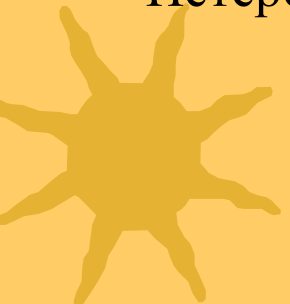





НК клетки: новые представления.



Проф.Калинина Н.М., Всероссийский центр
экстренной и радиационной медицины МЧС России, Санкт-
Петербург



Система врожденного иммунитета

Неспецифическое распознавание

Система
комплемента

гранулоцит

моноцит
(макрофаг)

естественный
киллер

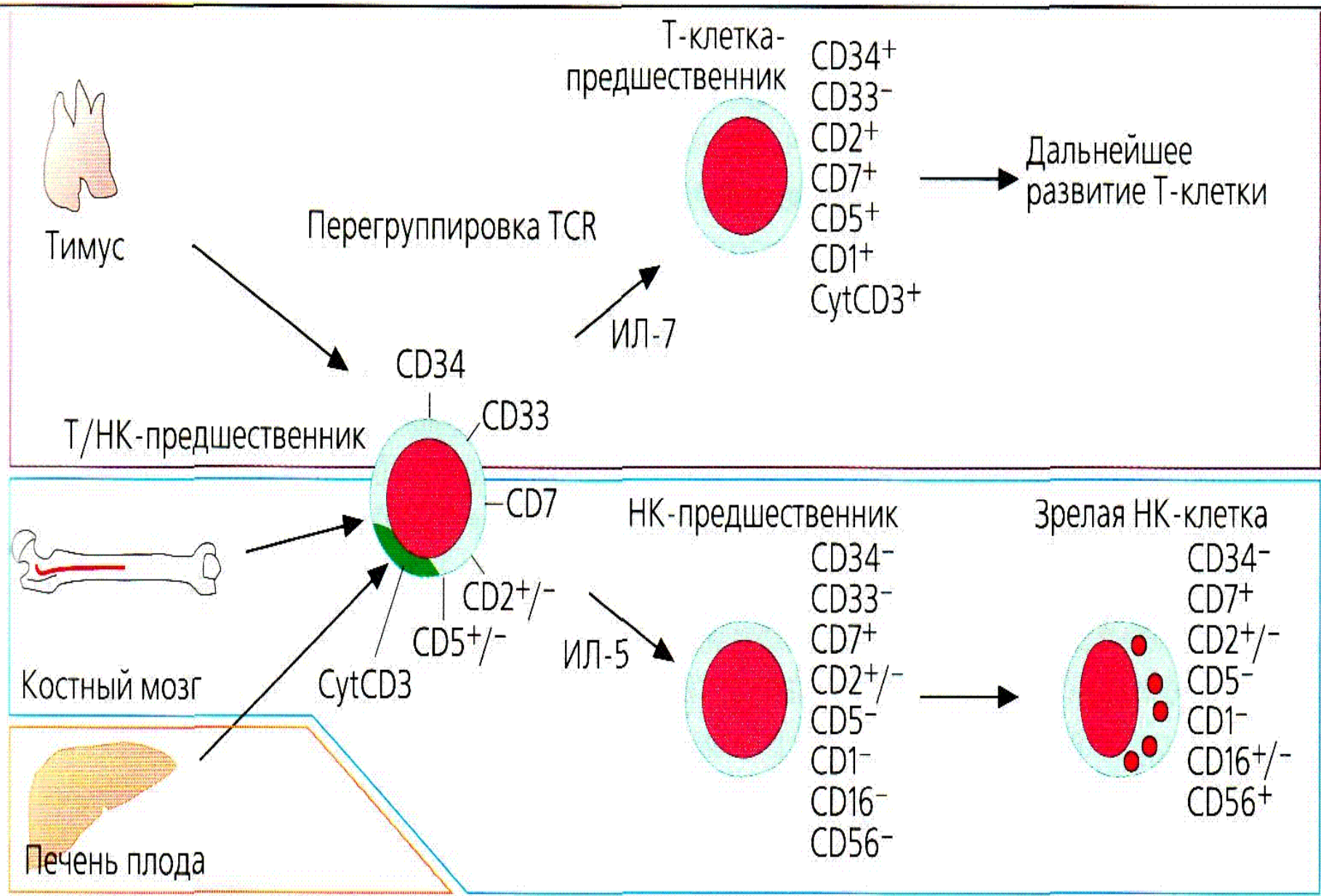
Активация

Э ф ф е к т

Нейтрализация и уничтожение
внеклеточных патогенов

Э ф ф е к т

Лизис клеток, инфицированных
внутриклеточным патогеном



А. Развитие клеток-киллеров



Субпопуляции НК-клеток



CD16 bright CD56 dim –90% - в периферической крови, в красной пульпе селезенки



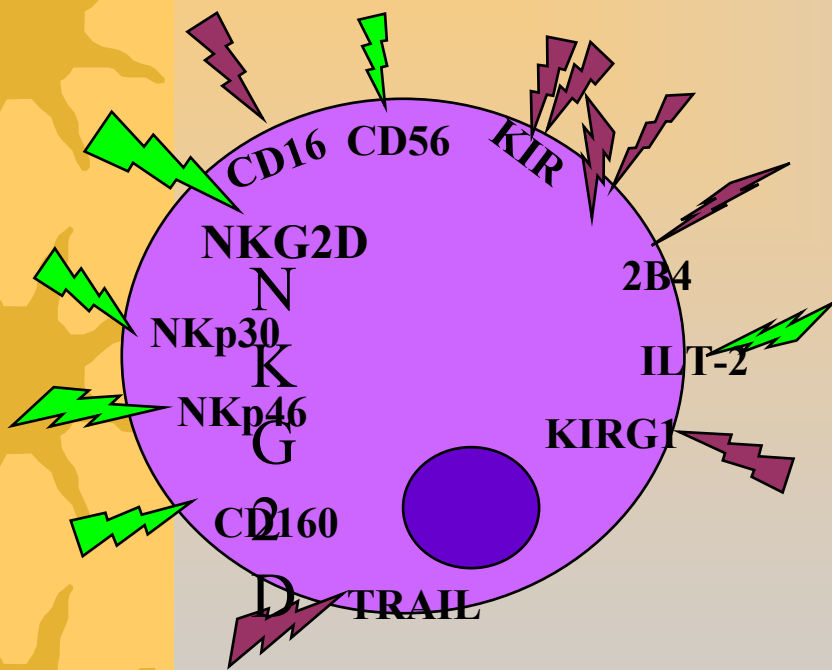
CD56 bright CD16 dim



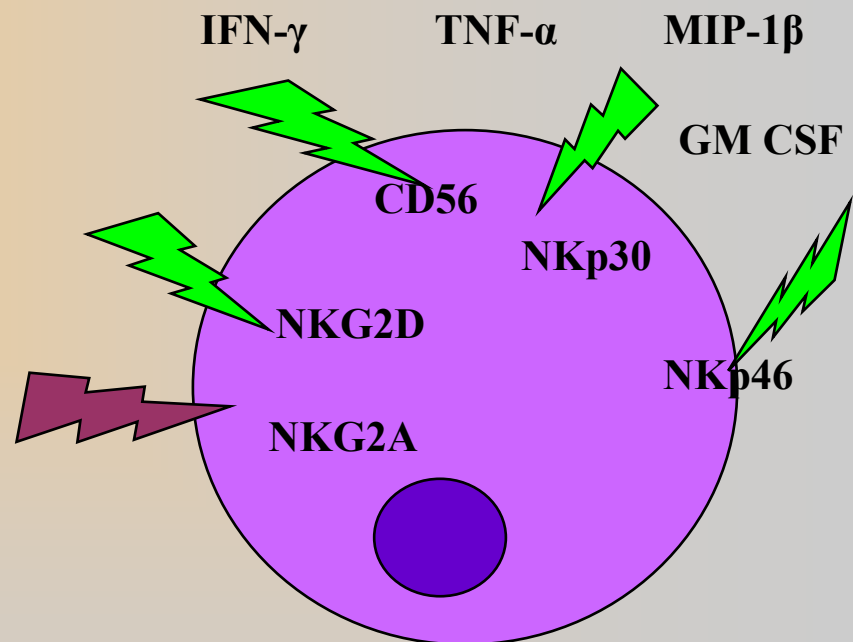
CD56 bright CD16 - локализуются в печени, эндометрии, в децидуальной оболочке, в периферической крови их количество минимально- не более 10%



Характеристики НК -клеток



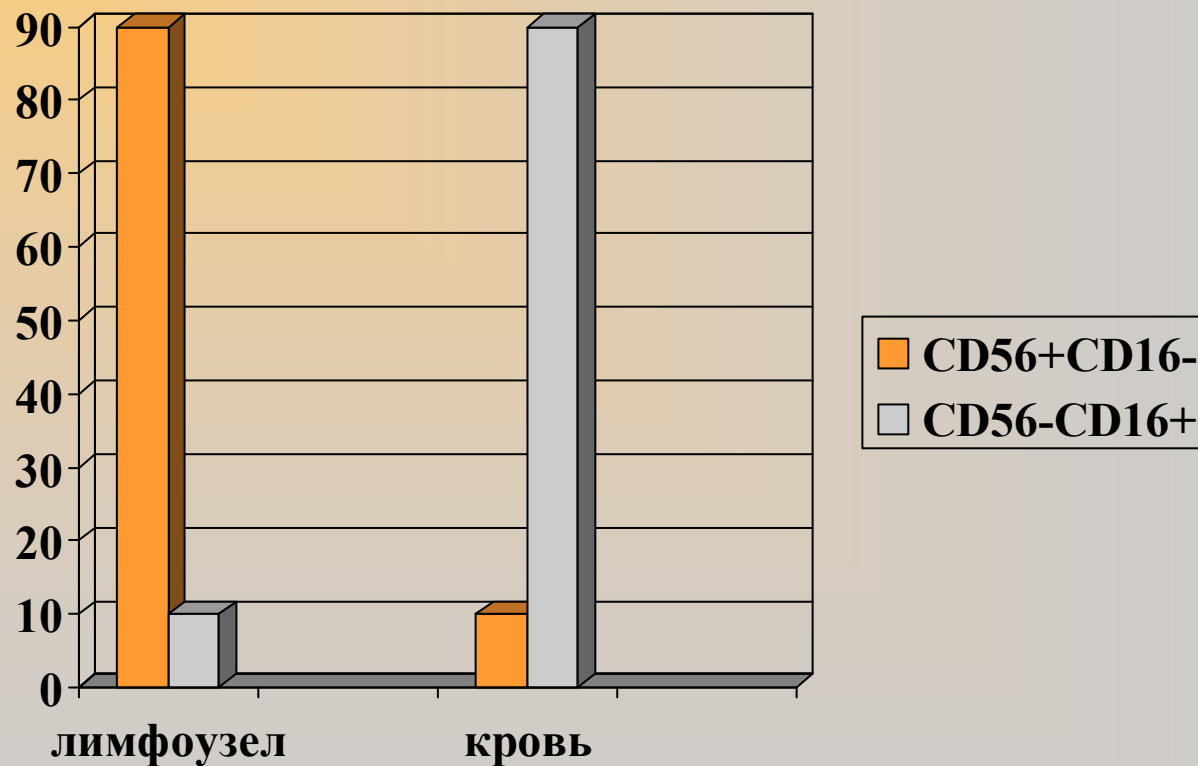
CD56 dim



CD56 bright



Соотношение субпопуляций НК-клеток





Рецепторы НК-клеток(1)

Рецепторы	CD16 bright, CD56 dim	CD56 bright, CD16 dim
CD94-NKG2A+	±	++
CD2	++ (лиганды- CD58,CD59, CD2L)	--
KIR	+++	1-8%



Рецепторы NK-клеток (2)- KIR

- ★ Killer Ig-like receptor включает 2-3 иммуноглобулин подобных домена.
- ★ Трансмембранные участки, соединены с короткой или длинными цитоплазматическими цепями
- ★ Длинная цитоплазматическая цепь содержит последовательность ITIM-immunoreceptor tyrosine based inhibitor motif, ответственная за ингибирование цитотоксической функции и синтеза цитокинов NK-клетками
- ★ У KIR с короткими цитоплазматическими цепями имеется заряженный трансмембранный участок и проводящая сигнал молекула DAP-12. В ее состав входит последовательность ITAM -immunoreceptor tyrosine based activator motif – проведение сигнала через эту последовательность приводит к активации NK-клеток.

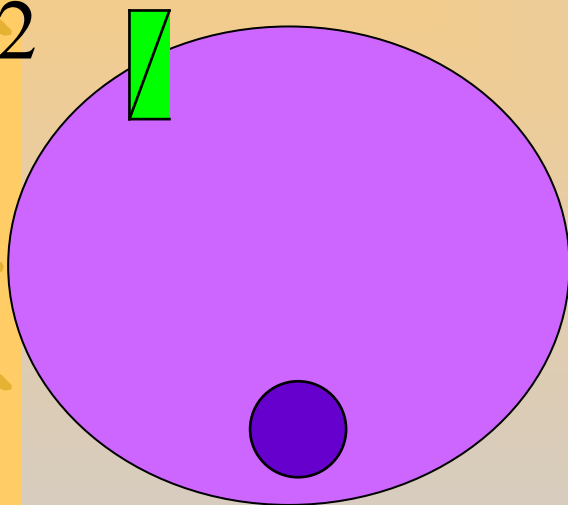


Рецепторы NK клеток(3)

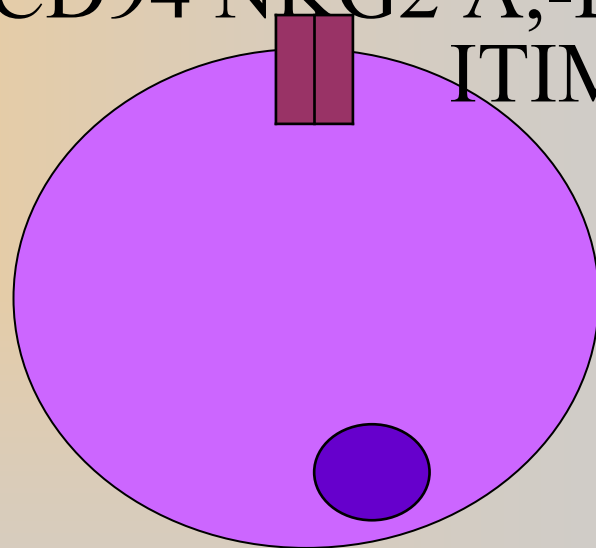
NK-клетка

NK-клетка

CD94
DAP-2
NKG2 C,-E



CD94
NKG2 A,-B
ITIM



NKG2-A или B-ингибирующие эффекторные функции NK-клеток, NKG2-C, E- активирующие эффекторные функции NK-клеток



Рецепторы NK-клеток(4)

Название	Функция	Примечания
CD160-NKR-P1	Активация NK	HLA-независимый
NKp46	Активация NK	
NKp44	Активация NK	
-NKp30	Активация NK	
NKG2D	Активация NK	Дополнительный
2B4, NKp80	Активация NK	Корецепторы



Эффекторная функция НК клеток включает несколько этапов



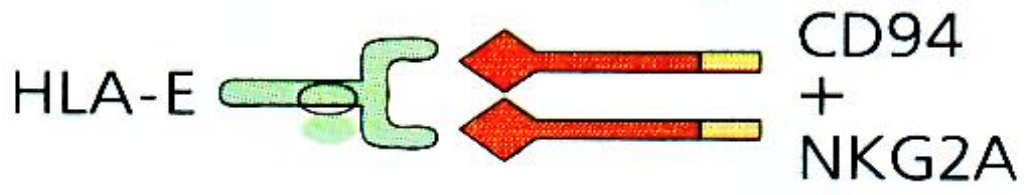
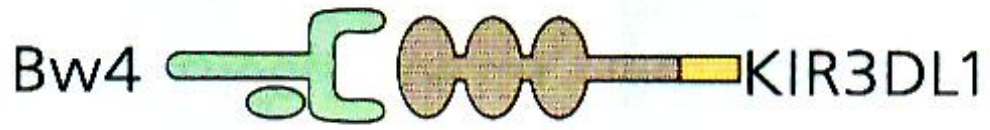
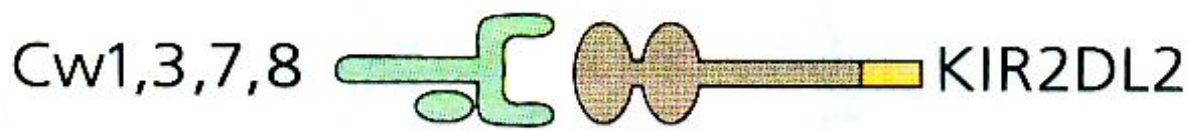
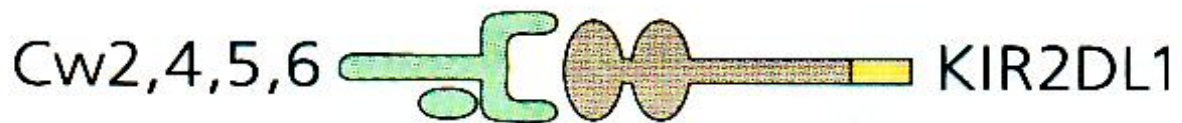
★ Распознавание и активация.



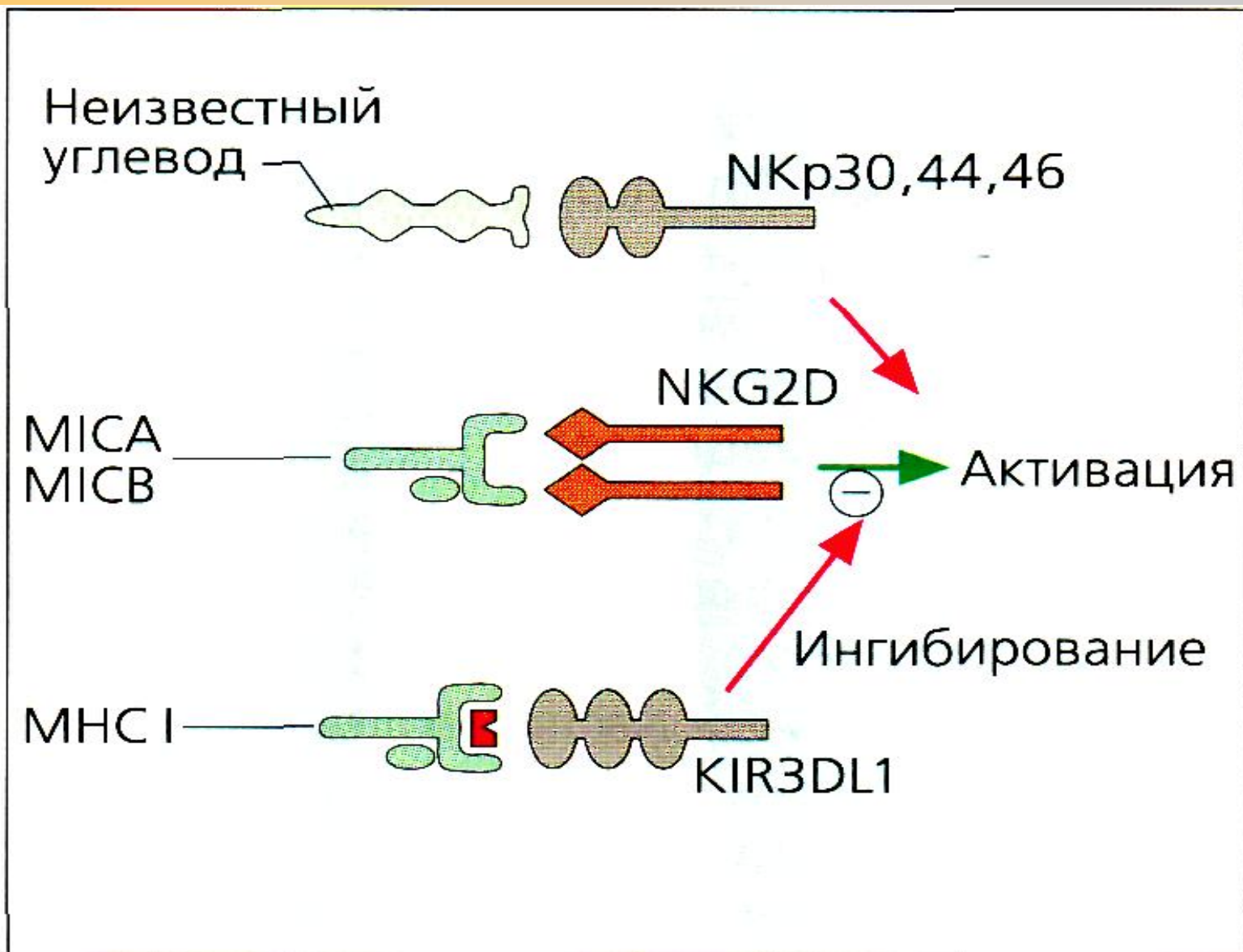
★ формирование контакта (для взаимодействия с мишенью-2-5 минут, 5-15 минут для стабилизации контактов и взаимной ориентации клеток)



★ Инициация апоптоза клетки -мишени



В. Ингибиторные рецепторы НК-клеток



Б. Узнавание мишени клетками-киллерами



Молекулы адгезии на НК клетках

- ★ CD58 (LFA-3)
- ★ CD54
- ★ CD2
- ★ CD11a/CD18 (LFA-1)

Распознавание на клетках-мишенях собственных молекул МНС первого класса приводит к трансдукции ингибирующего сигнала , нарушению адгезии менее , чем за 5 минут и активации KIR(ITIM)

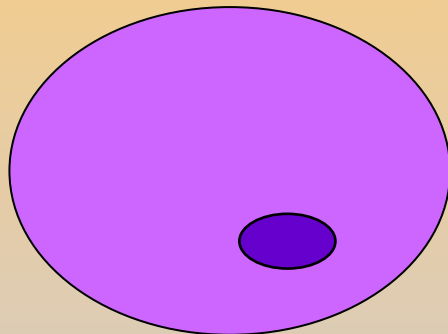




Апоптоз клеток-мишеней с использованием «домена смерти»

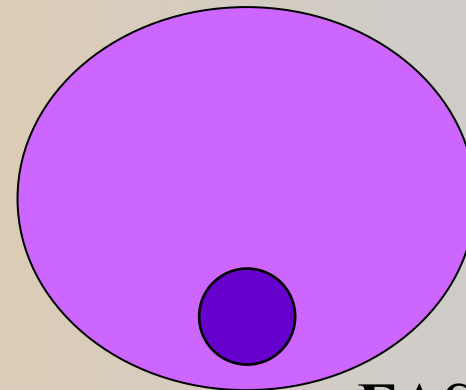


Клетка-мишень



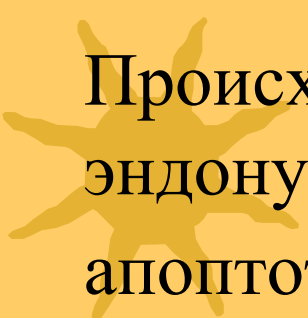
**FAS-L,
TNF-a**

НК-клетка



**FAS,
TNF-R**

Происходит активация каспаз, которые активируют эндонуклеазы, что приводит к фрагментации ДНК и апоптотической гибели клеток-мишеней.





Перфорин-опосредованный апоптоз+некроз



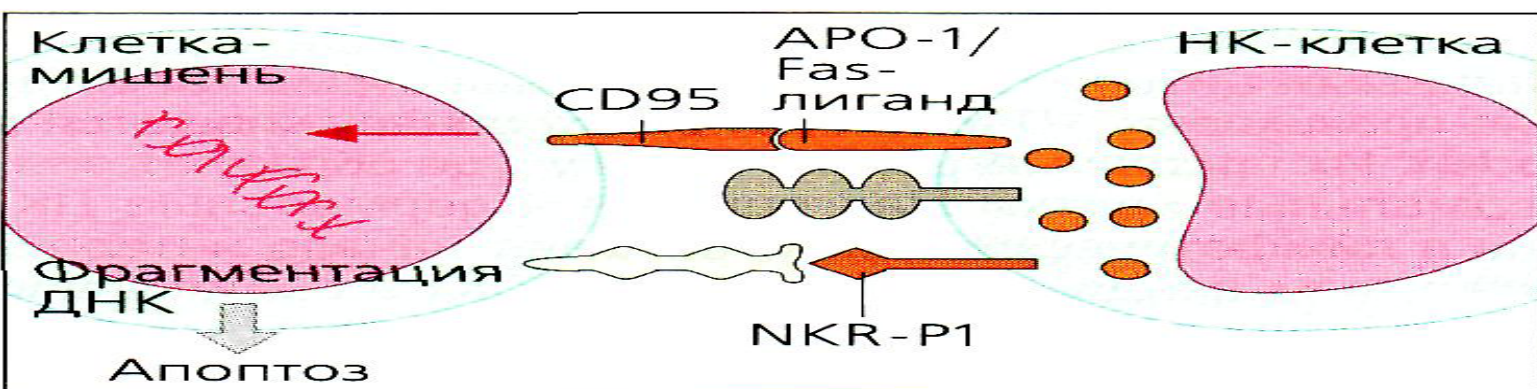
★ Перфорин-белок с молекулярной массой 66000-70000



★ Для формирования канала в мембране клетки достаточно 2-3- молекул перфорины



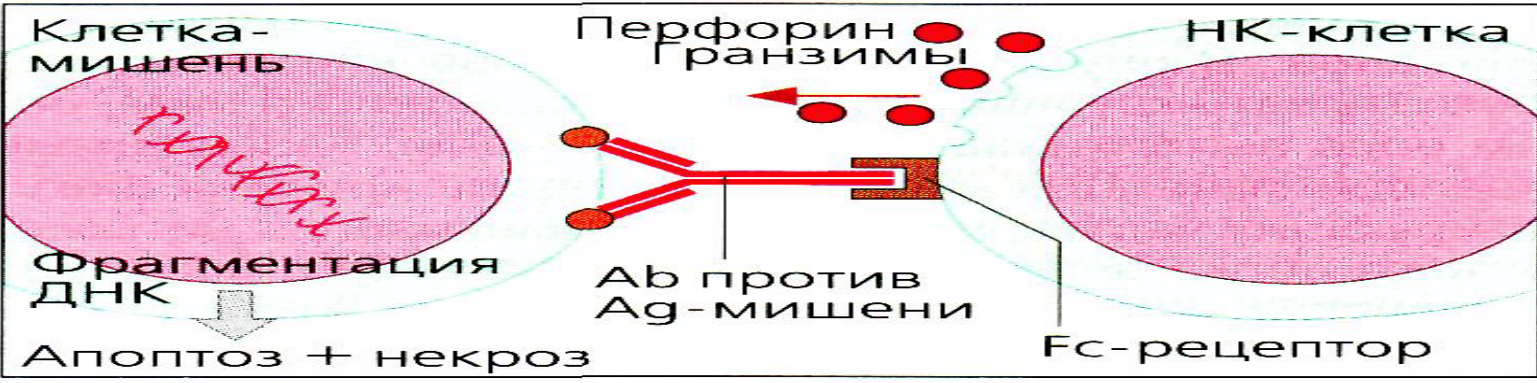
★ Гранзимы могут попадать через канал в клетку или через рецептор маннозы-6-фосфат



1. Несекреторный лизис



2. Секреторный лизис



3. Антителозависимая клеточная цитотоксичность

Г. Механизмы цитотоксического действия клеток-киллеров



Ингибиторы цитотоксической активности НК-клеток



★ Сывороточный ингибитор протеаз PI-9/SPI –6 инактивирует гранзим В и перфорин



★ Vcl-2 –блокирует активность каспаз 3 и 8, активированных гранзимом В.



★ Антиапоптотический белок с-FLIP(TNF-TNFR)



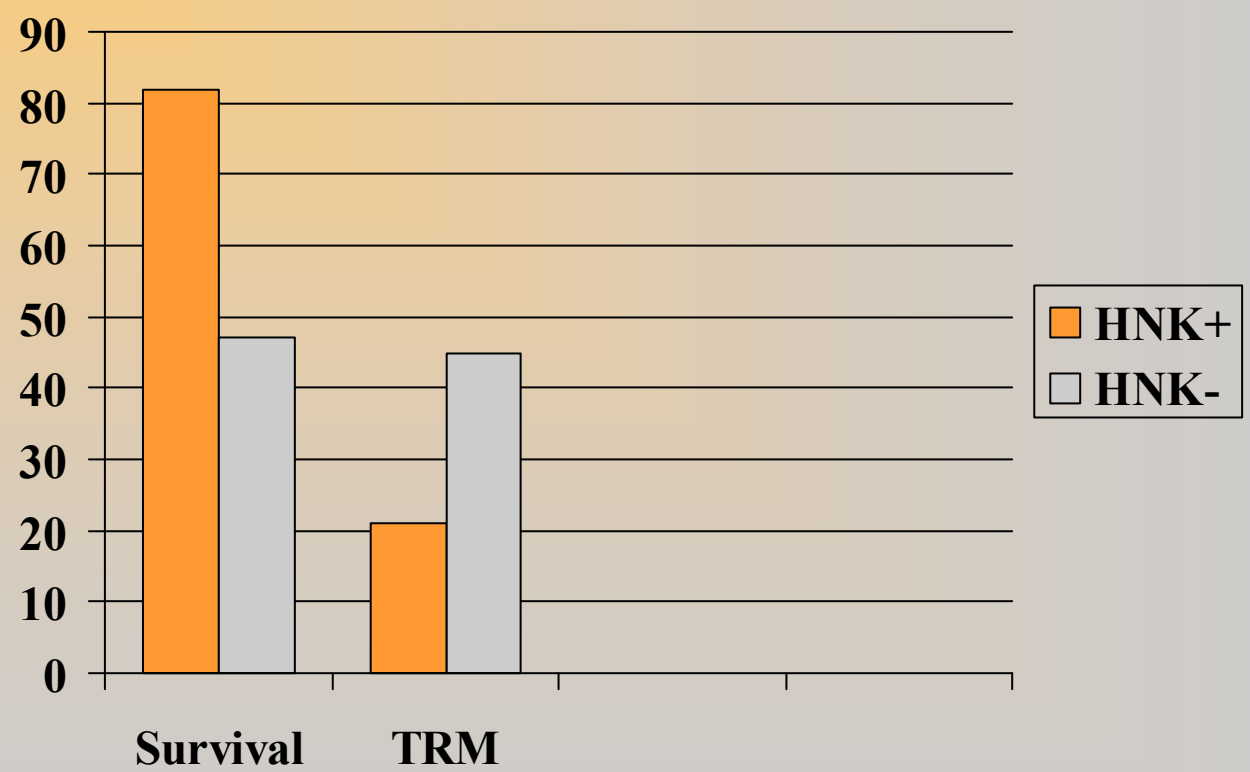
Espinosa J.L Takami A et al,2009 Влияние полиморфизма NKG2D на исход HLA совместимой трансплантации костного мозга пациентам с лейкозами (145 пар)



	LNK1/LNK1	HNK1/LNK1	HNK1/HN K1
доноры	43%	42%	15%
реципиенты	35%	45%	20%

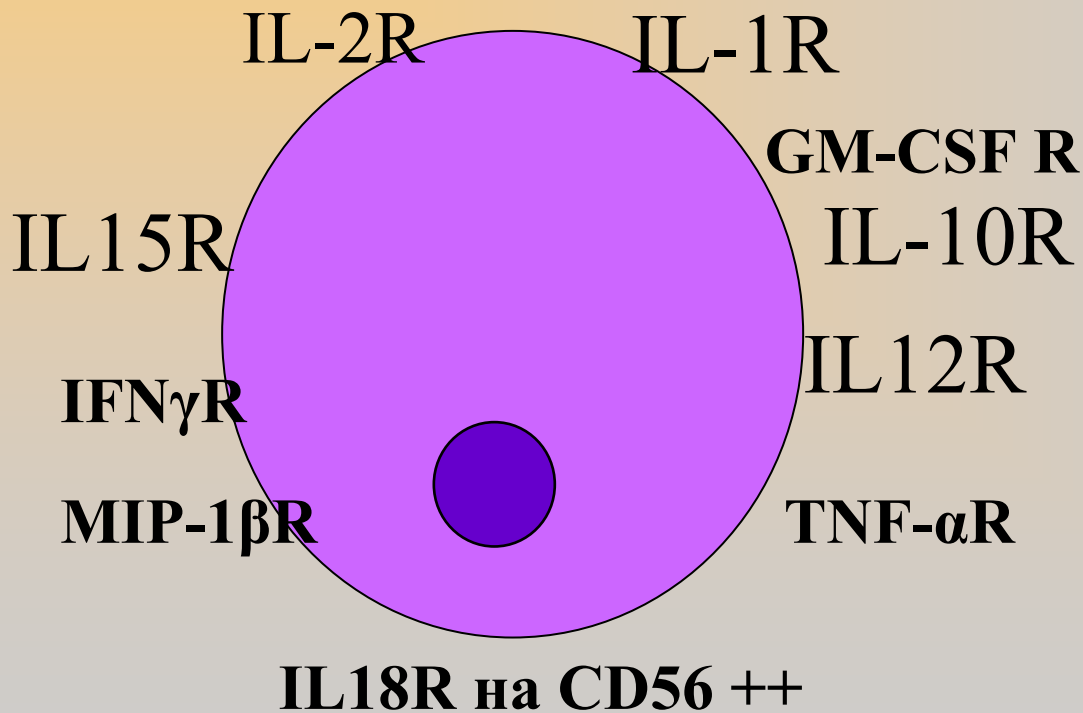


Espinosa J.L Takami A et al,2009 Влияние полиморфизма NKG2D на исход HLA совместимой трансплантации костного мозга пациентам с лейкозами (145 пар)





ЦИТОКИНЫ- регуляторы активности НК-клеток



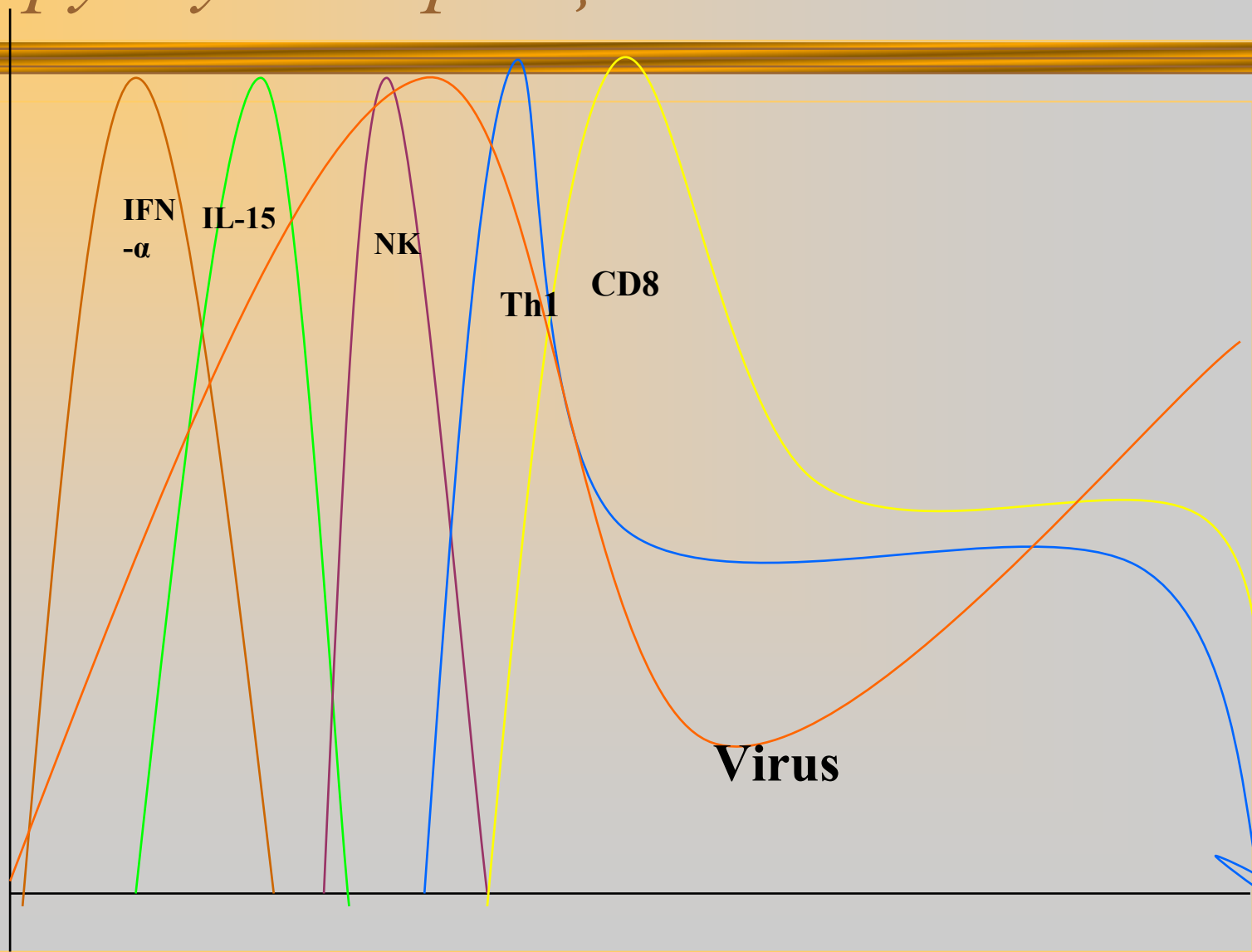


Цитокины – регуляторы активности НК-клеток

Цитокин	Эффекты
IL2 IL15	Вызывает пролиферацию, усиливает синтетическую и цитотоксическую функции, увеличение экспрессии молекул адгезии, индуцирует продукцию провоспалительного IL-32 НК-клетками
IFN-g	усиливает цитотоксическую функцию.
IL12, GM-CSF	усиливает цитотоксическую функцию
IL-18	усиливает цитотоксическую функцию и экспрессию IFN-g, защищает НК-клетки от самодеструкции, снижает активность каспазы-3 и повышает длительность жизни ингибиторов апоптоза



Кинетика иммунного ответа на вирусную инфекцию





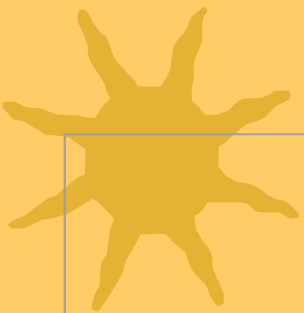
Зависимость количества клеток-эффекторов в группах пациентов от степени снижения дифференцировки ткани опухоли

	Группа Сравнения (n=15)	G1 (n=10)	G2 (n=18)	G3 (n=12)
CD16 ⁺ 56 ⁻ %	4,9±3,9	15,8±5,2 *	10,7±6,4 **	9,4±4,2 ****
CD16 ⁺ 56 ⁺ %	10,6±4,6	7,6±3,4 **	5,2±2,05 **	4,8±2,7 **
CD16 ⁻ 56 ⁺ %	1,3± 0,96	1,4±1,2	2,8±1,4 ***	3,6±0,96 ****
CD16 ⁺ %	13,9±4,3	23,9±4,1 *	14,8±3,8	15,3±6,5
CD56 ⁺ %	1,7±0,9	2,4±0,7	3,3±1,9 *	6,4±2,1 ***

достоверные отличия от группы сравнения * - p<0,0002, ** - p<0,002, *** - p<0,03, ****- p<0,01



Уровень спонтанной цитотоксической активности НК –клеток в группе пациентов на фоне снижения степени дифференцировки ткани аденокарцином эндометрия



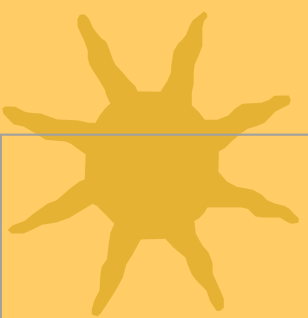
	Группа Сравнения (n=15)	G1 (n=10)	G2 (n=18)	G3 (n=12)
Спонтанная цитотоксическая активность (%)	38,35±5,5	38,08±5,1	24,9±6,7*	14,2±5,8**

достоверные отличия от группы сравнения * $p < 0,0001$, ** $p < 0,00001$





Динамика спонтанной цитотоксической активности НК-клеток групп пациенток в зависимости от стадии заболевания



	Группа сравнения (n=15)	Стадия заболевания		
		I-a (n=12)	I-б (n=15)	I-с (n=14)
Спонтанная цитотоксическая активность (%)	38,35±5,5	38,08±5,1	23,4±5,8 **	16,4± 8*

достоверные отличия от группы сравнения -* $p < 0,0000005$, ** $p < 0,0005$



*Сопоставление с показателями группы сравнения индуцированной цитотоксической активности **НК-клеток** и индекса стимуляции в группах пациентов рандомизированных по степени дифференцировки аденокарцином*

Сравниваемые группы	Индекс стимуляции	Индуцированная цитотоксическая Активность(%)
Группа сравнения	1,16±0,22	39,7±17,1
С высокодифференцированными аденокарциномами	1,50±0,57 ***	57,73±12,35 **
С умеренодифференцированными аденокарциномами	1,49±0,64 ***	34,77±12,56
С низкодифференцированными аденокарциномами	2,21±0,65 *	28,78±9,68% ****

* – достоверные отличия от группы сравнения (p<0,00001), ** – (p<0,004), *** – (p<0,01)



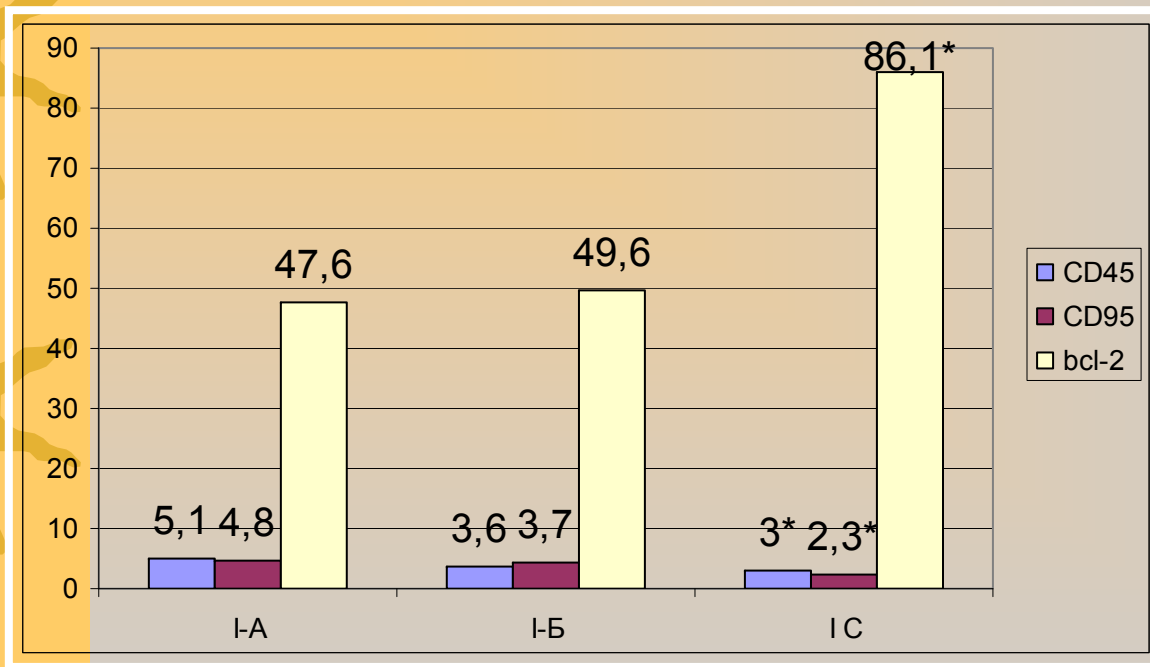
Сопоставление с показателями группы сравнения индуцированной цитотоксической активности и индекса стимуляции в группах пациентов, рандомизированных по стадиям заболевания

Сравниваемые группы	Индекс стимуляции	Индуцированная цитотоксическая активность (%)
Группа сравнения	1,16±0,22	39,7±17,1
С РТМ Ia	1,32±0,69	52,29±19,96 ***
С РТМ Ib	1,66±0,69 **	37,42±16,74
С РТМ I-c	2,16±0,67 *	31,35±11,34

* – достоверные отличия от группы сравнения (p<0,00001), * (p<0,001), ** – (p<0,01) ***



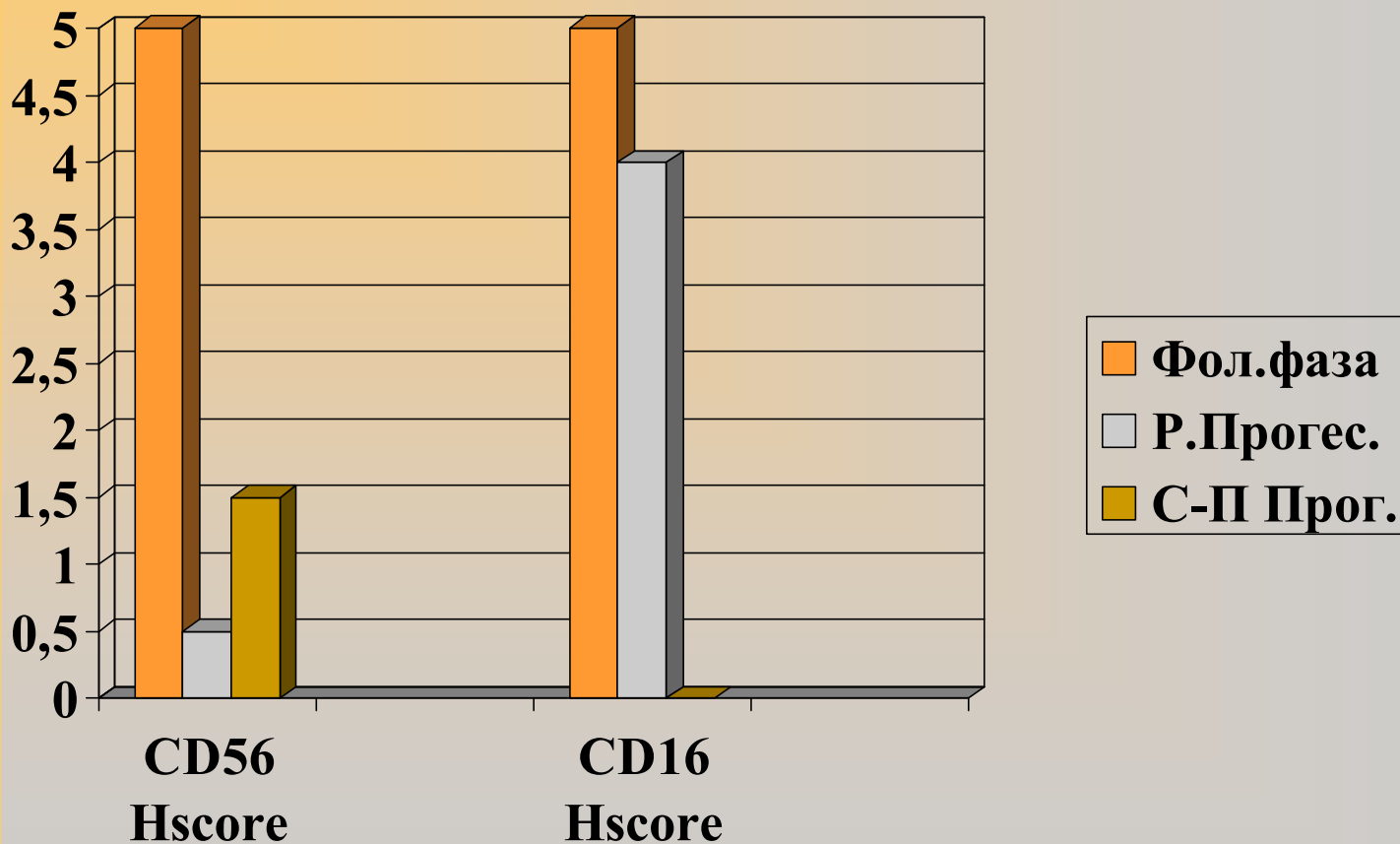
Количество лимфоцитов, инфильтрирующих ткань неоплазмы и клеток аденокарцином, несущих маркеры CD45, CD95 и bcl-2 при I стадии рака тела матки в %



* -различия достоверны при сравнении параметров групп пациентов при Ia и Ic стадиях ($p < 0,05$)



Сравнительная характеристика инфильтрации эндометрия НК клетками в норме (n=10) в различные фазы цикла



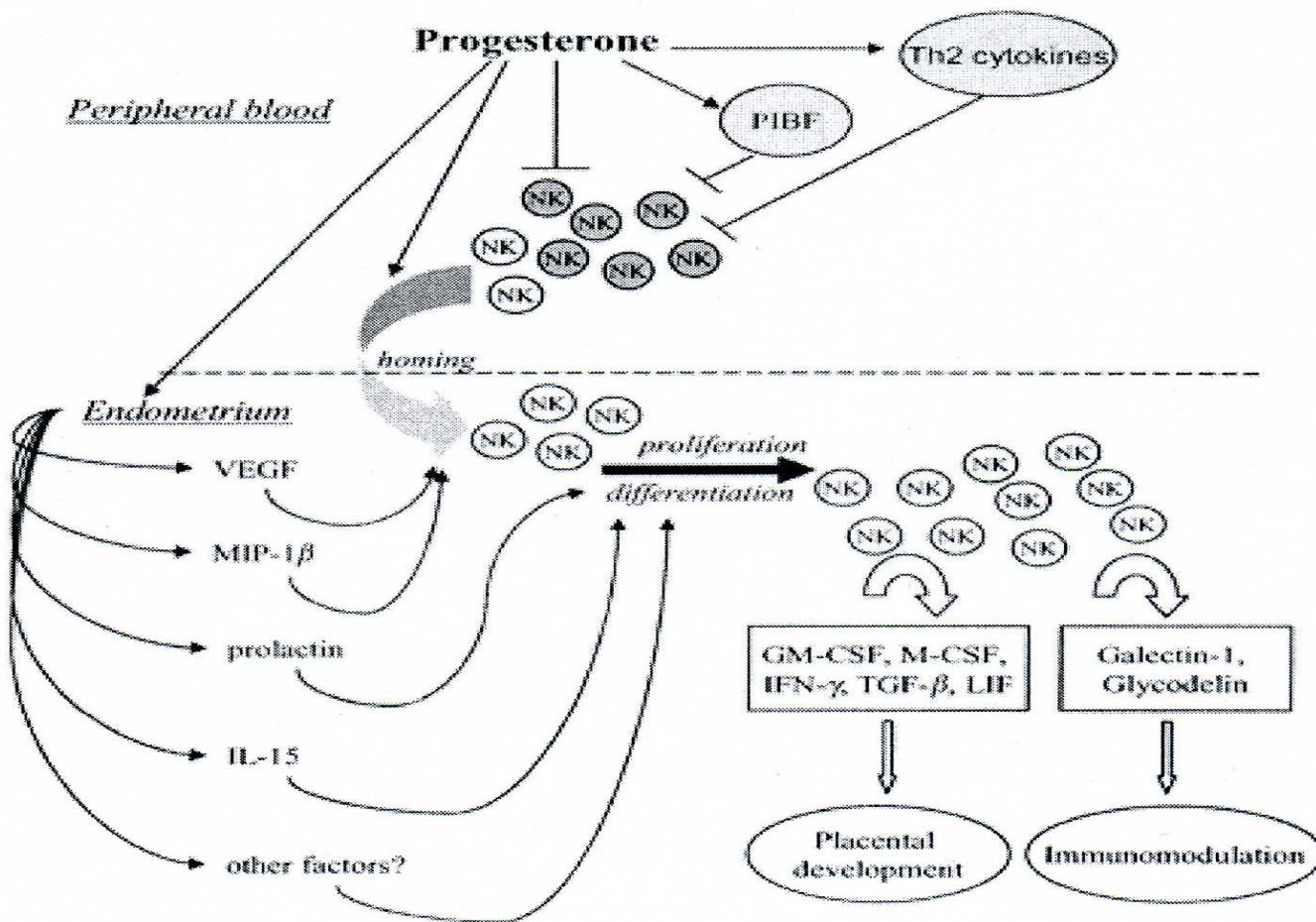
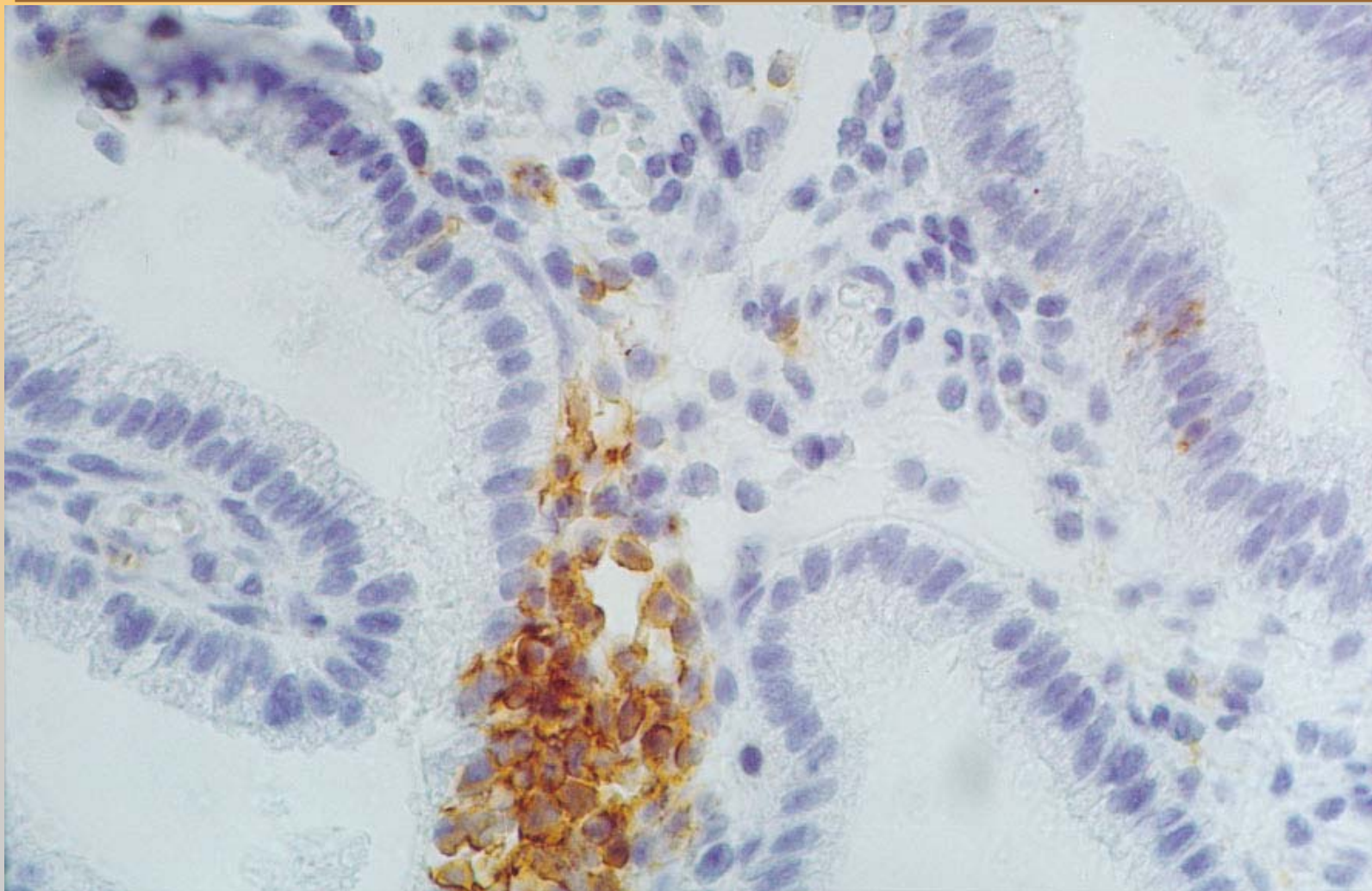


FIG. 1. A model of hormonal regulation of NK cells in pregnancy. In pregnancy, progesterone causes a decrease in peripheral NK cell numbers, activation, and cytotoxicity via direct action on NK cells and/or through promoting Th2 cytokine and PIBF production by T cells. It also facilitates NK cell homing to the endometrium, via inducing expression of homing receptors and addressins on peripheral NK cells and the endometrium, respectively, and possibly through induction of VEGF and MIP-1 β expression by the endometrium. Endometrial stromal cells, under the influence of progesterone, produce IL-15, prolactin, and likely other unidentified factors, which may regulate uNK cell proliferation, differentiation, and production of cytokines and other molecules that support placental and trophoblast development and promote local immunomodulation. \circ , CD56^{bright} CD16⁻ NK cells; \bullet , CD56^{dim} CD16⁺ NK cells.



*Клетки эндометрия,
инфильтрированные CD16+CD56-
NK клетками (хр.эндометрит)*





Оценка эффективности ЭКО



★ % удавшихся имплантаций

★ Клинические признаки беременности



★ Прогрессирование беременности

★ Рождение живых детей



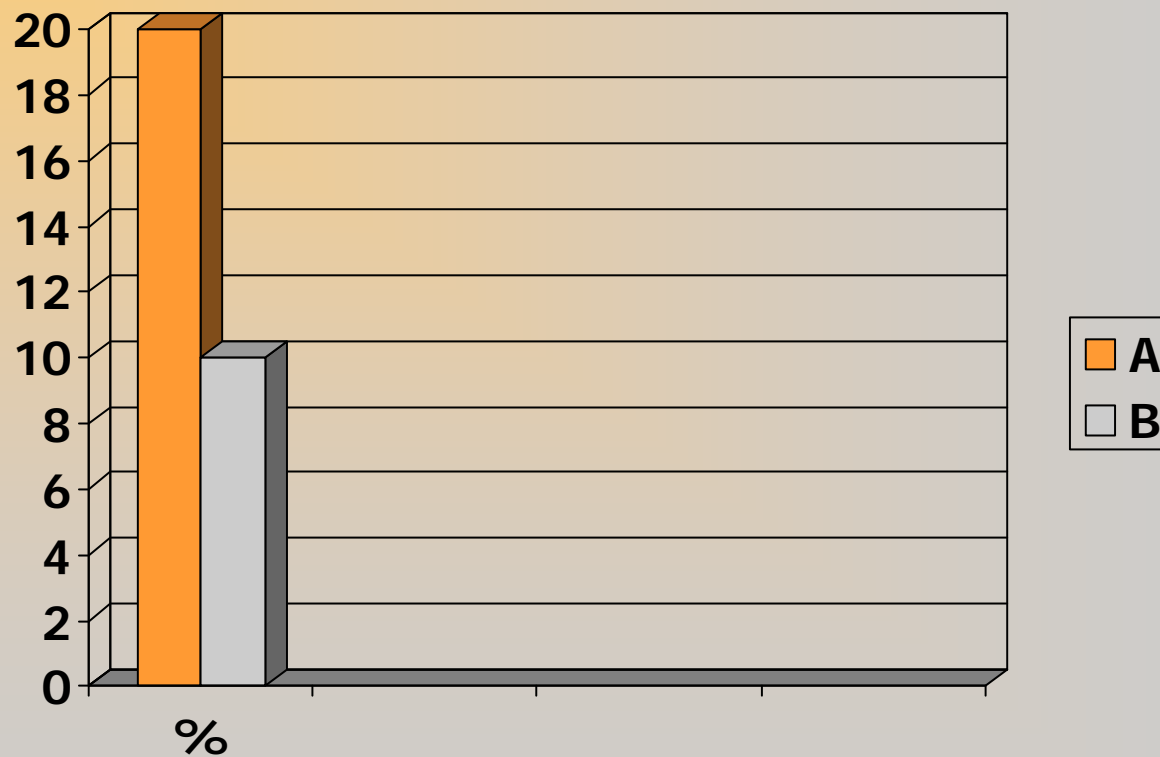


Частота имплантации в зависимости от числа CD16 клеток в эндометрии (А группа- CD16-10-15; В группа –CD16 25-30)





Частота развивающихся беременностей в зависимости от числа CD16 клеток в эндометрии (А группа- CD16-10-15; В группа –CD16 25-30)





Частота родов живым ребенком в зависимости от числа CD16 клеток в эндометрии (А группа- CD16-10-15, В группа –CD16 25-30)

