



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 маленькими частицами – вирусы, хламидии
- ▶ Проточная цитометрия. Самая точная и быстрая диагностика.

Краситель – флуоресцеина изотиоционат (ФИТЦ)

GM – среднее геометрическое интенсивности свечения

..... — GM фагоцитировавших кл – GM 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-миристан 13-ацетат (ФМА)
 - Оценивают свечение до и после активации образования АФК
- Хемилюминисценция

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