и количество убитых клеток, включивших пропидий йодид (красное свечение).