Методы иммунодиагностики нарушений фагоцитарных процессов

Подготовил Казарин Георгий

Методы определения хемотаксиса лимфоцитов

- Исследование хемотаксиса в трансвелл-планшетах
- Метод миграции под агарозой

Исследование хемотаксиса в трансвелл-планшетах

- Клетки проходят через мембрану по градиенту хемоаттрактанта
- Не прилипающие клетки выделяют и подсчитывают на проточном цитометре
- Прилипающие клетки
  - Отделяют от мембраны и подсчитывают
  - Фиксируют на мембране и подсчитывают
- Хемотактический индекс вычисляют как отношение количества клеток в опыте к количеству клеток в контроле
- + простота метода
- - нету белков межклеточного вещества

Метод миграции под агарозой

- Клетки проходят по градиенту по границе дно – агароза
- После инкубации клетки фиксируют в геле, окрашивают и подсчитывают
- Хемотактический индекс вычисляют как разница пройденного пути до лунки с хемоаттрактантом и пути до лунки с контролем
- + физиологичность
- - трудоемкость

Определение адгезивных свойств

- Селектины – «качение» клеток по эндотелию
  - CD62L и CD62E
- Интегрины – плотное крепление к эндотелию
  - CD18, CD11a, CD11b и CD11c

Определение адгезивных свойств

- Использование моноклональных антител и дальнейший подсчет на проточном цитометре или ИФА
- Клетки метят радиоактивными метками и культивируют с эпителиальными клетками. После промывки измеряют радиоактивность
- Окраска клеток прилипших к пластику и измерение оптической плотности. Существует линейная зависимость оптической плотности от количества прилипших клеток

Определение фагоцитарного числа

- ФЧ - число частиц, поглощенное одним фагоцитом
- Объект фагоцитоза – бактерии, вирусы, синтетические частицы
- Световая микроскопия
- Флуоресцентная микроскопия. Позволяет работать с более меньшими частицами – вирусы, хламидии
- Проточная цитометрия. Самая точная и быстрая диагностика.

Краситель – флуоресцеина изотиоционат(ФИТЦ)

GM – среднее геометрическое интенсивности свечения

$$GM\text{фагоцитировавщих кл} - GM\text{ клетки}$$

Определение образования активных форм кислорода (АФК)

- НСТ-тест (восстановление нитросинего тетразолия)
  - Измерения оптической плотности после растворения диформазана
  - Микроскопический метод определения количества гранул
- Проточная цитометрия
  - Индикатор АФК – дихлорофлуоресцеин диацетат
  - Активатор образования АФК – форбол 12-миристат 13-ацетат (ФМА)
  - Оценивают свечение до и после активации образования АФК
- Хемилюменисценция

Определение дегрануляции нейтрофилов

- Два типа гранул в нейтрофилах
  - Азурофильные (CD63)
  - Специфические (CD63b, CD67)
- Нейтрофилы стимулируют к дегрануляции
- Добавляют МАТ к CD63 b CD66b с ФИТЦ - меткой
- Определяют интенсивность средней флуоресценции. По этому параметру определяют экспрессию маркеров

Определение АГ-представляющей функции фагоцитов

- Смешанная лейкоцитарная реакция (CLR)
- АПК нагружают АГ и обрабатывают митомицином или облучают
- Культивируют с наивными Т-лимфоцитами
- Определяют пролиферацию клеток либо продукцию цитокинов