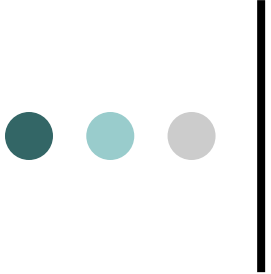




ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΙ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Αλεξάνδρα Φλέβα Ph.D Βιολόγος
Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας Γ.Ν.
«Παπαγεωργίου»

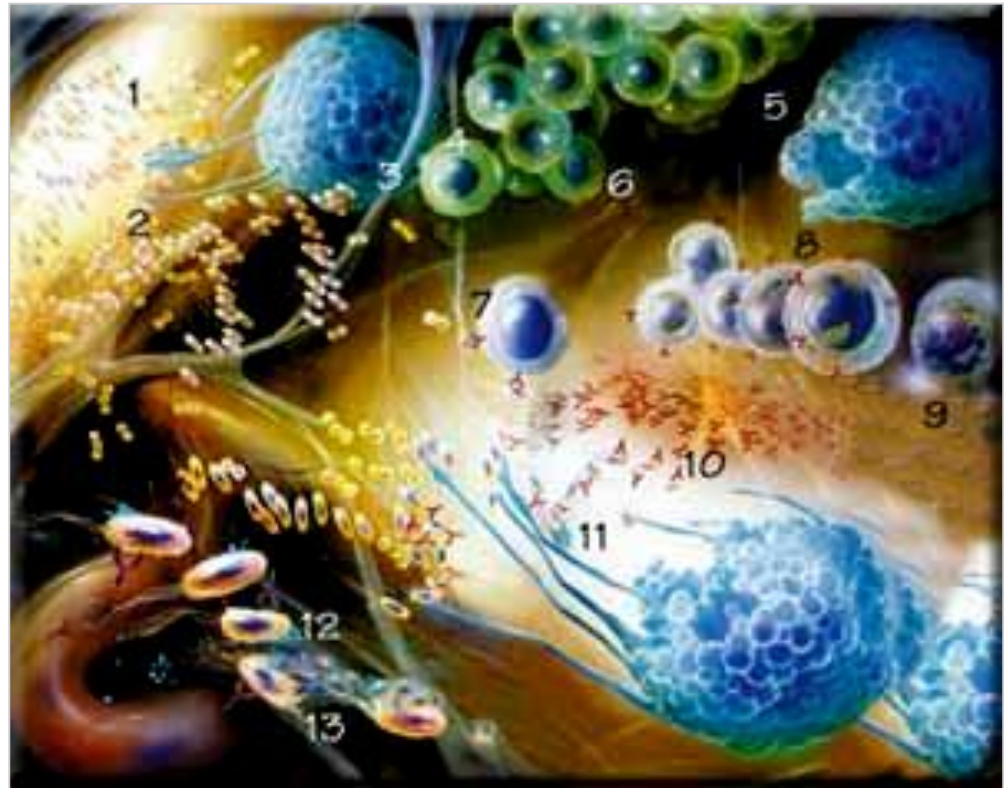




Η αξιοποίηση του εύρους των δυνατοτήτων της κυτταρομετρίας ροής στην Ανοσολογία προσφέρει στο σύγχρονο εργαστήριο σημαντικές κλινικές εφαρμογές για την διερευνητική μελέτη και παρακολούθηση νοσημάτων, στη παθογένεια των οποίων συμμετέχουν ανοσιακοί μηχανισμοί.

ΑΝΟΣΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

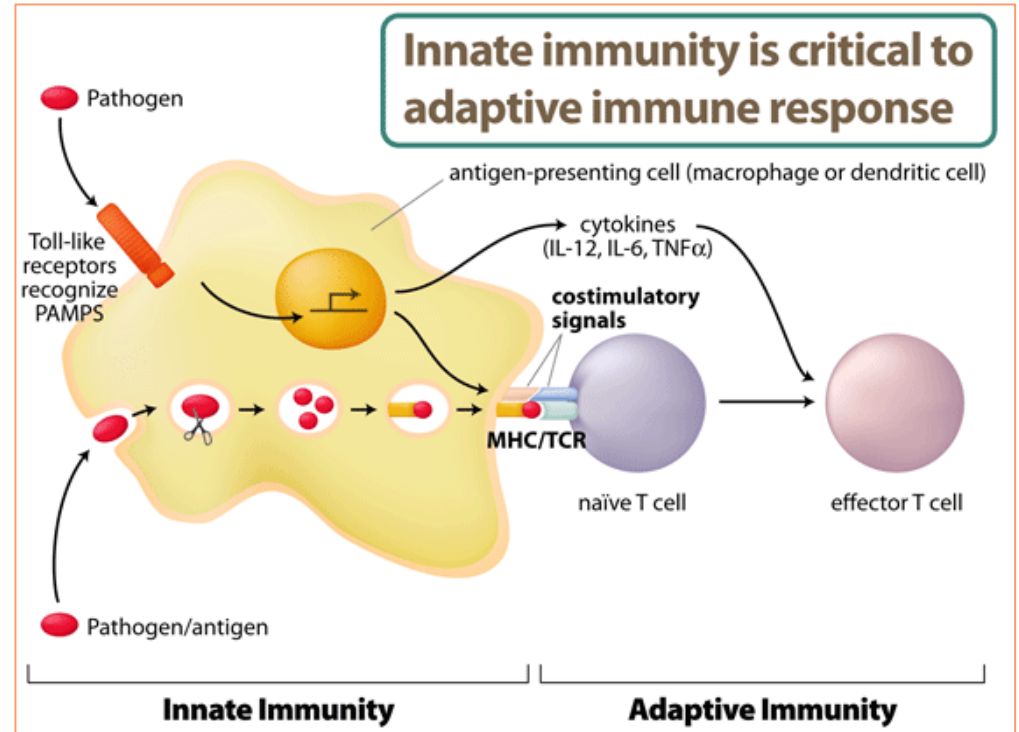
- διάκριση εαυτού από μη εαυτό
- η προστασία του οργανισμού από στοιχεία παθογόνα ή μη, τα οποία αναγνωρίζονται ως ξένα και καταστρέφονται αφού έχει προηγηθεί ευαισθητοποίηση (μνήμη)
- Ανοχή προς συγκεκριμένα αυτοαντιγόνα



ανοσία

Η ανοσιακή απάντηση
του οργανισμού
διακρίνεται

φυσική-μη ειδική ανοσία
(innate immunity)
ειδική-επίκτητη ανοσία
(adaptive immunity)





Η δυναμική του ανοσιακού συστήματος

Βασίζεται στην ικανότητά του να δημιουργεί δισεκατομμύρια διαφορετικών αντιγονικών υποδοχέων από πολλαπλά γονιδιακά τμήματα, τους οποίους συνθέτει με σωματικές αναδιατάξεις, που καθορίζουν την αντιγονοειδικότητα κάθε κυτταρικού κλώνου.

Επίκτητη - ειδική ανοσία

Χυμική ανοσία

B-λεμφοκύτταρα

CD19(+)CD20(+)

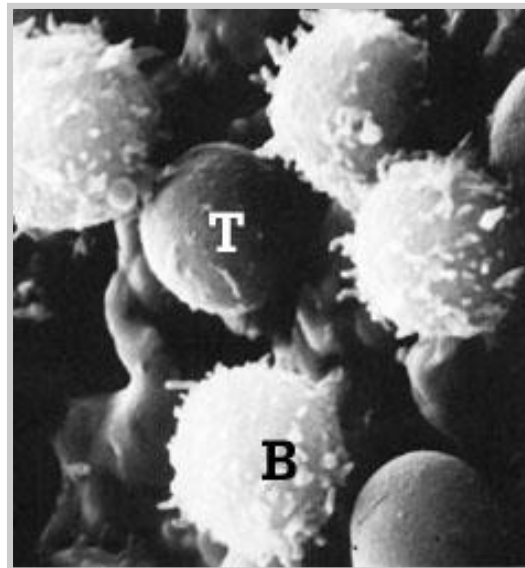
Ωρίμανση στο μυελό

Κυτταρική ανοσία

T-λεμφοκύτταρα

CD2(+)CD3(+)

Ωρίμανση στο θύμο αδέννα

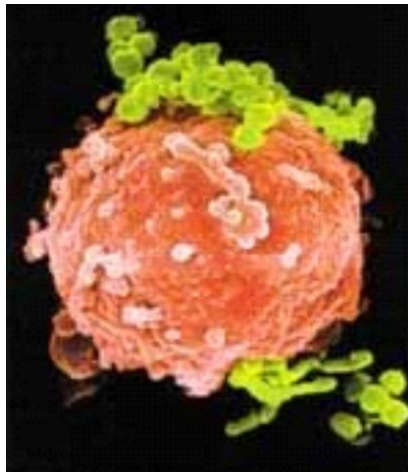


Κυτταρική ανοσία

Ειδικεύεται:

- στην αντιμετώπιση ενδοκυττάριων λοιμώξεων από ιούς, βακτήρια, μύκητες και πρωτόζωα
- στον έλεγχο της νεοπλασίας
- στις αντιδράσεις μοσχεύματος ξενιστή

Τα κύτταρα που διαμεσολαβούν στον τύπο αυτό της ανοσίας είναι τα Τ λεμφοκύτταρα



B-λεμφοκύτταρο



T-λεμφοκύτταρο

Φάσεις στη ζωή των λεμφοκυττάρων

Πολυδύναμο προγονικό κύτταρο στο μυελό των οστών



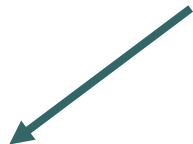
Ωρίμανση στα κεντρικά λεμφικά όργανα



Αναγνώριση ενεργοποίηση από αντιγόνο στα περιφερικά λεμφικά όργανα



Πολλαπλασιασμός



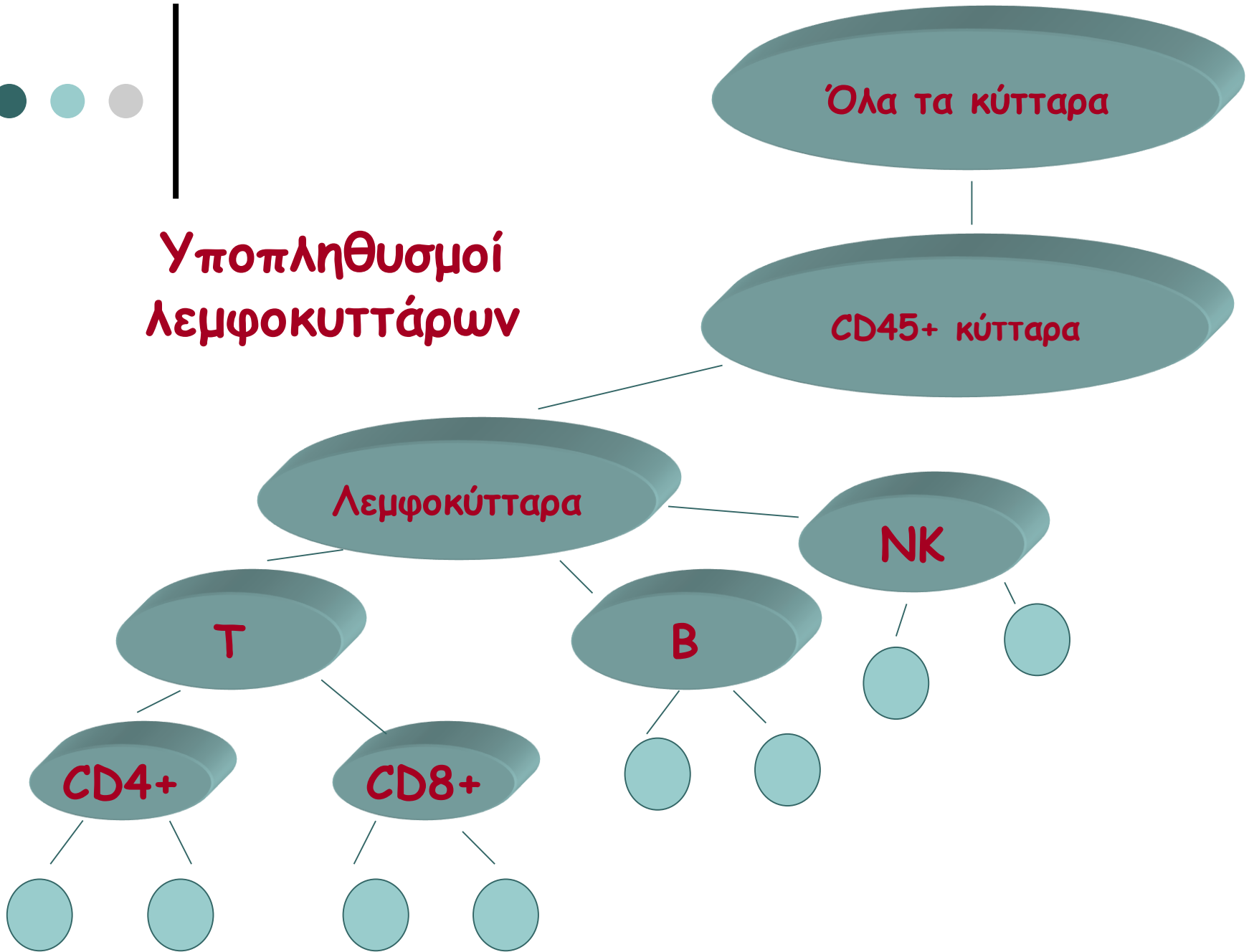
Διαφοροποίηση
δραστικά κύτταρα
(effector)



Διαφοροποίηση
μνημονικά κύτταρα
(memory)



Υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων





Διαδικασία της ωρίμανσης στον θύμο αδέννα

Τα pro-T cells, (ανώριμες πρόδρομες μορφές) δεν εκφράζουν CD4 ή CD8 (διπλά αρνητικά)

Αύξηση σε αριθμό υπό την επίδραση της IL7

Πλήρης έκφραση του TCR

Στα διπλά θετικά θυμοκύτταρα εκφράζονται και οι δύο υποδοχείς CD4 και CD8

Εκπαίδευση και διαφοροποίηση σε CD3+/CD4+ και CD3+/CD8+

Αδυναμία έκφρασης αντιγονικών υποδοχέων σε οποιοδήποτε στάδιο οδηγεί σε απόπτωση



Πορεία Τ λεμφοκυττάρου CD3+ μετά τον Θύμο

Παρθένα CD4+ και CD8+ στην κυκλοφορία των λεμφαδένων



Συναντούν αντιγόνα ενεργοποιούνται και
διαφοροποιούνται σε δραστικά και μνημονικά



Δραστικά Τ κύτταρα μεταναστεύουν στη περιοχή φλεγμονής



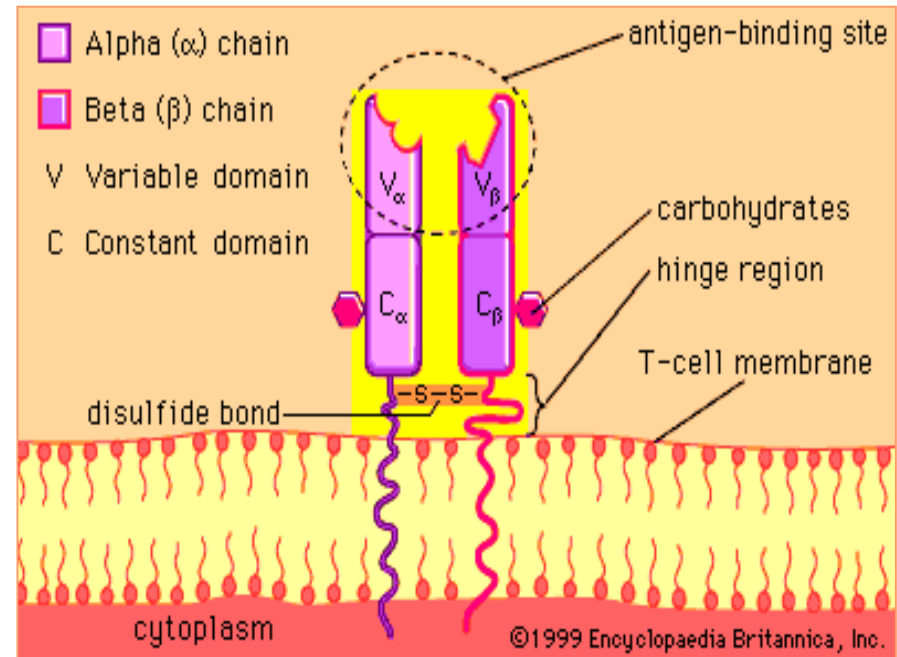
Καταστροφή του παθογόνου αίτιου

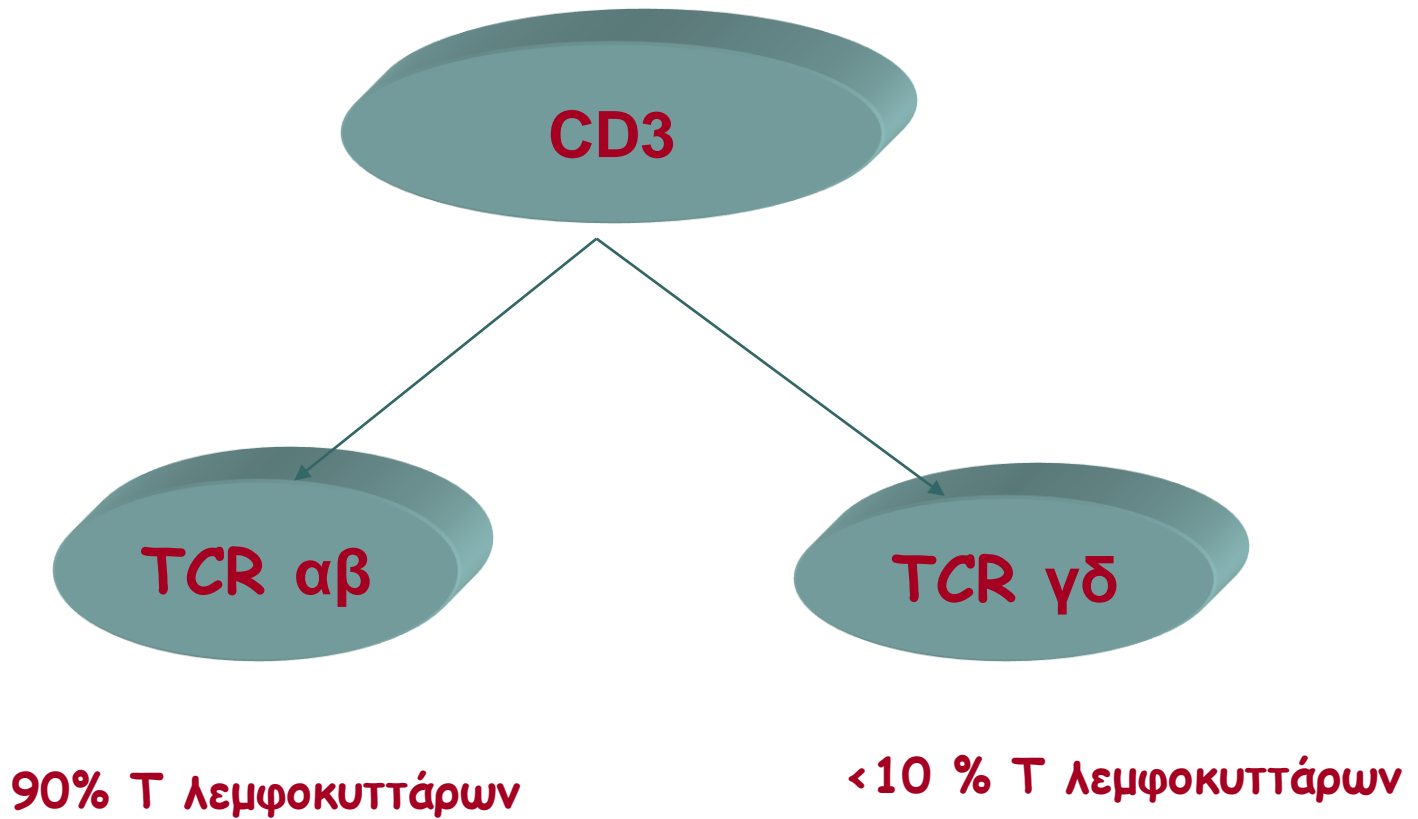
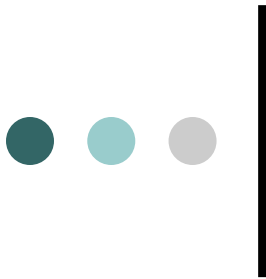
Ο υποδοχέας του Τ λεμφοκυττάρου (TCR)

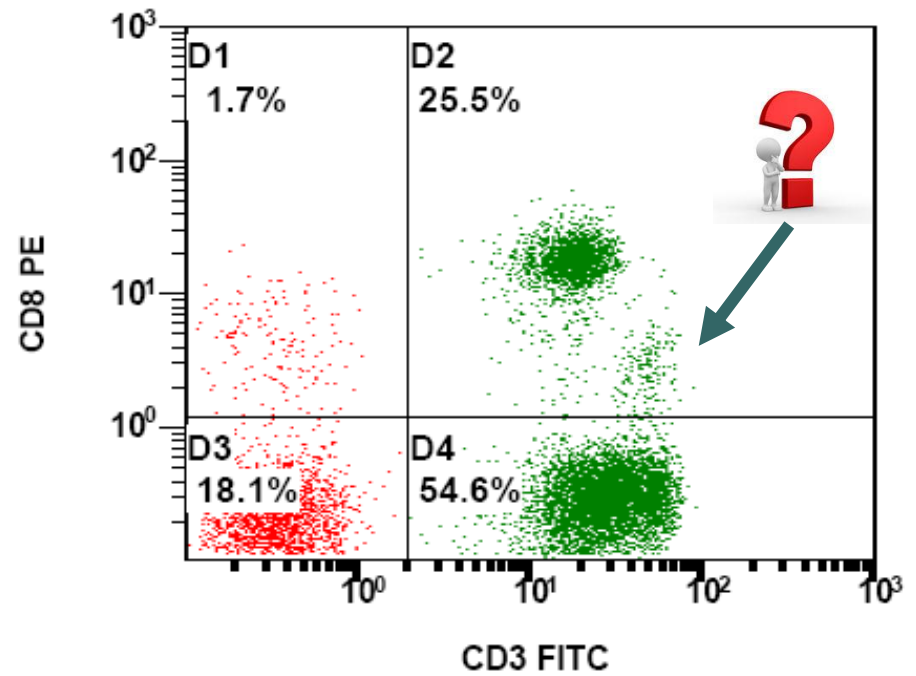
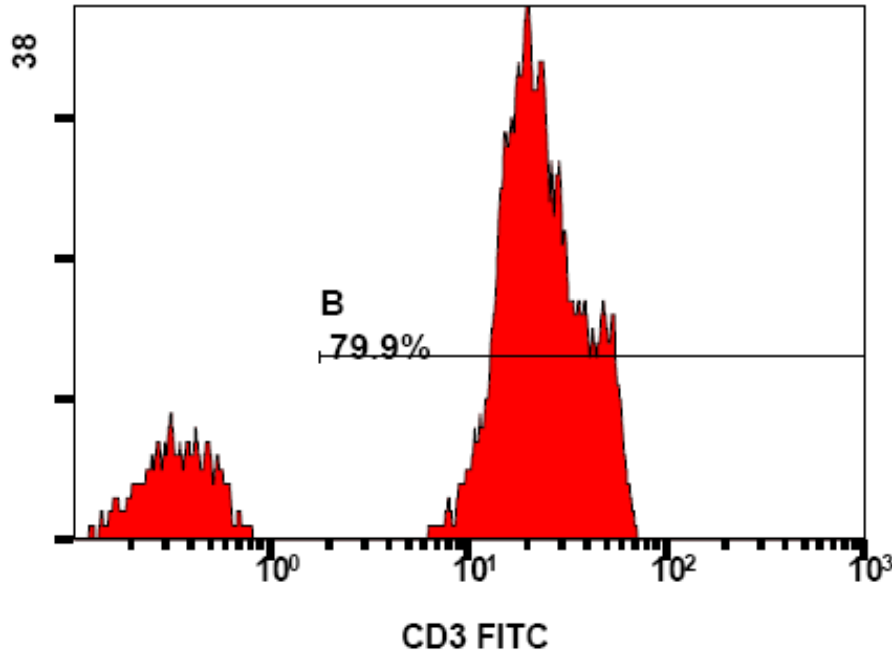
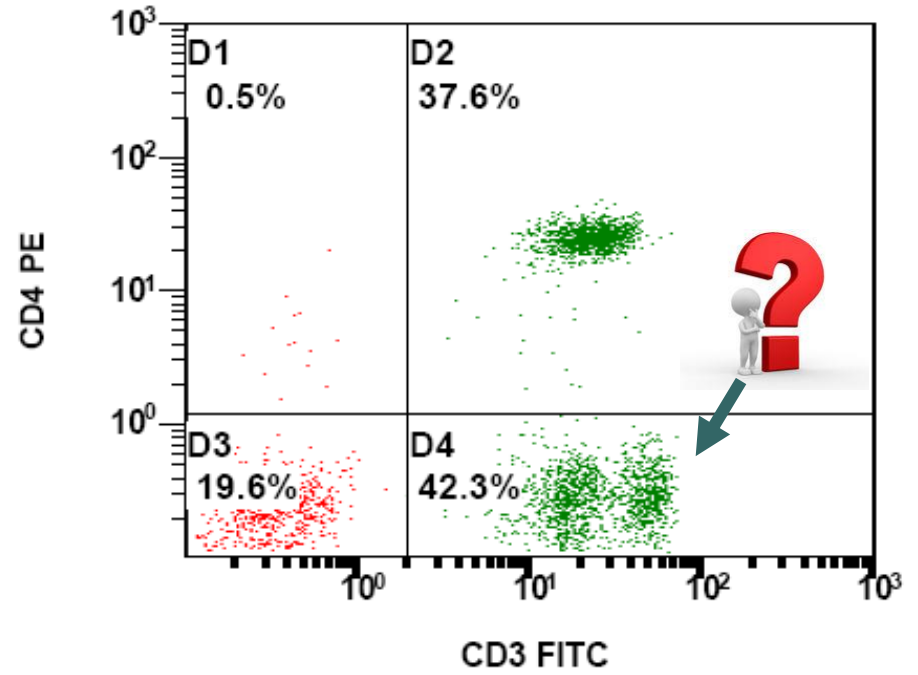
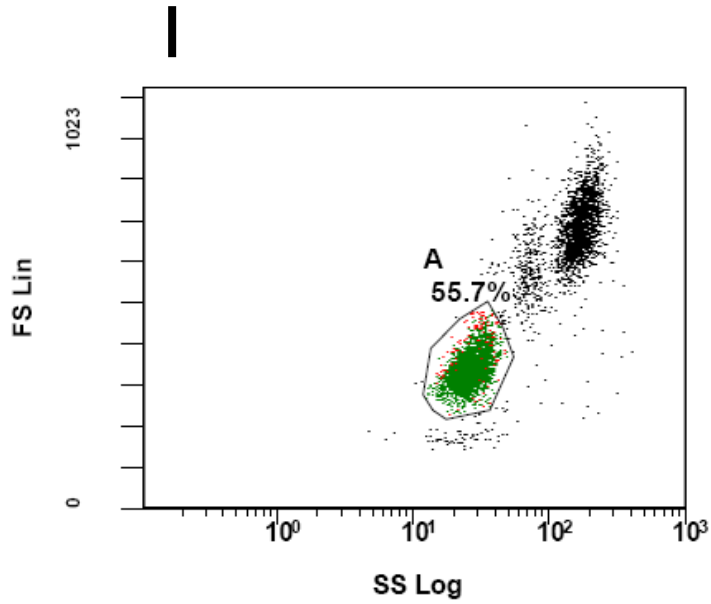
Ετεροδιμερές μόριο που αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, α και β ή γ και δ.

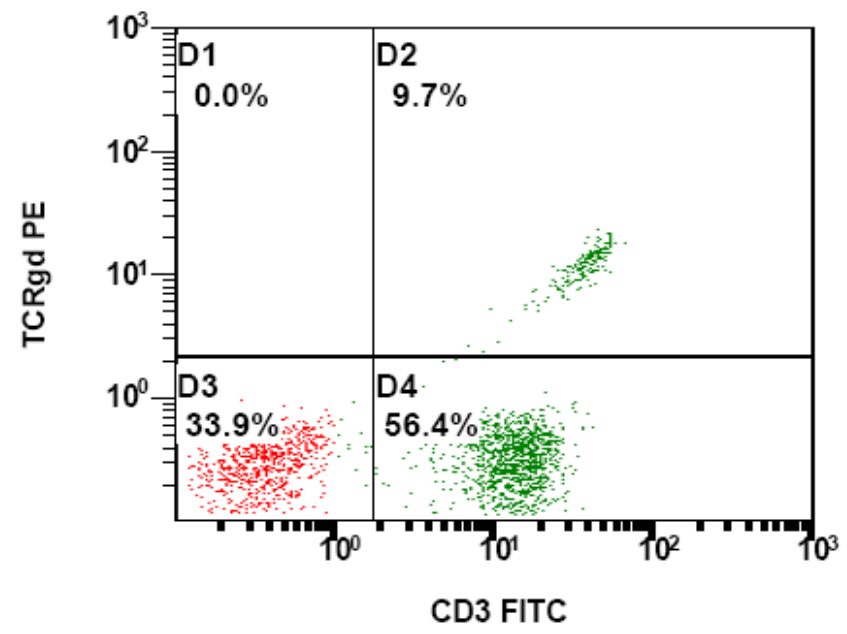
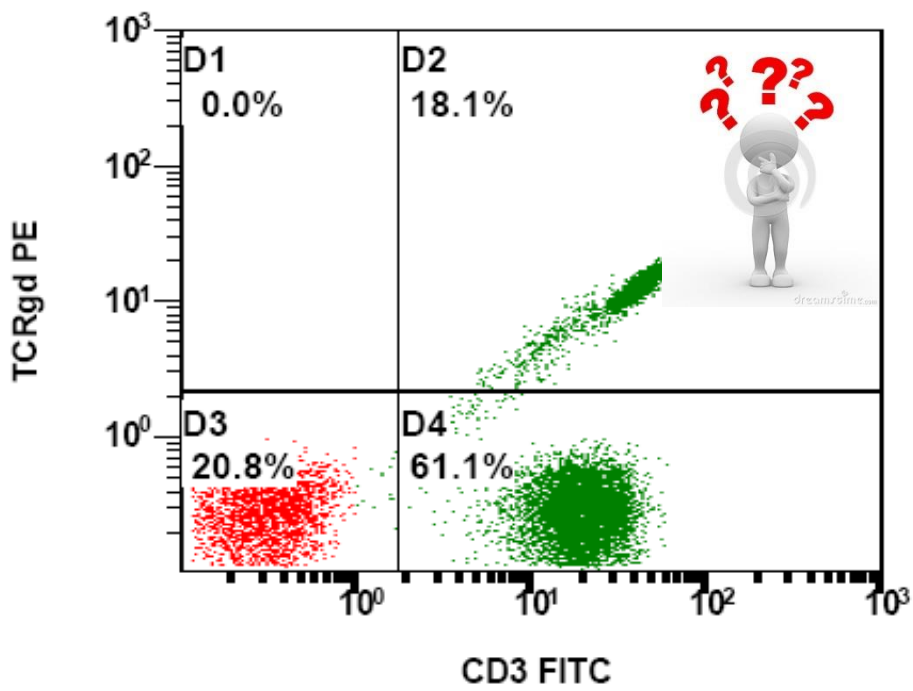
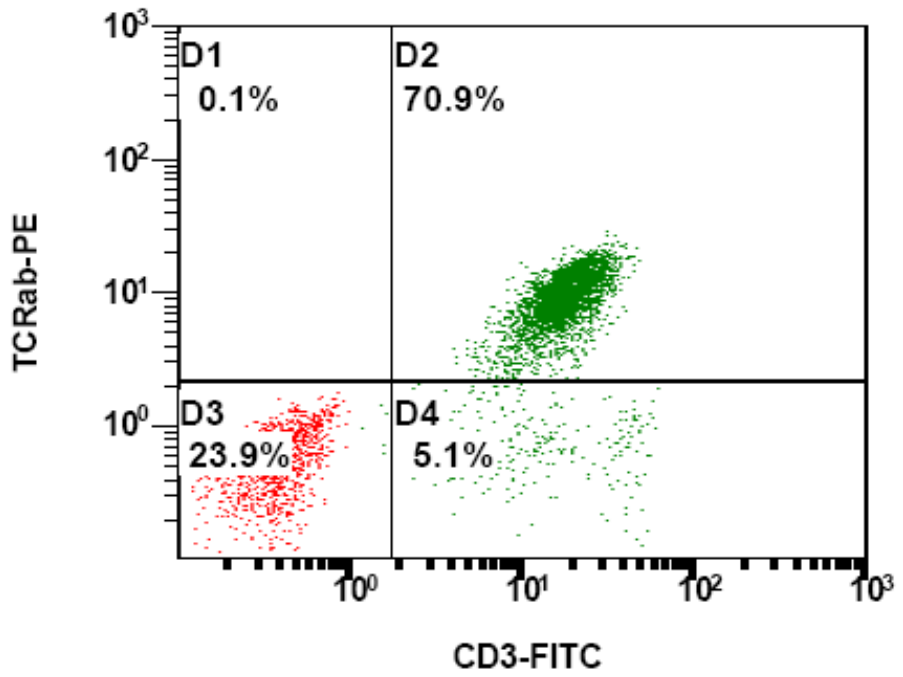
Η πλειοψηφία των περιφερικών Τ κυττάρων (90%) φέρουν στην επιφάνεια τους τον αβ τύπο υποδοχέα.

Ένα μικρό ποσοστό όμως (<10%) των Τ λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος φέρουν τον γδ τύπο υποδοχέα







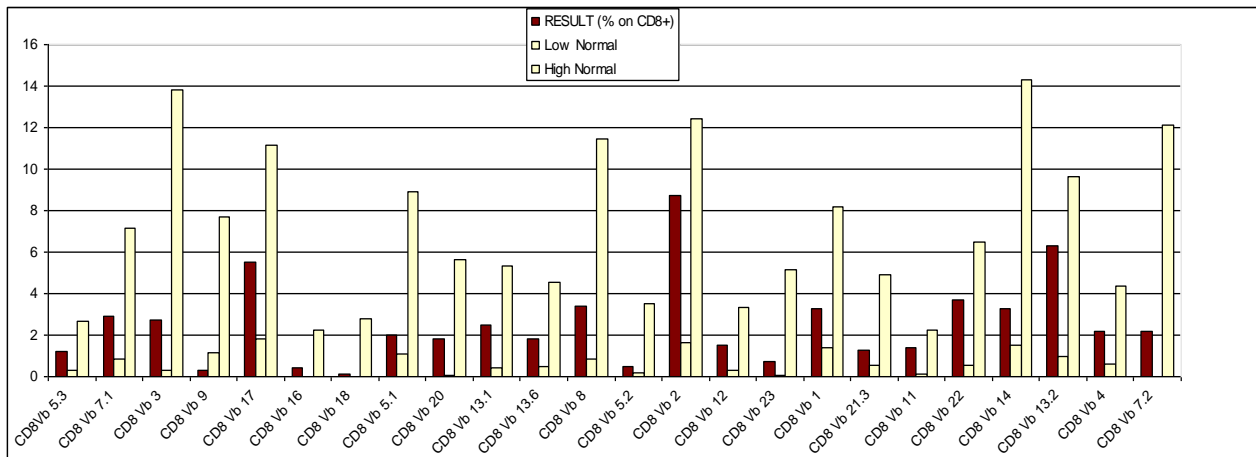


Κλωνόγραμμα T λεμφοκυττάρων (Vβ repertoire)

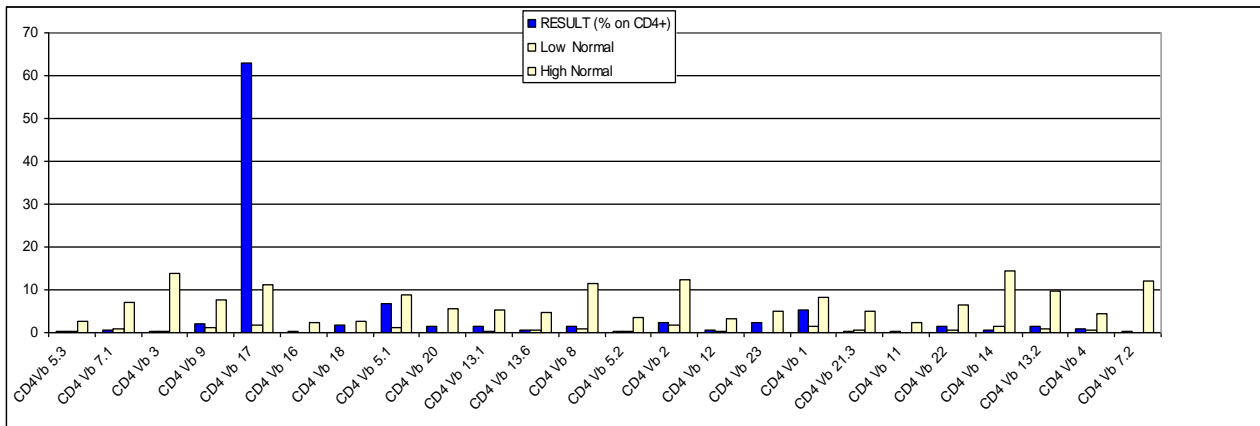
Μελέτη της κατανομής των T λεμφοκυττάρων σε 24 ορομάδες ανάλογα με την μεταβλητή περιοχή της β αλυσίδας του TCR.

Χρησιμότητα :

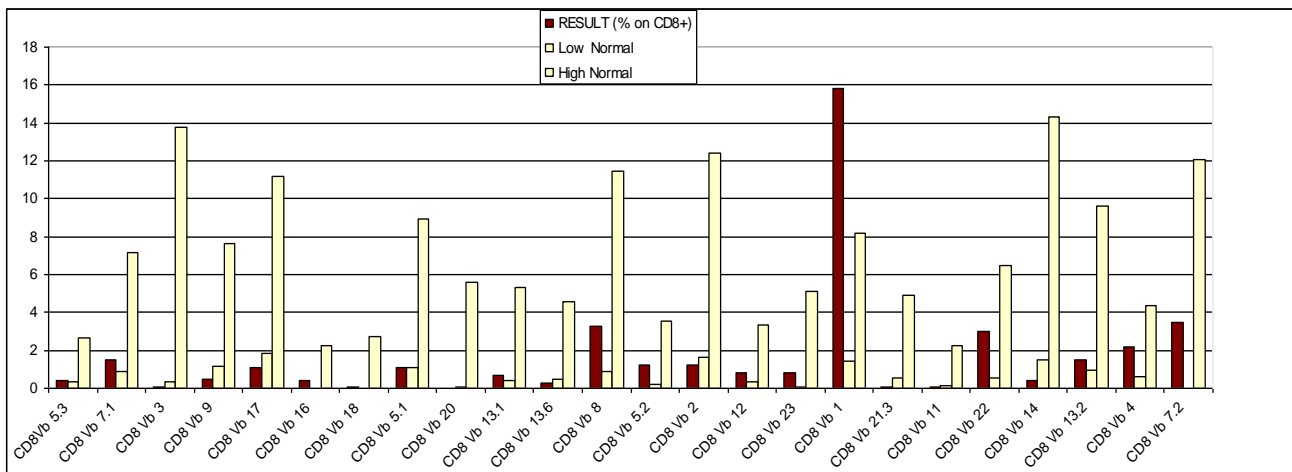
Στην Ανοσολογία: Μελέτη της ποικιλότητας των T λεμφοκυττάρων σε διάγνωση ΠΑΑ και σε μελέτη νοσημάτων με παθολογικό ανοσιακό υπόστρωμα



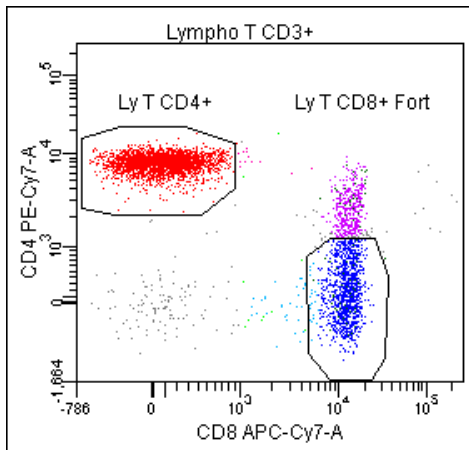
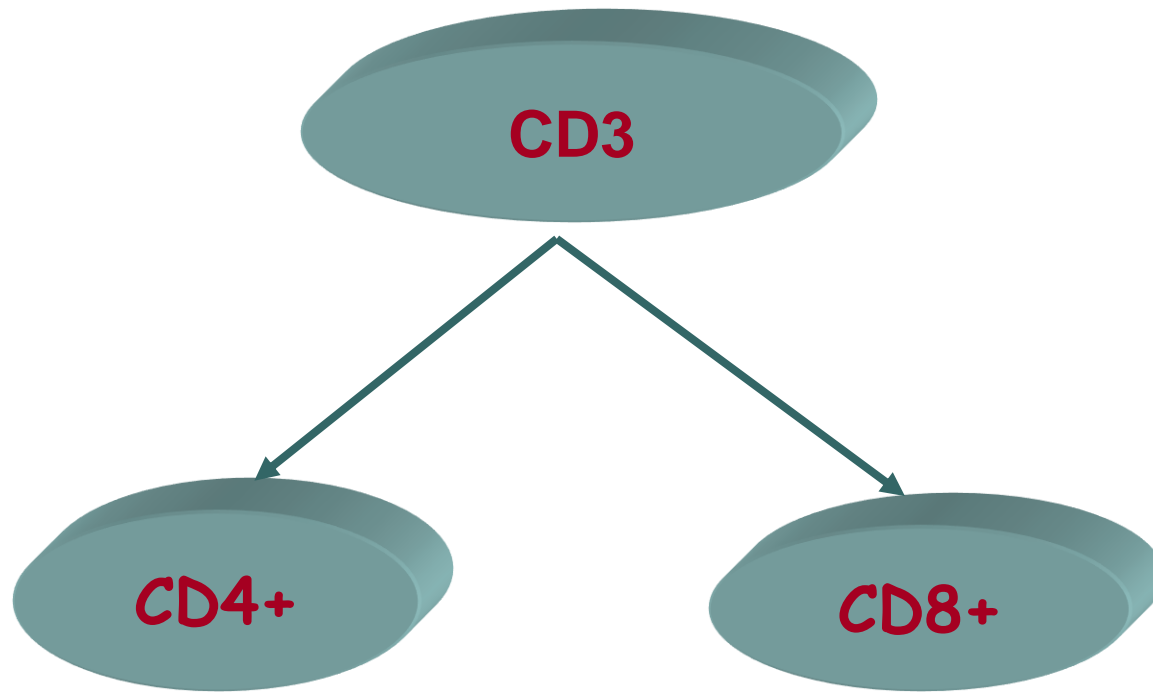
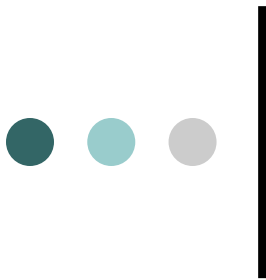
Φυσιολογικό κλωνόγραμμα CD8+ T λεμφοκυττάρων: Οι τιμές του ασθενούς (καφέ στήλες) βρίσκονται εντός των φυσιολογικών ορίων (μπεζ στήλες)



Μονοκλωνικός CD4+ Τ λεμφοκυτταρικός πληθυσμός σε ασθενή με σ. Scazary



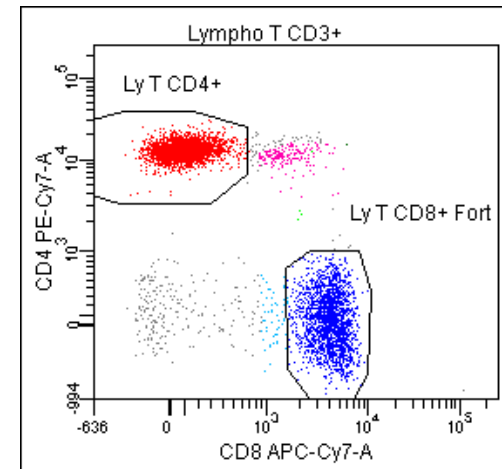
Κλωνόγραμμα CD8+ Τ λεμφοκυττάρων βρέφους με βαριά ανοσοανεπάρκεια: Παρατηρείται διαταραχή στην κατανομή των πληθυσμών



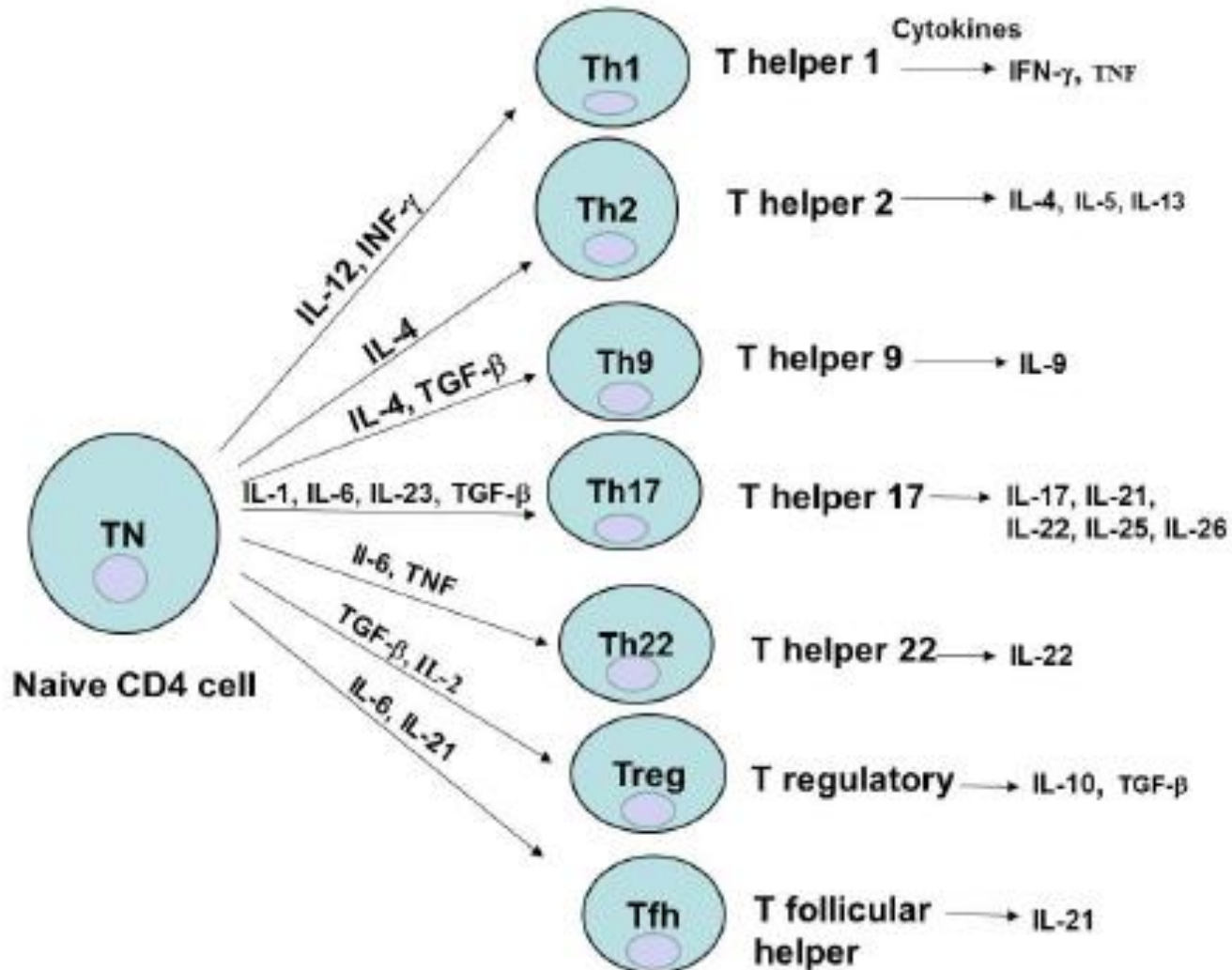
CD4+/CD8+



**Ανοσοκατασταλτική
/κυτταροτοξική δράση
σε νοσήματα όπως ο
καρκίνος και HIV**



Διαφοροποίηση CD4+ κυττάρου



classical Th1/Th2 balance disease induction model



allergic disease

auto-immune disease

pathogenic Th population disease induction model



Pathogenic Th2



Pathogenic Th1



Pathogenic Th17

← Good therapeutic targets

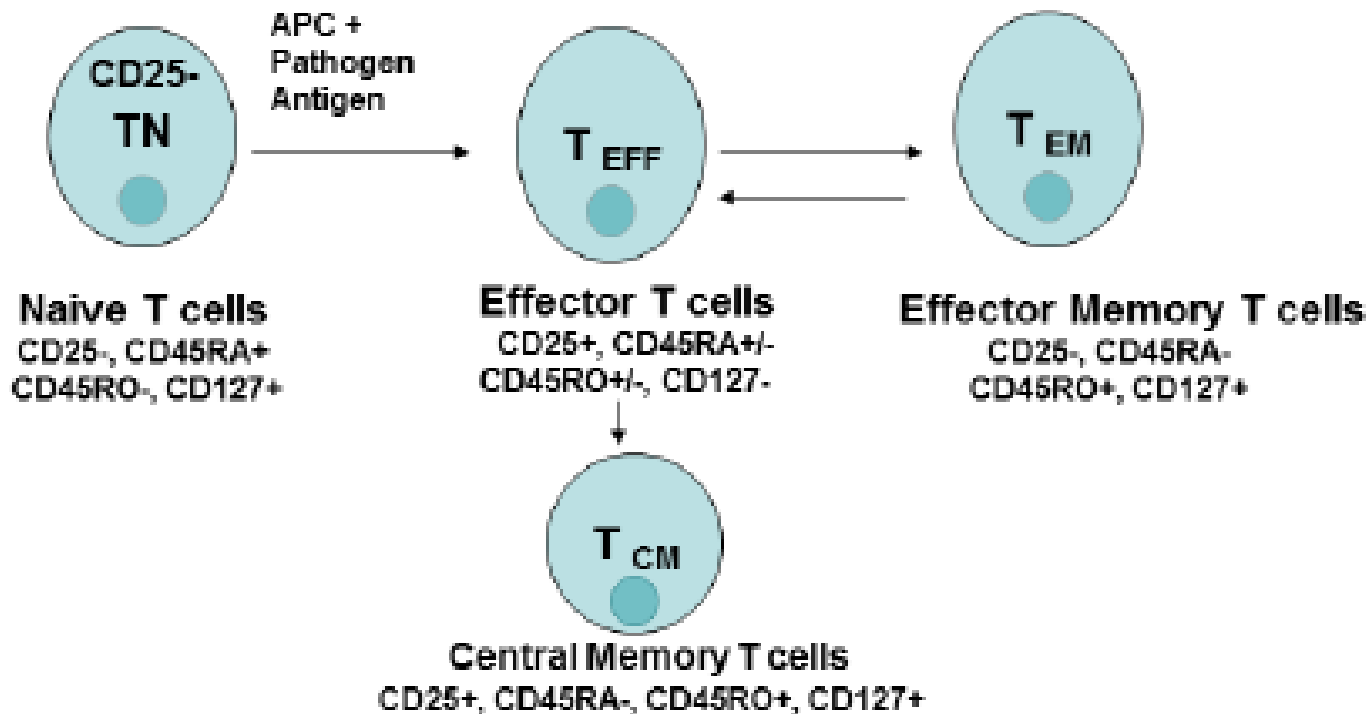


← Helper T cell subsets →

Δείκτες παρθένων T λεμφοκυττάρων

- **CD3** βασικός δείκτης ωρίμανσης με λειτουργικό TCR υποδοχέα
- **(CD4+ or CD8+)** ligands για τα MCH ταξης II (CD4+) και ταξης I (CD8+)
- **CD27++** συνδιεγέρτης ενεργοποίησης T κυττάρου με CD70 ως ligand
- **CD28++** συνδιεγέρτης ενεργοποίησης T κυττάρου με B7 ως ligand
- **CD45RA+** φωσφατάση υψηλού μοριακού βάρους. Δείκτης παρθένων κυττάρων . Ρυθμιστής των σημάτων του TCR
- **CD62L** δείκτης/μόριο κυκλοφορίας από το αίμα στα λεμφικά όργανα
- **CD127/IL7!Rec** υποδοχέας IL-7
- **CCR7** δείκτης/μόριο κυκλοφορίας από το αίμα στα λεμφικά όργανα

Διαφοροποίηση CD4+ κυττάρου





CD4+ T cells

Naïve

Antigen experienced



CD27+
CD28+
CCR7+
CD45RA+
CD57-
CD11a^{low}



CD27+
CD28+
CCR7+
CD45RA-
CD57-
CD11a^{high}



CD27+
CD28+
CCR7-
CD45RA-
CD57-
CD11a^{high}



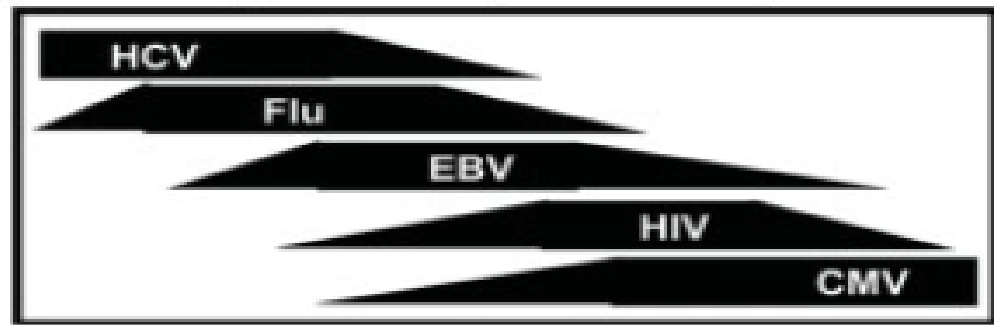
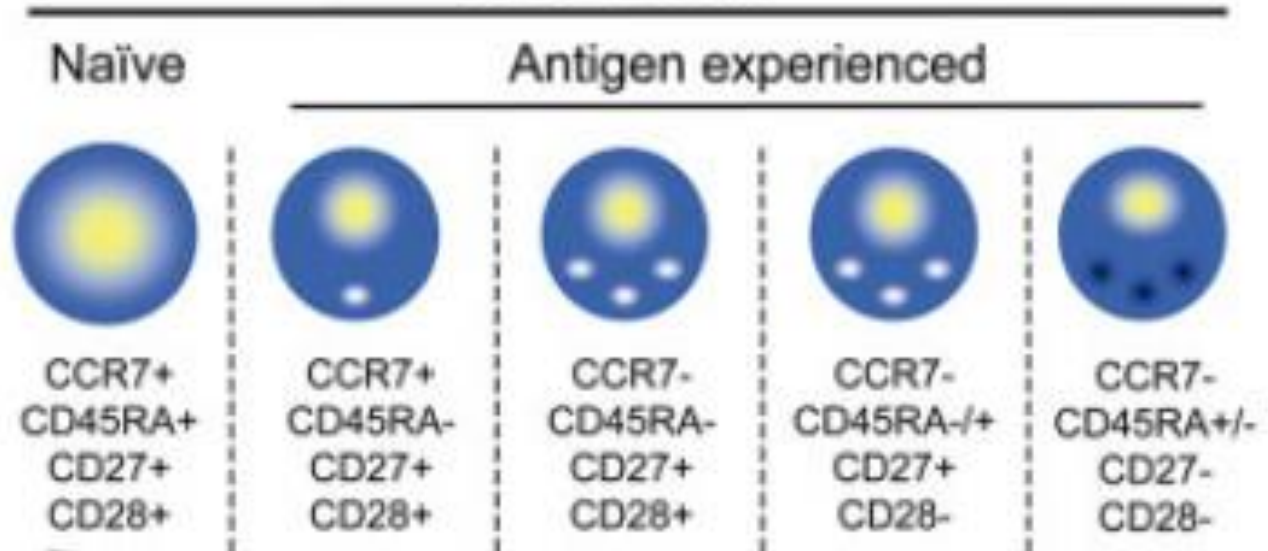
CD27-
CD28+
CCR7-
CD45RA-/+
CD57-/+
CD11a^{high}



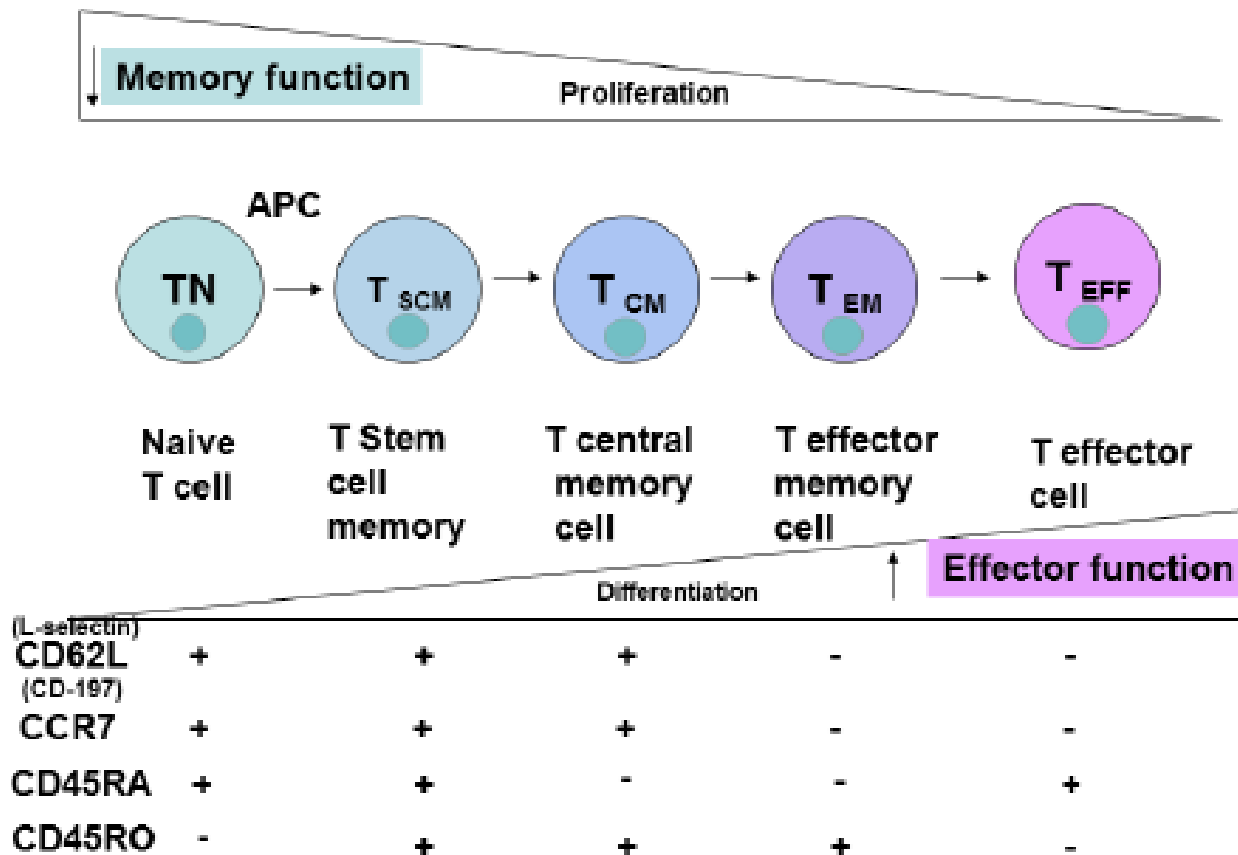
CD27-
CD28-
CCR7-
CD45RA+/-
CD57+/-
CD11a^{high}



CD8+ T cells



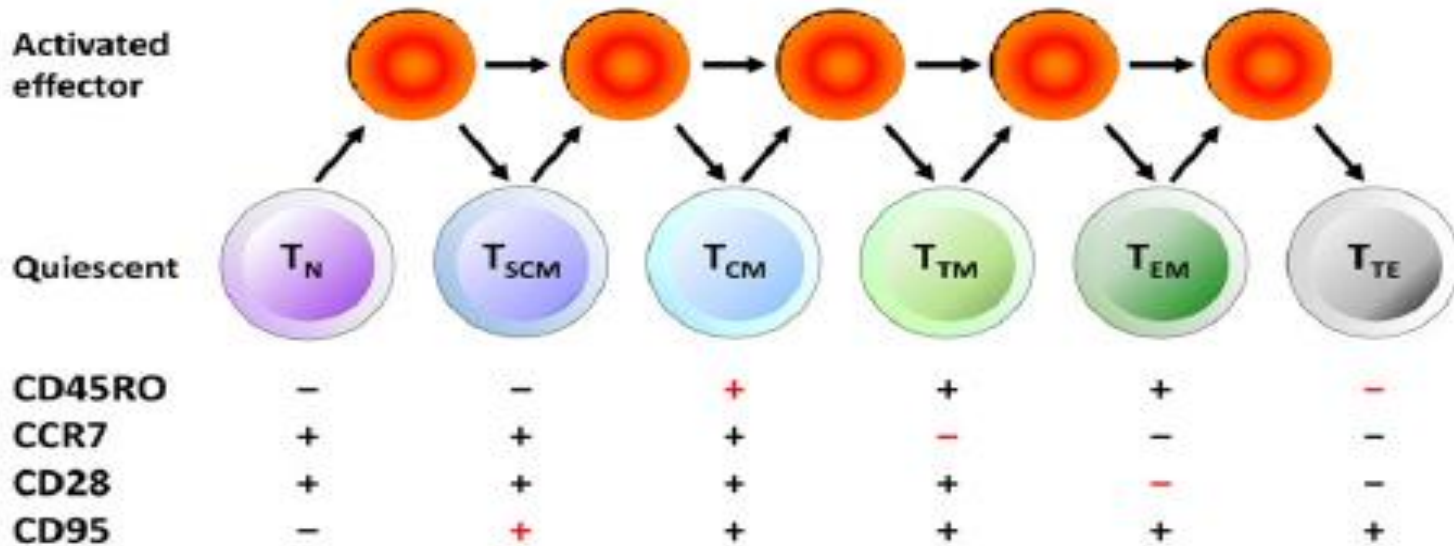
Διαφοροποίηση CD8+ κυττάρου



Διαφοροποίηση CD8+ κυττάρου

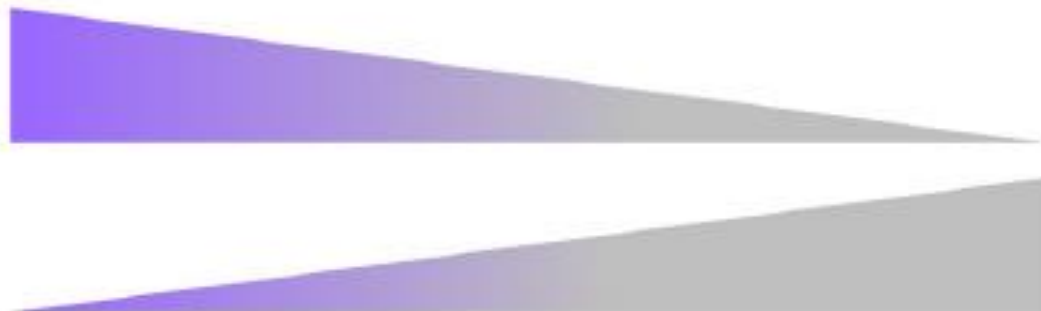
B

Memory compartment: progressive differentiation



Lymphoid homing
Proliferation potential
Self-renewal
Multipotency

Peripheral homing
Effector function
Antigen dependence





Κύτταρα μνήμης

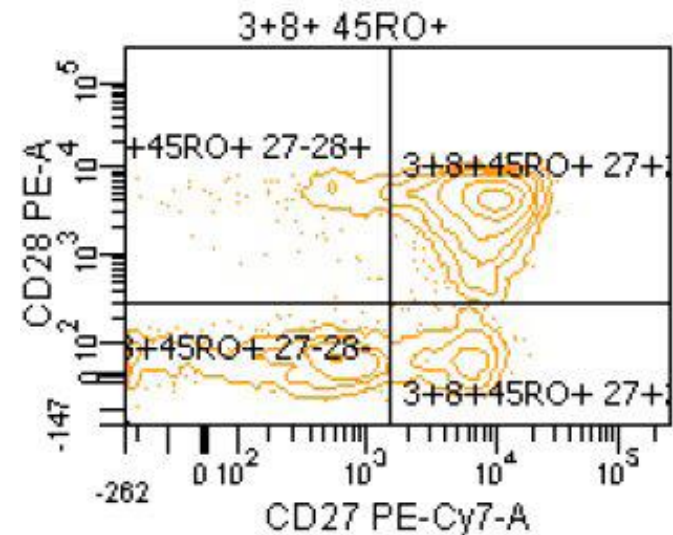
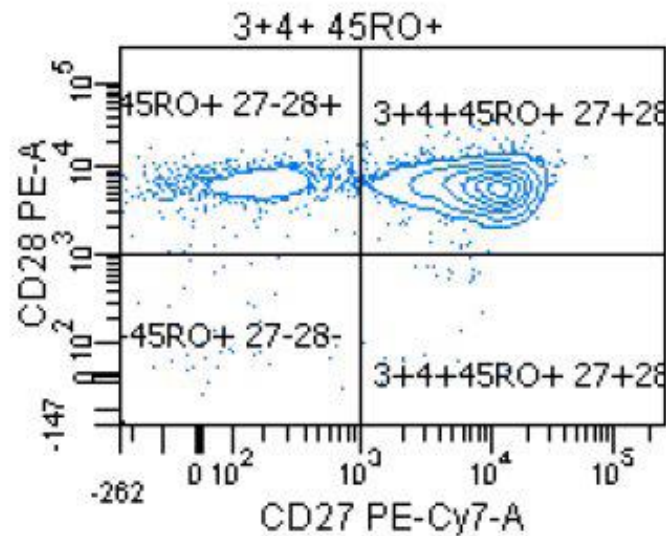
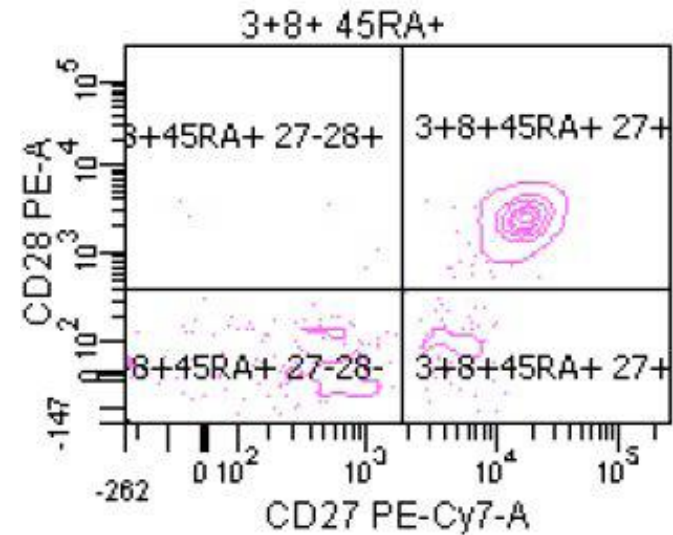
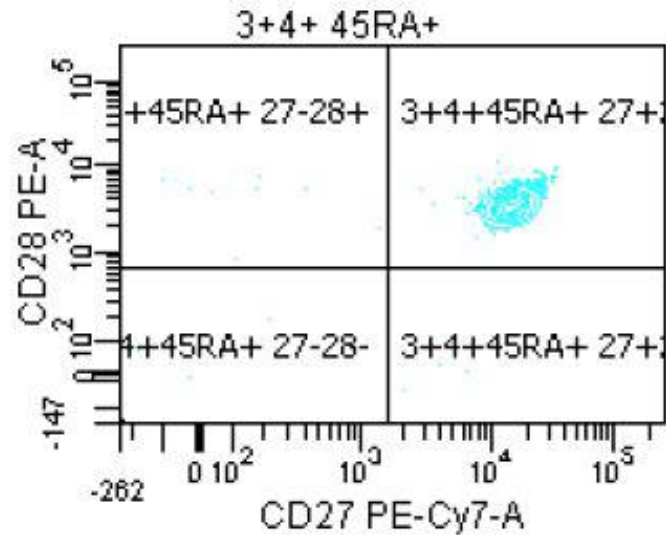
Ένα μέρος από τα ενεργοποιημένα, από Ag T λεμφοκύτταρα διαφοροποιείται σε μακράς διάρκειας ζωής T κύτταρα μνήμης

Επιβιώνουν ακόμη και μετά την εξάλειψη της λοίμωξης, δηλαδή όταν παύουν να υπάρχουν το Ag και η φυσική ανοσοαπάντηση

Χαρακτηρίζονται από τους δείκτες CD45+RO

Η IL-7 απαιτείται για την επιβίωση των CD4 και των CD8 T μνημονικών εκφράζουν τον υποδοχέα της IL-7Rα ή CD127)

CD4 and CD8 / CD45RA and CD45RO / CD27 and CD28





Παρθένα Τ κύτταρα

CD3+ CD45RA+CD45RO-CCR7+CD62L+,

Κεντρικής μνήμης

CD45RA-CD45RO+CCR7+CD62L+,

Δραστικά μνήμης

CD45RA-CD45RO+CCR7-CD62L-,

Δραστικά Τ κύτταρα

CD45RA+CD45RO-CCR7-CD62L-.

Εργαστηριακή μελέτη των ρυθμιστικών κυττάρων



Υπάρχουν δυο βασικά προβλήματα.

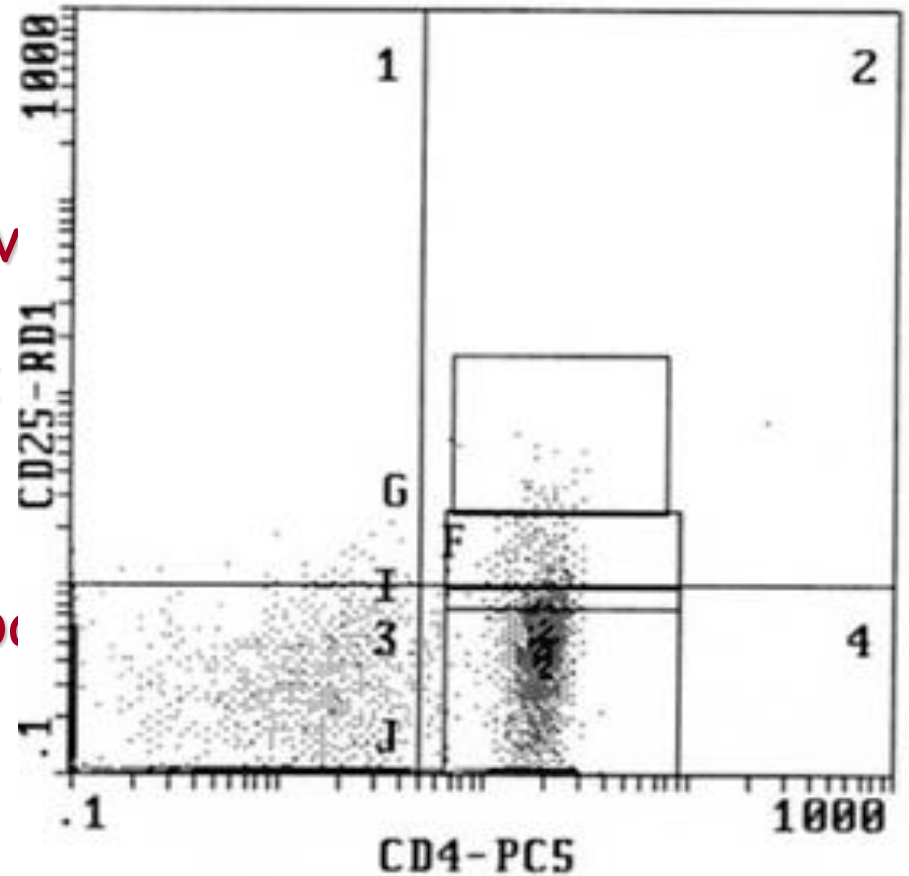
Η αναγνώριση ενός «καθαρού» πληθυσμού που θα μπορεί να απομονωθεί και να μελετηθεί.

Στις περιπτώσεις μελέτης νοσημάτων, υπάρχει ακόμα η αμφιβολία αν οι κυτταρικοί δείκτες που θεωρούνται πλέον ειδικοί για τα T ρυθμιστικά, παραμένουν σε όλα τα στάδια ανάπτυξης της νόσου, αντιπροσωπευτικοί για το συγκεκριμένο πληθυσμό.

Αναγνώριση του κυτταρικού πληθυσμού

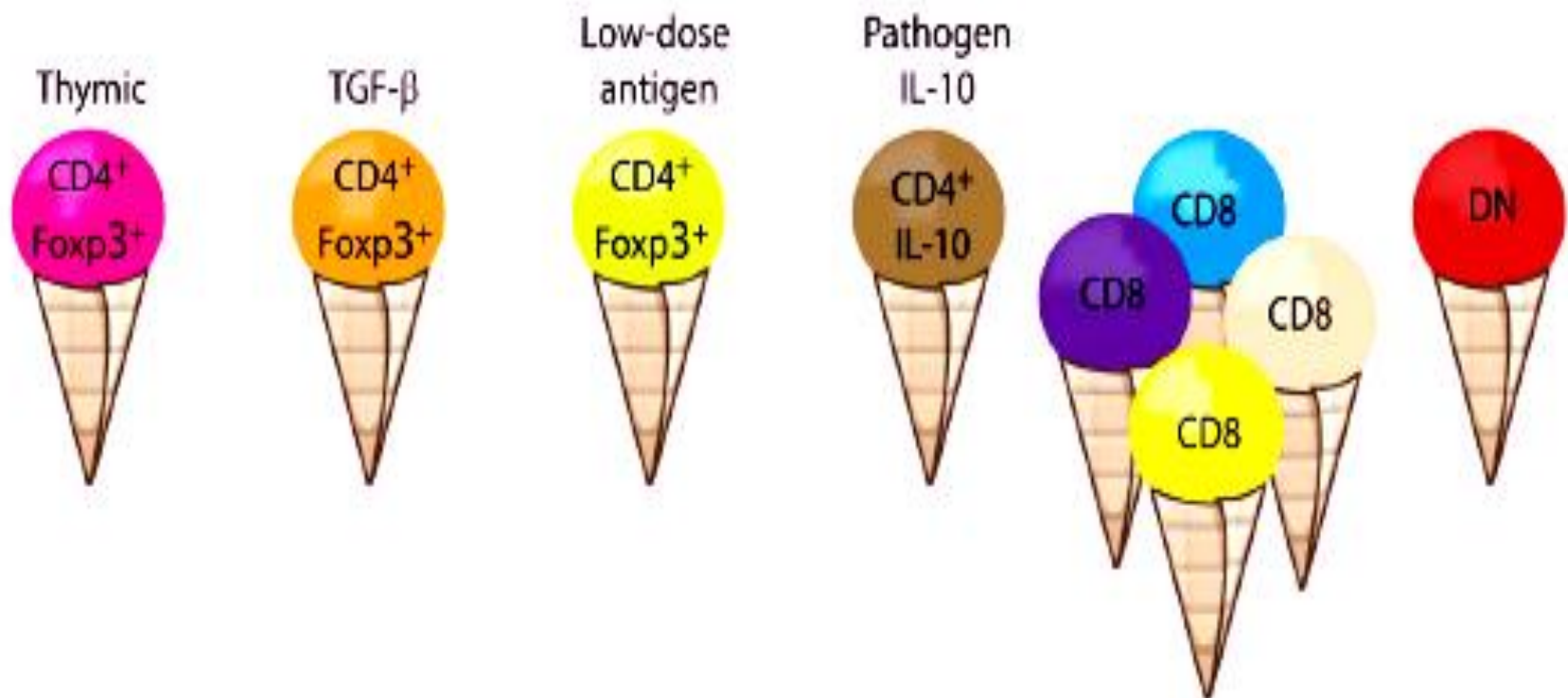
Η διαφορική διάκριση μεταξύ Tregs και T ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων στηρίζεται στην ένταση φθορισμού του CD25+.

Τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονται από υψηλής έντασης CD25+, είναι δηλαδή CD4+CD25+high ενώ τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα είναι CD4+CD25+dim



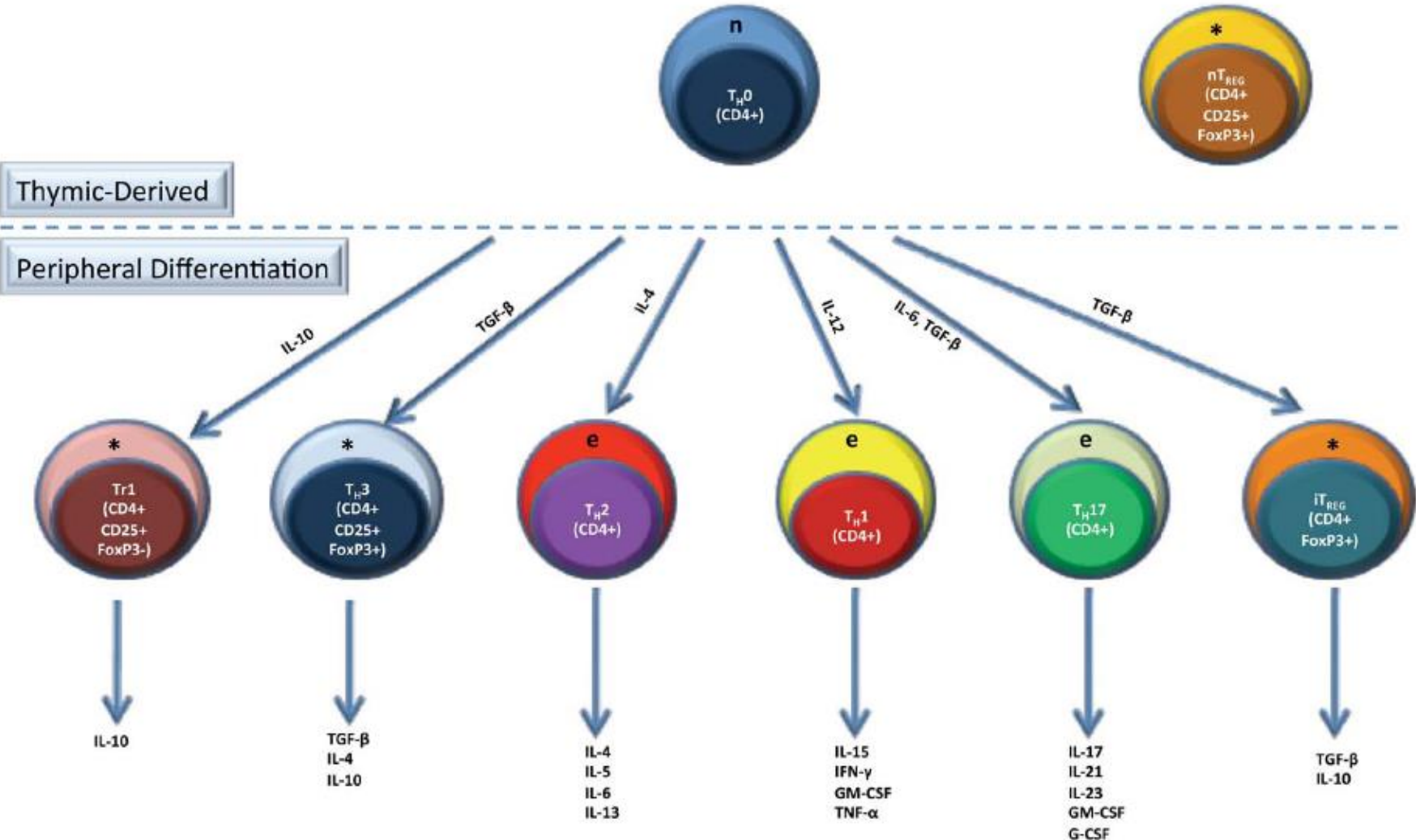
From Vanilla to 28 Flavors: Multiple Varieties of T Regulatory Cells

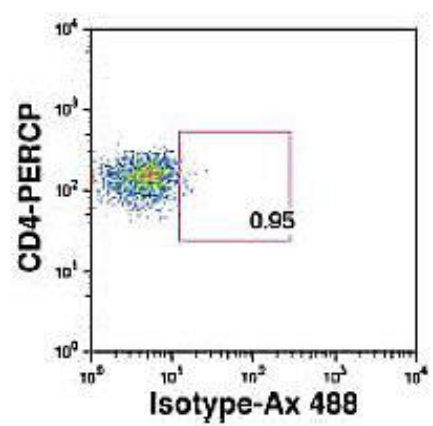
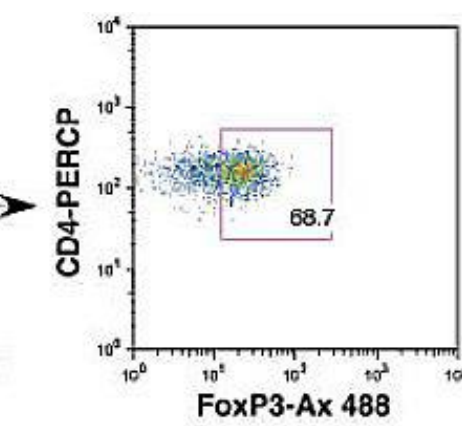
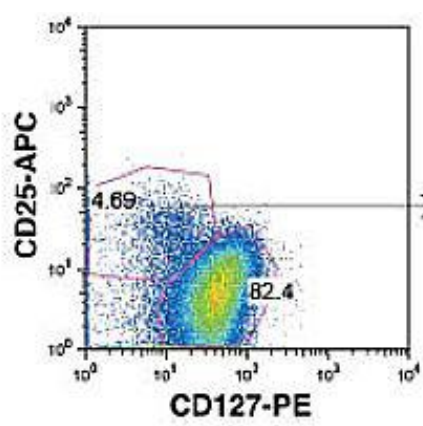
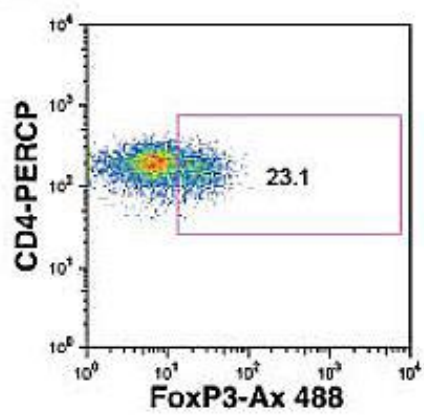
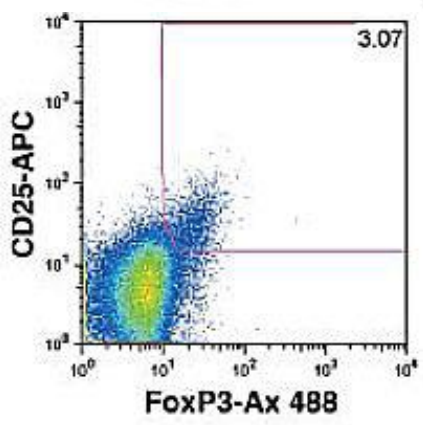
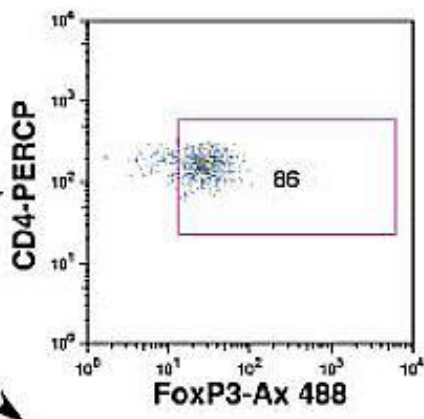
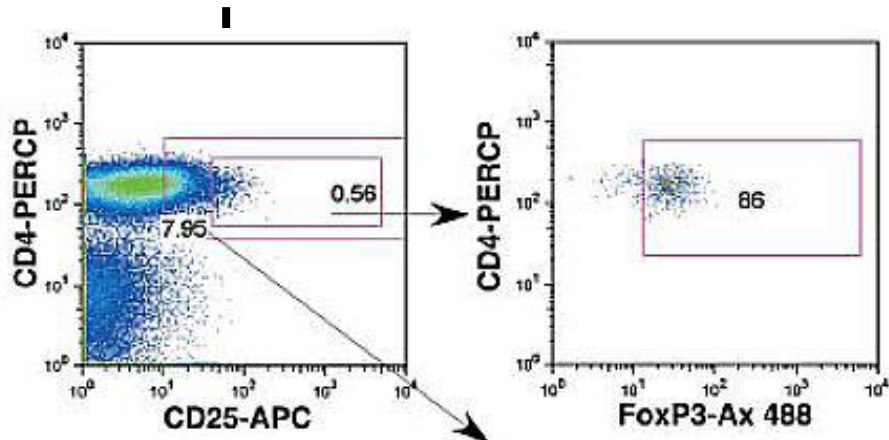
Τα $CD4+CD25^{high}$ μπορούν να προσδιοριστούν με κυτταρομετρία ροής μόνο με τη χρήση τουλάχιστον τετραπλου φθορισμού και ανάλογων ιστοτυπικών control, καθώς και με τη συνδυαστική προσέγγιση διαφόρων επιφανειακών και ενδοκυττάριων δεικτών.





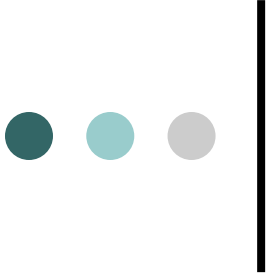
* = regulatory T-cells; n = naïve T-cells; e = effector T-cells





**Αναγνώριση και μέτρηση Tregs:
CD4+CD25+HiCD127-FoxP3+**

Validated Clinical Protocol:
FoxP3 Alexa FI 488 (Clone 206D)
CD127 PE
CD4 PerCP
CD3 PE-CY7
CD25 APC
Fix/Perm kit by eBioscience



Μέχρι τώρα, κανένας κυτταρικός δείκτης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιπροσωπευτικός για τον πληθυσμό των Tregs.

Ο συνδυασμός όλο και περισσότερων δεικτών με διάφορες λειτουργικές δοκιμασίες μειώνει το ποσοστό «επιμόλυνσης» του επιλεγμένου πληθυσμού.

