

Система цитокинов. Методы оценки системы цитокинов.

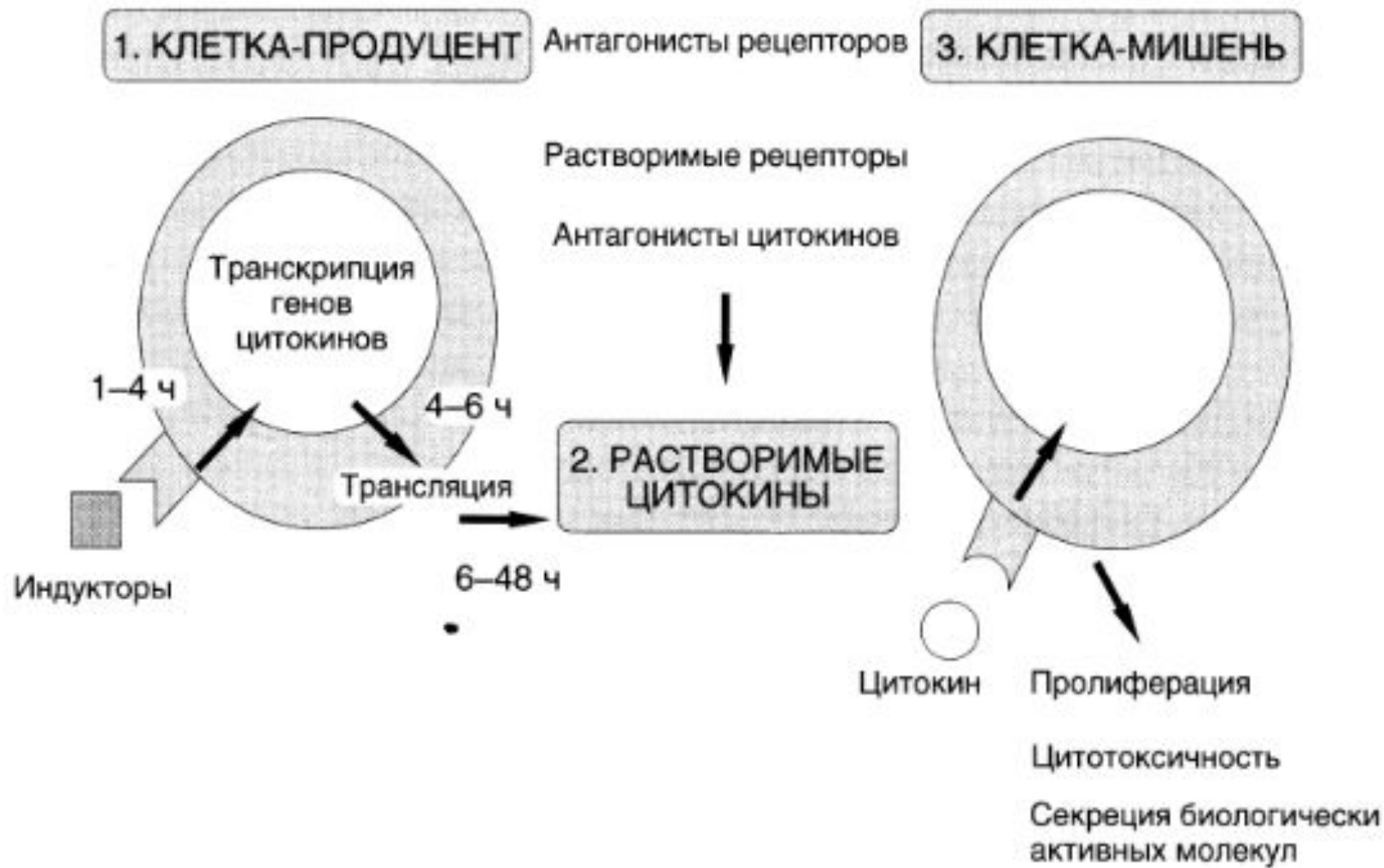
Подготовил студент
471а группы
Черепанов С.А.
Москва 2010.

Ответ клетки на влияние цитокинов зависит от нескольких факторов:

- от типа клеток и их исходной функциональной активности,
- от локальной концентрации цитокина,
- от присутствия других медиаторных молекул.

Таким образом, клетки продуценты, растворимые цитокины и их антагонисты, клетки мишени и их рецепторы формируют систему цитокинов.

Нарушения различных компонентов системы цитокинов приводит к развитию различных патологий, а следовательно, выявление дефектов в этой системе имеет важное значение для правильной постановки диагноза и назначения адекватной терапии.



Система цитокинов.

Клетки продуценты цитокинов:

1) основные продуценты в системе адаптивного иммунитета – лимфоциты

2) в системе врожденного иммунитета – клетки миелоидного ряда

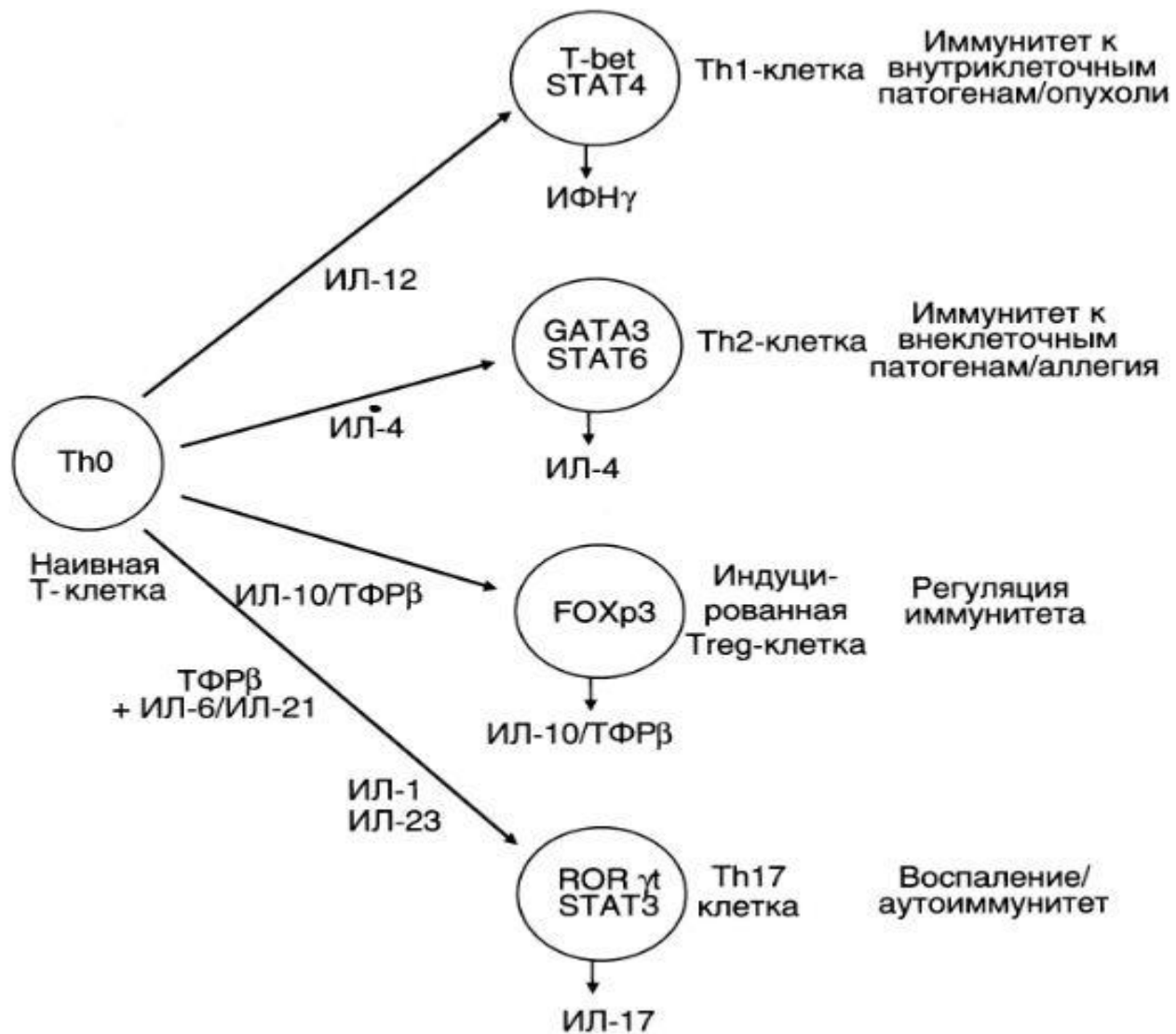
3) клетки не относящиеся к иммунной системе

ЛИМФОЦИТЫ.

При распознавании аг и при участии рецепторных взаимодействий (CD28-CD80/86 для Т-лимфоцитов и CD-40 – CD40L для В-лимфоцитов) происходит активация клеток, приводящая к транскрипции генов цитокинов, трансляции и их секреции в межклеточное пространство.

CD4 Т-хелперы представлены субпопуляциями Th0 (Т-лимфоцит), Th1, Th2, Th17, Tfh, различающихся между собой спектром секретируемых цитокинов. Th0 – не дифференцированная клетка. Остальные – эффекторные клетки.

Направление дифференцировки Th0 регулируют природа аг, его концентрация, локализация в клетке, тип аг-презентирующих клеток (пример - дендритные клетки) и определенный набор цитокинов.

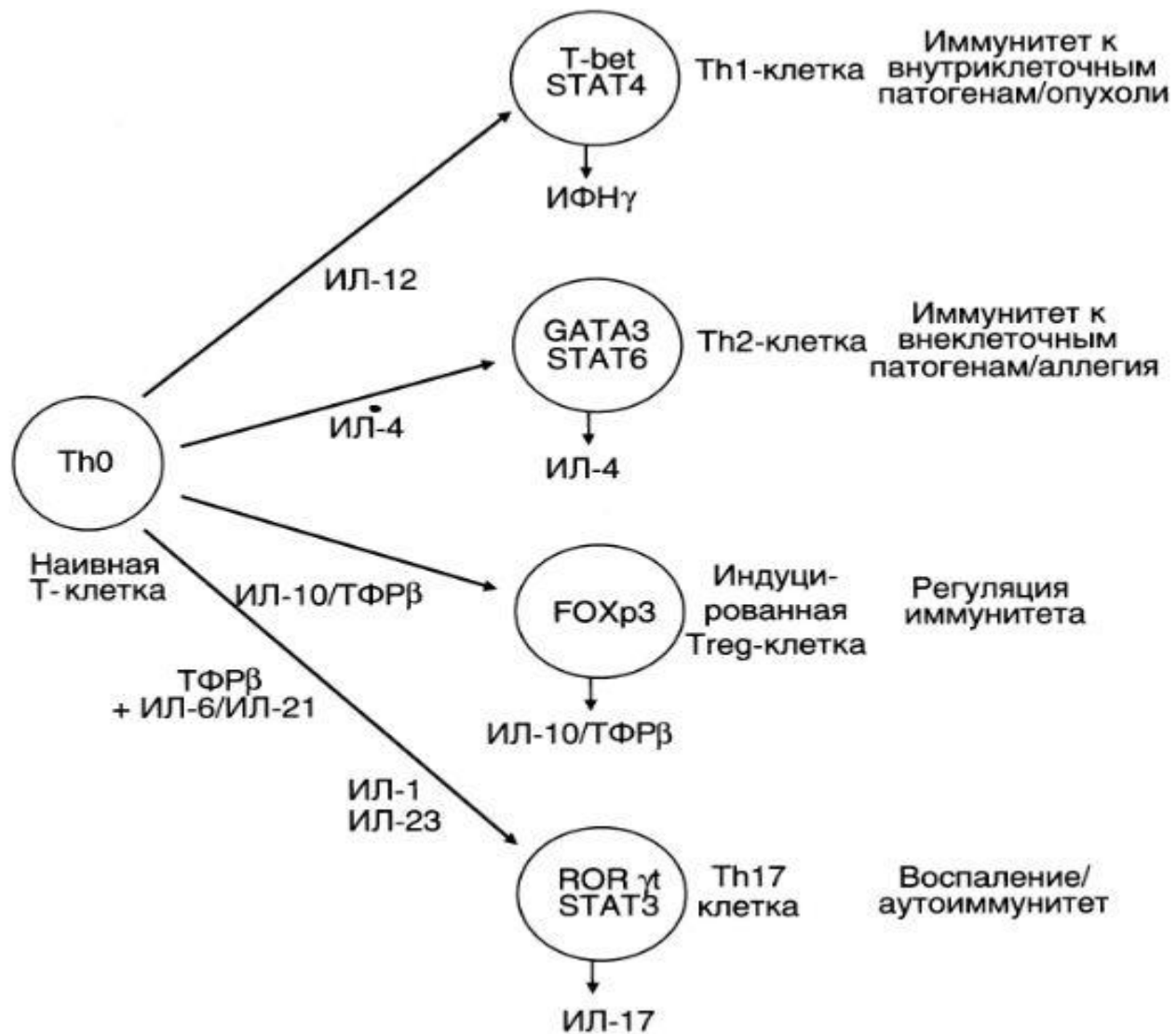


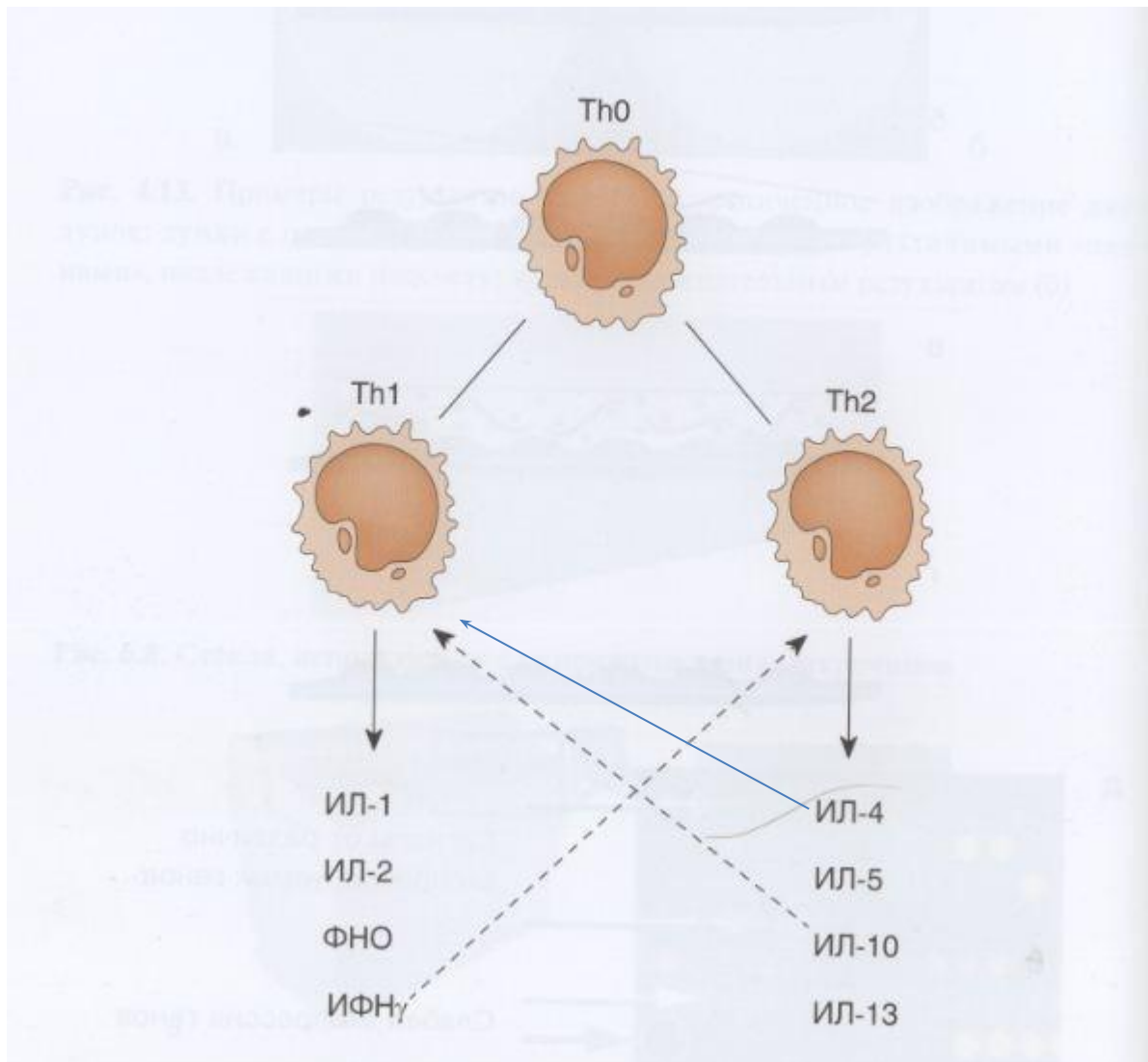
1) Под действием ИЛ-12 происходит дифференцировка Th1 (**LAG-3 маркер**), которые начинают секретировать цитокины (ИЛ-2, ИФН γ , ИЛ-3, ФНО α , лимфотоксины), регулирующие развитие реакций на внутриклеточные патогены (ГЗТ и различные типы клеточной цитотоксичности).

2) ИЛ-4 обеспечивает дифференцировку Th0 в Th2 (**CD-30 маркер**). Th2 вырабатывают цитокины, определяющие пролиферацию В-лимфоцитов, их дальнейшую дифференцировку в плазматические клетки, и развитие реакций антителогенеза на внеклеточные патогены. (ИЛ-4,5,6,13)

3) ИЛ-23,6 ТФР β , вырабатываемы макрофагами и Дендритными клетками (ДК) обеспечивают дифференцировку Th0 в Th17, участвующим в развитии хронического воспаления и аутоиммунной патологии.

4) Кроме того Th0 могут дифференцироваться в естественные клетки регуляторы (CD4, CD25, FOXP3 транскрипционный фактор). Способны подавлять иммунный ответ, опосредуемый Th1 и Th2 клетками, путем прямого межклеточного контакта и синтеза ТФР β , ИЛ-10.





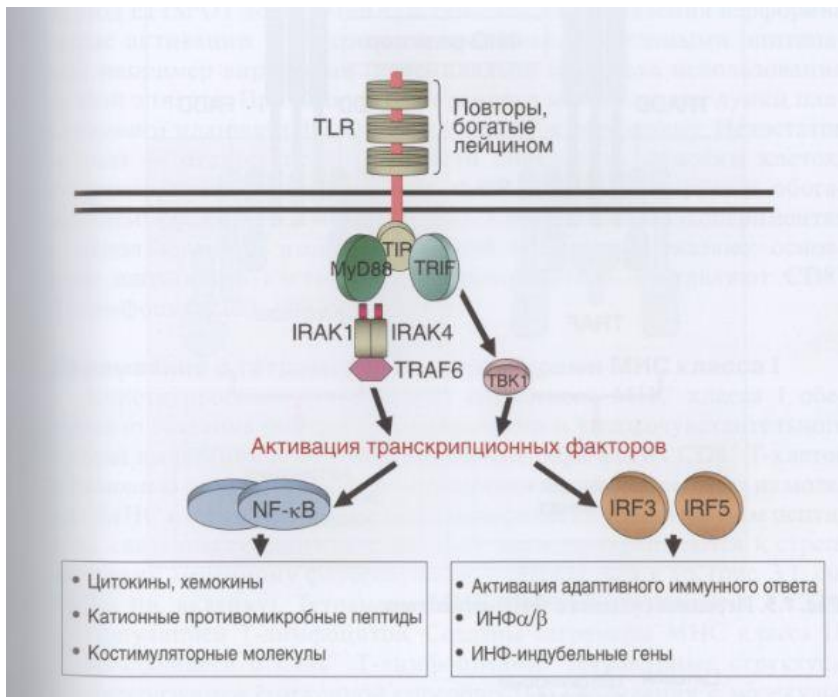
Негативная регуляция.

В организме эти субпопуляции сбалансированы между собой. Избыточная активация одной из субпопуляций Th может определить развитие одного из вариантов иммунного ответа. При хронической несбалансированности активации Th могут формироваться иммунопатологические состояния, связанные с проявлениями аллергии, аутоиммунной патологии, хронических воспалительных процессов.

T-цитотоксические клетки (CD8+) слабые продуценты цитокинов – интерфероны, ФНО α , лимфотоксины. Можно подразделить на T-клетки (CD-8+), выделяющие тот же набор цитокинов, что Th1 и Th2.

Клетки миелоидного ряда являются основными продуцентами цитокинов в системе врожденного иммунитета.

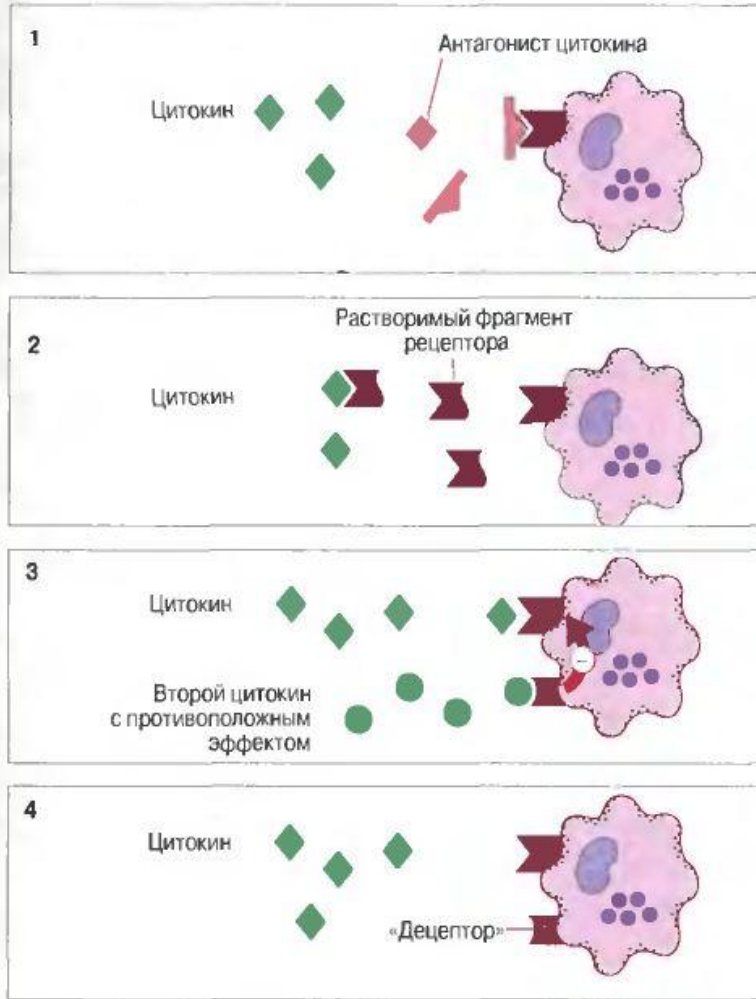
С помощью Toll-подобных рецепторов (TLRs) они распознают молекулярные структуры патогенов (липополисахарид gr- бактерий, липотейхоевые кислоты, флагеллин...). В результате взаимодействия с TLRs запускается каскад внутриклеточных реакций, приводящих к экспрессии генов двух основных групп цитокинов: провоспалительных и ИФН типа 1. Это – ИЛ-1,6,8,12, ФНО α , ГМ-КСФ, ИФН, хемокины. Они индуцируют развитие воспаления и участвуют в защите организма от бактериальных и вирусных инфекций.



Клетки, не относящиеся к иммунной системе (клетки соединительной ткани, эпителия, эндотелия) секретируют аутокринные факторы роста (ФРФ, ЕФР, ТФР β) и цитокины, поддерживающие пролиферацию гемапоэтических клеток.

Сетевые взаимодействия цитокинов.

Регуляция сетевых цитокиновых взаимодействий



Регуляция взаимодействий в цитокиновой сети.

1. Молекулы, гомологичные данному цитокину и способные связываться со специфическим клеточным рецептором, не вызывая передачи сигнала внутрь клетки, действуют как его конкурентные ингибиторы. Уже клонирован ген такого ингибитора – антагониста ИЛ-1. Ингибиторами могут быть и гликозилированные варианты некоторых цитокинов.

2. Внеклеточные домены рецепторов для ФНО и ИЛ-1 могут отщепляться и связываться с соответствующими цитокинами вне клеток, предотвращая тем самым их связывание с рецепторами на клеточных мембранах.

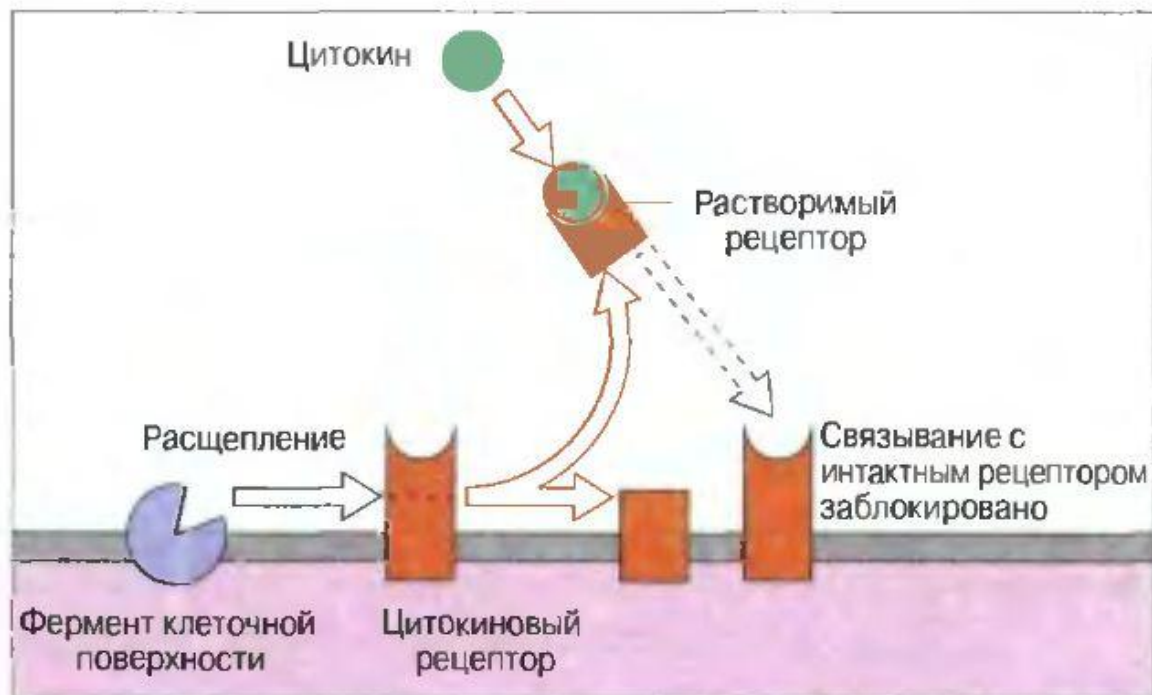
3. Одни цитокины, взаимодействуя со своими рецепторами, могут оказывать на клетку действие, противоположное эффектам других цитокинов, также взаимодействующих со своими специфическими рецепторами.

4. Некоторые клетки экспрессируют молекулы-децепторы, которые связывают цитокины, но без эффекта клеточной активации.

Особенности регуляции сетевых цитокиновых воздействий:

- образование индивидуальных цитокинов происходит кратковременно и находится под жестким контролем,
- разные цитокины действуют как синергисты или антагонисты,
- каждый из цитокинов может индуцировать или ингибировать продукцию других цитокинов,
- каждый из цитокинов способен регулировать экспрессию клеточных рецепторов для самого себя и для других цитокинов,
- антагонисты цитокинов связываются со специфическими клеточными рецепторами, но не вызывают передачу внутриклеточного сигнала,
- "децепторы" специфически связывают лиганд, но не передают сигнал внутрь клетки,
- благодаря ферментативному отщеплению внеклеточные домены цитокиновых рецепторов могут покидать поверхность клетки и связываться со свободными молекулами многих цитокинов
- интенсивность синтеза цитокинов до и после его стимуляции может быть также запрограммирована на генетическом уровне.

Растворимые рецепторы для цитокинов



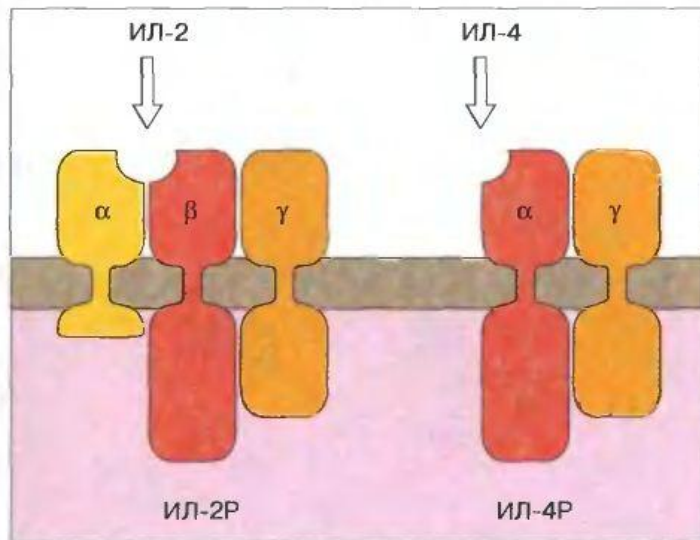
Растворимый рецептор, связывающийся с цитокином – это отщепленный ферментом внеклеточный домен мембранного рецептора, например для ФНО α , ИЛ-6. Растворимые рецепторы для ФНО α сохраняют высокую аффинность в отношении своих лигандов и благодаря этому способны нейтрализовать ФНО, препятствуя его доступу к интактным мембранным рецепторам. Если же ФНО α свяжется с одним из неспецифических растворимых рецепторов (фрагмент ИЛ-6Р), возникший комплекс может связаться с другим мембранным рецептором и все-же вызвать сигнальный эффект.

Рецепторы клеток-мишеней.

Действие цитокинов на клетки-мишени опосредуется высокоспецифичными высокоаффинными мембранными рецепторами, представляющими собой трансмембранные гликопротеины, состоящие обычно более чем из одной субъединицы. Каждый цитокин связывается со своим специфическим рецептором. Рецепторы цитокинов делятся на 5 основных типов.

1) Гемопозитиновый тип. Наиболее распространен. К этому типу относятся рецепторы к ИЛ-2,-3,-4,-5,-6,-7,-9,-12, Г-КСФ, ГМ-КСФ. Как гетеротример экспрессирован на Т-лимф памяти, некоторых В-лимф, НК.

Схема строения рецепторов для ИЛ-2 и ИЛ-4



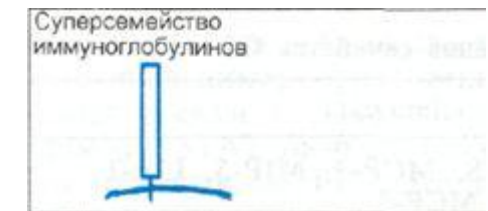
Высокоаффинный рецептор для ИЛ-2 образован тремя полипептидными цепями; α -цепь и β -цепь обеспечивают связывание цитокина, γ -цепь передает возникающий при этом сигнал внутрь клетки. Рецептор для ИЛ-4 имеет уникальную α -цепь, специфически распознающую именно этот цитокин, и сигнальную γ -цепь, идентичную γ -цепи рецептора для ИЛ-2.

2) **Рецепторы семейства ИЛ-10 и ИФН.** Могут иметь 2 внеклеточных домена с большим количеством консервативных цистеинов.

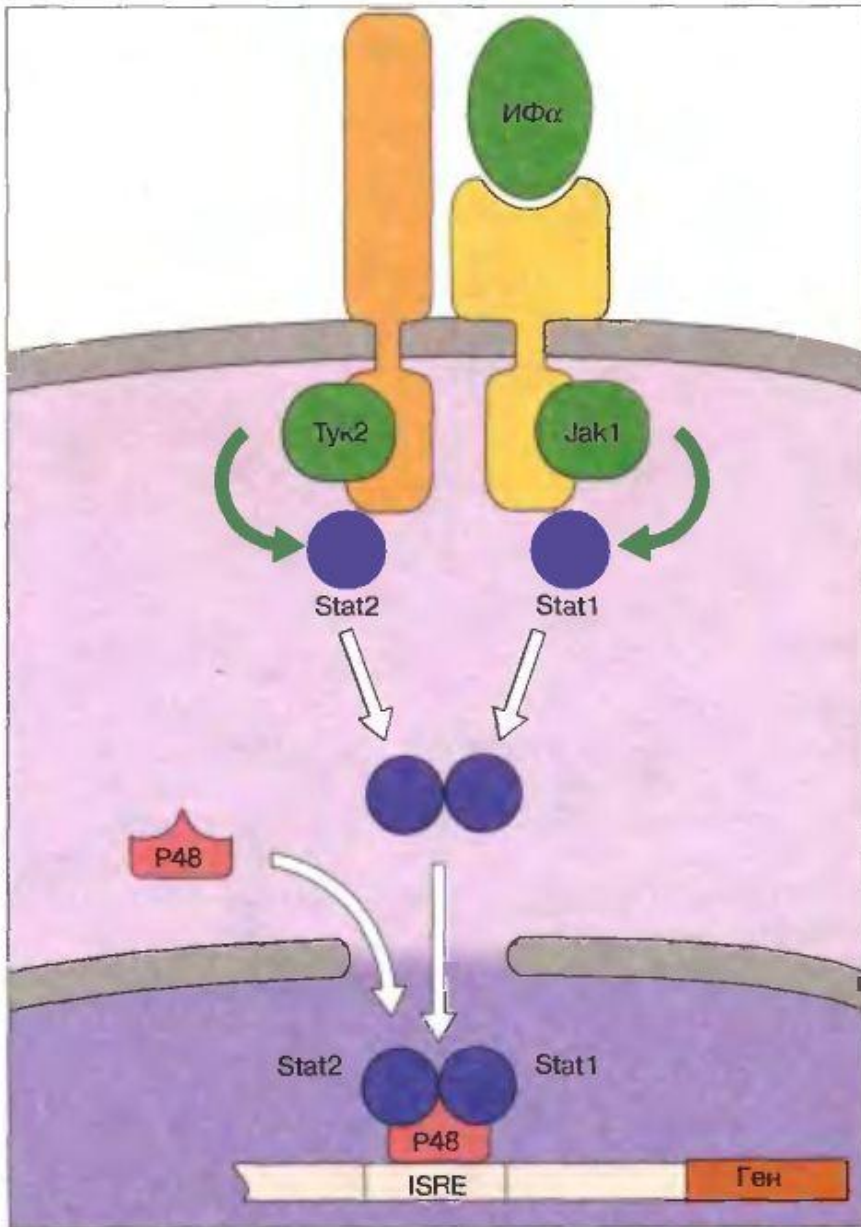
3) **Цитокиновые рецепторы или рецепторы ФНО (TNFR).** Представляют собой одну трансмембранную полипептидную цепь. Связывают ФНО α , ФНО β , лимфотоксин, фактор роста нервов (ФРН). К рецепторам также относится Fas (CD-95), связывание которого с лигандом апоптозу.

4) **Суперсемейство иммуноглобулиновых рецепторов.** Внеклеточные домены напоминают домены молекул иммуноглобулинов.

5) **Рецепторы для хемокинов.** Представлены трансмембранными белками, пересекающими мембрану в 7 местах. Могут существовать в растворимой форме, сохраняя способность связывать лиганды. Рецепторы для ИЛ-8, МИФ-1,



Пути внутриклеточной передачи сигнала



Цитокины способны влиять на пролиферацию, дифференцировку, функциональную активность и апоптоз клеток-мишеней. Проявление биологической активности цитокинов в клетках-мишенях зависит от участия различных внутриклеточных систем в передаче сигнала от рецептора.

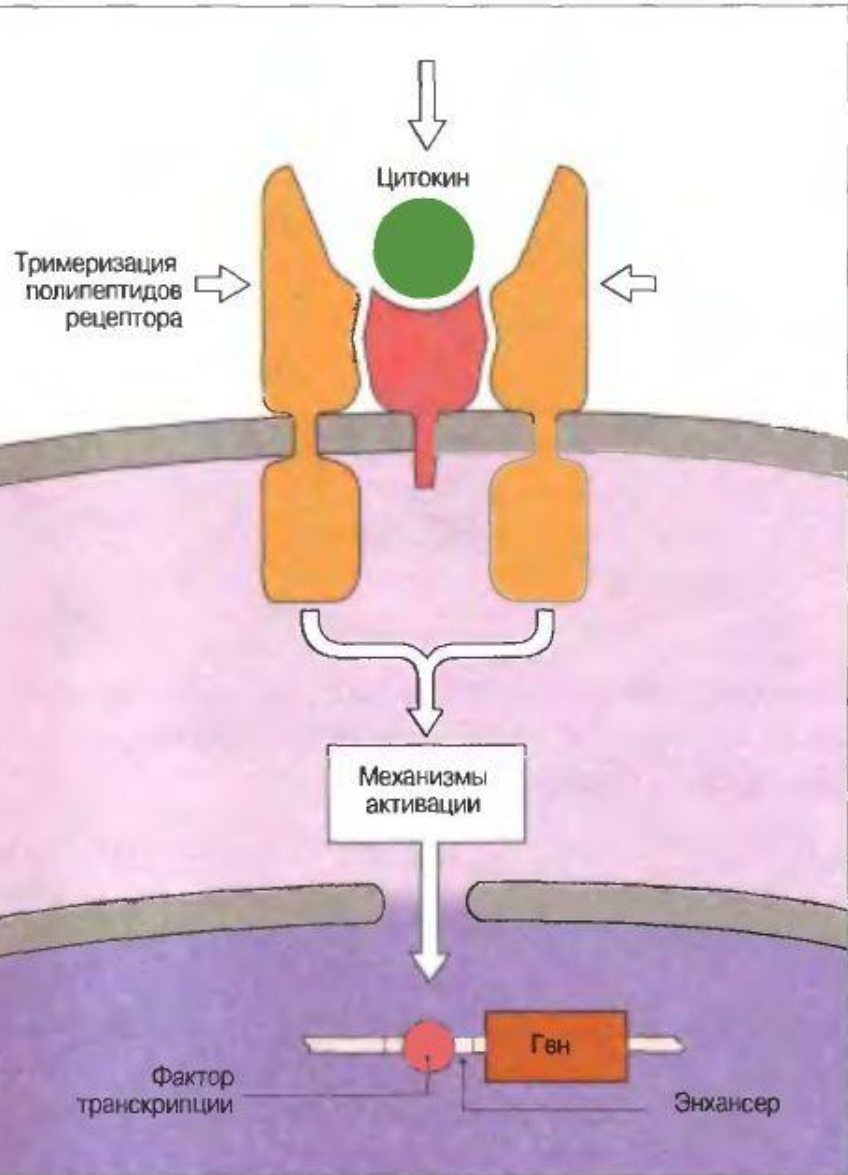
Схема активируемых ИФ α механизмов внутриклеточной передачи сигнала. Связывание с ИФ α вызывает агрегацию двух субъединиц клеточного рецептора. В результате происходит активация и фосфорилирование Янус-киназ – Jak1 и Tyk2, которые затем фосфорилируют молекулы Stat1 и Stat2. Эти факторы транскрипции образуют комплекс с белком p48, который связывается с ДНК. Образовавшийся комплекс достигает ядра клетки и индуцирует транскрипцию генов, несущих регуляторный элемент ответа на интерферон (ISRE, от англ. interferon response element).

Jak – Янус-киназа, ассоциированная с цитокиновым рецептором.

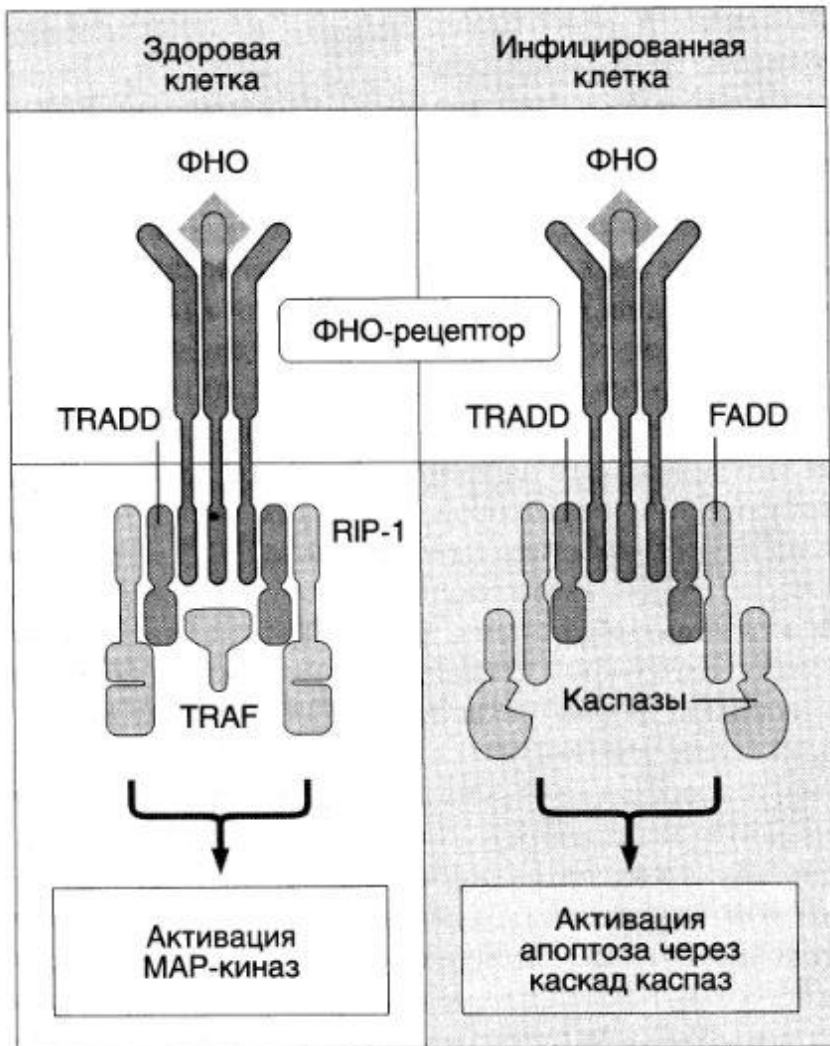
Tyk – Янус-киназа, фосфорилирующая тирозин.

Stats – белок-переносчик сигнала и активатор транскрипции.

Принципиальная схема взаимодействия цитокина с клеткой



Упрощенная схема активации клетки цитокином. (Представлено взаимодействие ИЛ-6 с его рецептором.) Связавшись с рецептором на поверхности клетки, цитокин вызывает димеризацию или полимеризацию его полипептидных цепей, в результате которой активируются механизмы внутриклеточной сигнализации (например, киназные каскады). Это приводит к образованию активных факторов транскрипции, которые мигрируют в ядро и связываются с энхансерами – нуклеотидными последовательностями, усиливающими транскрипцию генов, активируемых данным цитокином.



Сигнал к апоптозу проводится с помощью специфического участка семейства рецепторов ФНО, так называемого домена “смерти”. Сигнализация осуществляется не с участием Jaks и Stats, а с участием MAP-киназ. В результате с Днк связываются такие активаторы транскрипции, как AP-1, NF-кВ, и NFIL-6.

Как специфическое, так и плеiotропное действие хемокинов в конечном итоге влияет на перемещение клетки, но это сложный эффект: вслед за присоединением хемокинов к рецепторам происходит передача сигнала на G-белки, затем мобилизация вторых, внутриклеточных посредников, реорганизация цитоскелета, образование ограниченных адгезивных контактов, прилипание и отлипание клеточной поверхности, вытяжение и сокращение псевдоподий — все эти этапы необходимы для направленной миграции.

Методы оценки системы цитокинов.

Комплексный анализ системы цитокинов состоит из:

1) Оценка клеток продуцентов.

- Определение экспрессии:

а) рецепторов, распознающих патоген или антиген (ТКР) на уровне генов и молекулы белка (ПЦР, Метод проточной цитофлуориметри)

б) адаптерных молекул, проводящих сигнал, запускающих транскрипцию цитогеновых генов (ПЦР)

в) генов цитокинов (ПЦР), белковых молекул (оценка цитокинсинтезирующей ф-ци мононуклеарных клеток человека)

- Количественное определение субпопуляций клеток, содержащих те или иные цитокины: Th1, Th2, Th17 (метод внутриклеточного окрашивания цитокинов); определение количества клеток, секретирующих определенные цитокины (ELISPOT)

2) Оценка цитокинов и их антагонистов в биологических средах организма.

- Тестирование биологической активности цитокинов

- Количественное определение цитокинов с помощью ИФА

- Иммуногистохимическое окрашивание цитокинов в тканях

- Определение соотношения оппозитных цитокинов (про- и противовоспалительных), цитокинов и антагонистов рецепторов цитокинов.

3) Оценка клеток мишеней.

- Определение экспрессии рецепторов цитокинов на уровне генов и белковой молекулы (ПЦР, проточная цитофлуориметрия)
- Определение сигнальных молекул во внутриклеточном содержимом
- Определение функциональной активности клеток-мишеней.

В настоящее время разработаны методы оценки системы цитокинов, дающих разноплановую информацию:

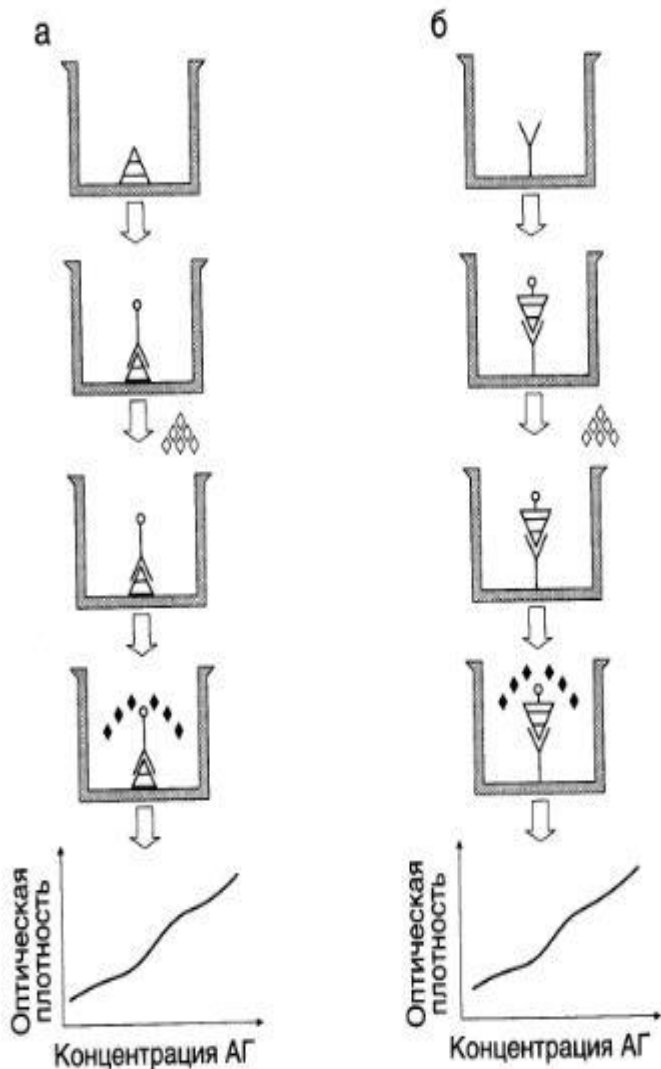
- Метод количественного определения цитокинов с помощью ИФА. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay),
- Метод ELISPOT (Enzyme linked immunospot, spot - пятно), позволяющий выявить цитокины вокруг единичной цитокинпродуцирующей клетки,
- Иммунофлюоресценция,
- Молекулярно-биологические методы (исследование экспрессии генов цитокинов, их рецепторов, сигнальных молекул).
- Внутриклеточное окрашивание цитокинов,
- Тестирование биологической активности цитокинов.

1) Количественное измерение с помощью методов иммуноанализа.

В основе метода лежит взаимодействие аг с ат, которое визуализируется с помощью специальной метки, заранее конъюгированной либо с аг, либо с ат. В качестве меток используются вещества, которые можно можно будет зарегистрировать и после измерить кол-во метки. Метки – радионуклиды, ферменты, катализирующие превращение бесцветного субстрата в цветной или флюоресцирующий продукт, флюоресцирующие и люминисцирующие вещества. В настоящее время используются твердофазные или иммуносорбентные анализы. На материале твердой фазы (**полистирол, поливинилхлорид** – в виде стандартно-штампованных микроплашек с 96 или 60 лунками, **пористый материал – нитроцеллюлоза** - в виде плоских листов или полосок стрипов) в соответствии с фх-свойствами сорбируется аг или ат. Остальные реагенты тест-систем используются в виде растворов. Их добавляют к твердой фазе поочередно, инкубируют, после чего несвязавшиеся реагенты легко удаляют промывкой твердой фазы. Результат реакции остается на твердой фазе и регистрируется количественно.

Выделяют прямой и непрямой ИФА.

Прямой ИФА – анализ, в котором метку присоединяют непосредственно либо к заданному аг, либо к ат, специфичному против искомого аг. В лунки сорбируют известные аг или ат. После вносят меченые испытуемые ат или аг.



Прямой ИФА

Связывание моноклональных а.т. к подозреваемому цитокину с твердой фазой (случай б), отмывка.

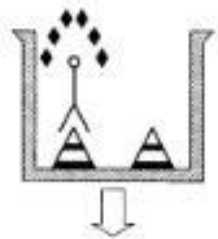
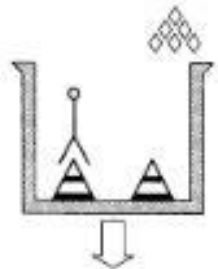
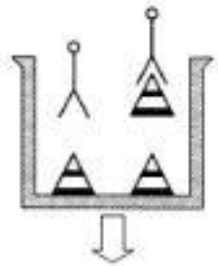
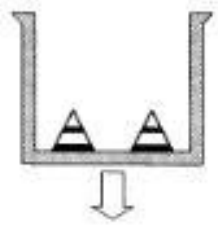
Инкубация с исследуемым образцом содержащим меченые антигены (меченые цитокины), отмывка.

Внесение субстрата. В случае если меткой является фермент.

Образование окрашенного продукта. Учет результатов на приборе.

Определение концентрации АГ (цитокина) по калибровочной кривой.

Ингибиторный ИФА



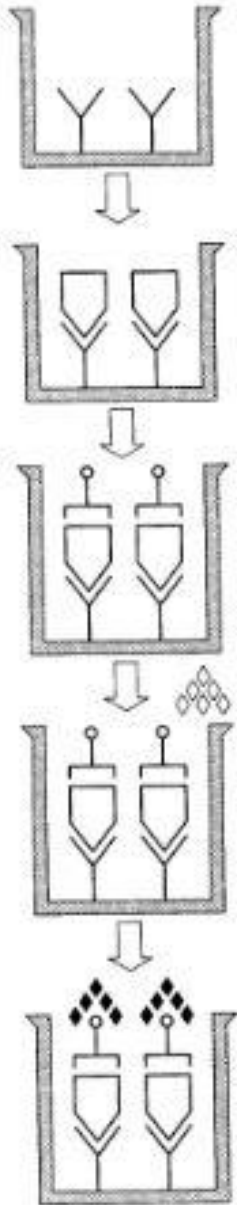
На твердой фазе иммобилизуют исследуемые аг (цитокины).

К исследуемому цитокину добавляют а.т., конъюгированные с ферментом. Добавляют испытуемую пробу, в которой нужно определить концентрацию цитокинов. Определяемый а.г. (цитокин) в испытуемой пробе конкурирует с иммобилизованным на твердой фазе а.г. за растворимые антитела.

Внесение субстрата.

Измерение ферментативной активности на твердой фазе. Тем самым, чем больше цитокинов было в испытуемой пробе, тем меньше будет ферментативная активность. То есть ферментативная активность обратна пропорциональна концентрации определяемого вещества в пробе.

“Сэндвич”-ИФА. Применяется для цитокинов, с 2-мя и более неперекрывающимися эпитопами.



Антитела к одному из эпитопов сорбируют на твердой фазе. Отмывка.

Добавление испытуемой пробы, содержащей цитокины (а.г.). Инкубация. Отмывка.

Внесение а.т. конъюгированных с ферментом ко второму эпитопу. Их инкубация на втором эпитопе цитокинов (а.г.)

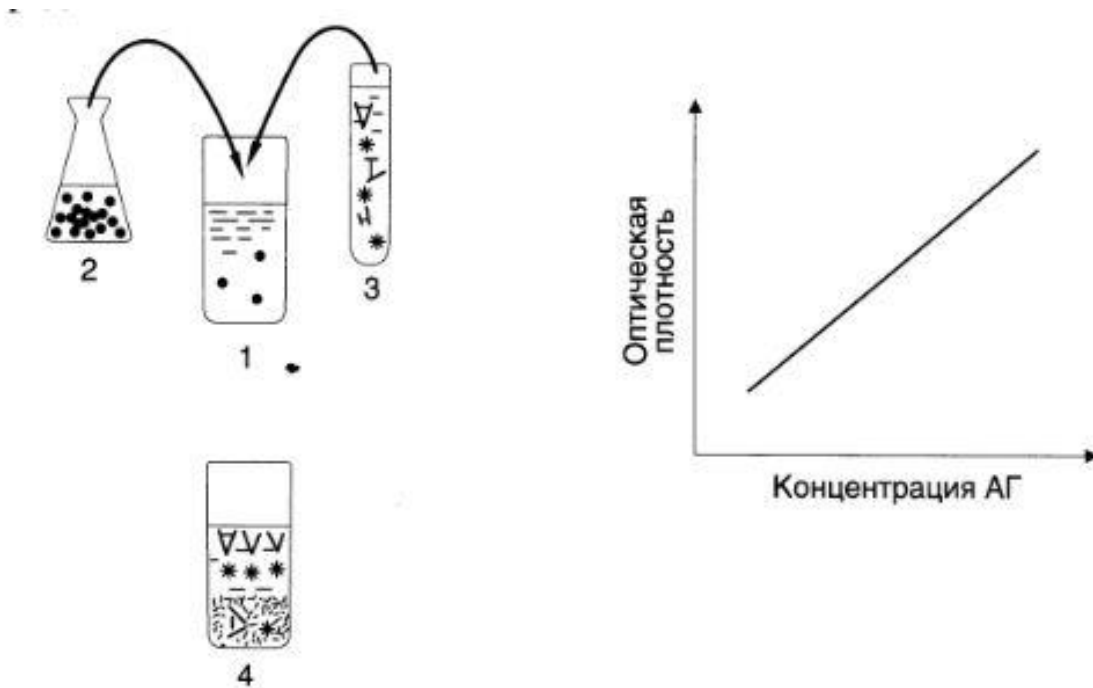
Добавление субстрата.

Образование окрашенного продукта. Учет результатов. Определение концентрации по калибровочной кривой.

“Сэндвич”-ИФА не требует препаратов очищенных антигенов (довольно дороги).

Чувствительность выше, чем при применении ингибиторного ИФА

Иммунометрический анализ.

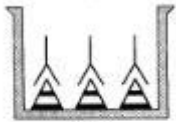


В пробирку с испытуемой пробой 1, предположительно содержащей определяемый аг (цитокин), вносят заведомый избыток меченых аг 3. Внесение избытка цитокина (аг), иммобилизованного на мелкодисперсной твердой фазе. Инкубация, центрифугирование, отделение растворимой фракции (супернатант). Определение ферментативной активности в супернатанте (если метка - фермент). Ферментативная активность прямо пропорциональна содержанию цитокина (аг) в испытуемой пробе. Определение концентрации цитокина по калибровочной кривой. Метод более чувствительный, нежели конкурентный ИФА.

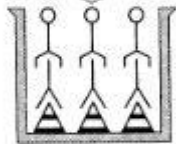
Непрямой ИФА – анализ, в котором метку присоединяют не к аг и не к ат против целевого ат, а к ат против образовавшегося комплекса аг-ат. Меткой будет являться фермент (пероксидаза корня хрена, щелочная фосфатаза, уреаза), расщепляющий субстрат (орто-фенилдиамин, 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфат, мочеви́на), в результате чего будет меняться окраска системы.



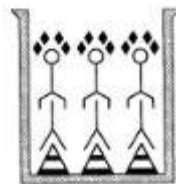
Адгезия исследуемого а.г. (цитокина) на твердой фазе



Внесение материала со специфическими ат.



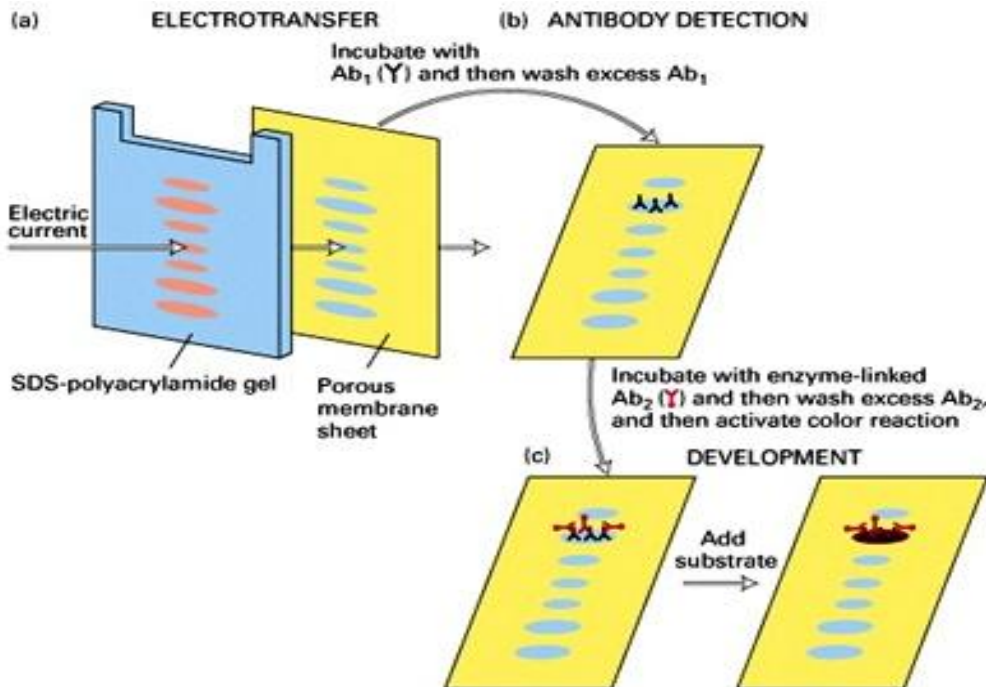
Внесение ат к комплексу аг-ат.



Добавление субстрата, образование окрашенного продукта, учет результатов.

Иммуноблот

Исследуемую смесь цитокинов подвергают электрофорезу в полиакриламидном геле. В результате чего каждый цитокин (если их несколько вариантов) в соответствии со своей молекулярной массой и электрическим зарядом занимает определенную позицию в геле. Получаем фракции, но без окраски они не видны. После применяют инкубацию с ат. Сначала специфичными к определенным цитокинам, а после с ат к образовавшемуся комплексу аг-ат, но уже конъюгированными с ферментом. Добавление субстрата, инкубация,



Можем определить – какие цитокины и в каком количестве какая клетка продуцирует.

ИФА позволяет узнать каковы точные концентрации цитокинов в биологических жидкостях организма. Преимущества: высокая чувствительность, специфичность, независимость от присутствия антагонистов, возможность точного автоматизированного учета и стандартизации учета. Минусы: не характеризует биологическую активность цитокинов, может давать ложные результаты за счет перекрестно-реагирующих эпитопов.

Метод ELISPOT

На дно нитроцеллюлозного планшета сорбируют моноклональные антитела против интересующего цитокина. Затем помещают в лунки культуру исследуемых клеток. Добавление стимуляторов продукции данного цитокина. Выделение цитокина клетками. Образование комплекса аг-ат. Добавление конъюгата к комплексу аг-ат с меткой-ферментом. Инкубация, промывка. Добавление бесцветного субстрата. Инкубация, промывка. В результате получаем пятна на дне лунок. Пятна образуются в тех точках, над которыми лежали антителообразующие клетки. Анализ компьютера, основанный на сравнении полученного результата с контрольным. Определение количества искомым клеток.



2) Молекулярно – биологические методы.

С помощью этих методов исследуется экспрессия генов цитокинов, их рецепторов, сигнальных молекул, а также генетически запрограммированная продукция цитокина. Выявлена связь между вариантами аллелей генов и предрасположенностью к ряду заболеваний. ПЦР-РВ, ПЦР-ОТ и флюоресцентная гибридизация in situ (FISH).

ПЦР.

Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах, (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК.

Стадия **денатурации** - двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96 °С (или до 98 °С, если используется особенно термостабильная полимеразы) на 0,5—2 мин., чтобы цепи ДНК разошлись. **Отжиг** - когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. **Элонгация** - ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы в направлении от 3' к 5'. Образование продукта ПЦР-реакции. Повтор циклов n раз.

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

ПЦР-РВ (количественный ПЦР) - лабораторный метод, основанный на методе полимеразной цепной реакции, который используется для одновременной амплификации и измерения количества данной молекулы ДНК. Метод использует общие принципы ПЦР, а отличие состоит в том, что измеряется количество амплифицированной ДНК в реальном времени после каждого цикла амплификации. Для количественного анализа используют флуоресцентные красители (TaqMan), интеркалирующие в двуцепочечные молекулы ДНК и модифицированные дезокси-нуклеотиды, флуоресцирующие после гибридизации с комплементарными участками ДНК. Метод позволяет детектировать флуоресценцию каждый цикл и наблюдать рост кол-ва ПЦР-продукта в каждой пробирке, и далее по имеющейся калибровке определять точное исходное кол-во образца в пробе. Часто комбинируют с ПЦР-ОТ.

ПЦР с обратной транскрипцией (ПЦР-ОТ).

ПЦР-ОТ (обратный ПЦР) - лабораторный метод, основанный на методе полимеразной цепной реакции, который используется для получения ДНК из мРНК.

Для превращения последовательности РНК в комплементарную ДНК используют обратную транскриптазу:

1. Реакция первой цепочки: комплементарная ДНК образуется на матрице мРНК ферментом обратной транскриптазой. Компоненты реакции смешиваются с ДНК-праймером и буфером с обратной транскриптазой на один час при 37 °С.

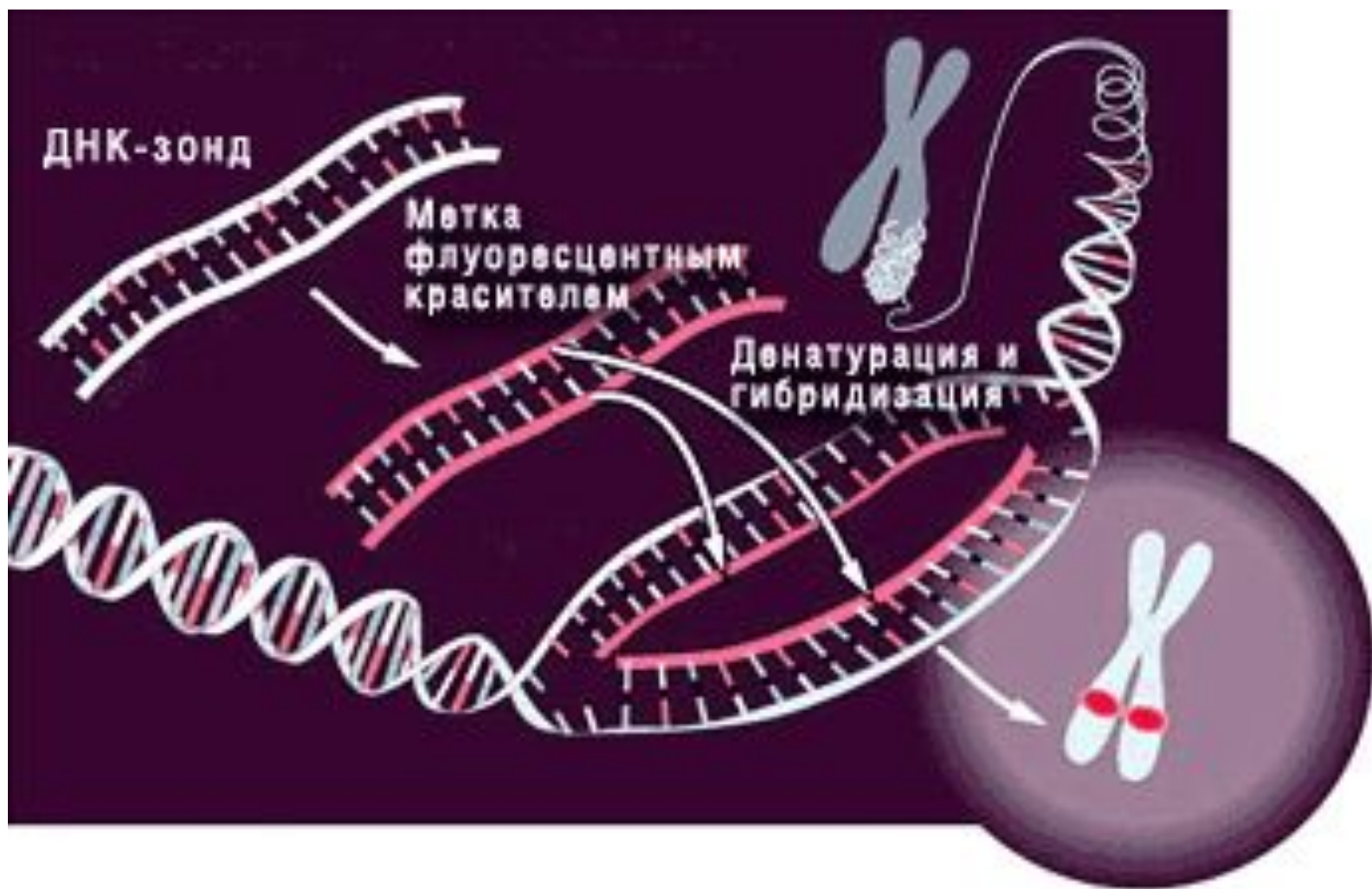
2. Реакция второй цепочки: после того как обратная транскрипция закончена и образована комплементарная ДНК на матрице мРНК, следующие циклы производятся по стандартной методике ПЦР. Амплифицируем уже одноцепочечную молекулу ДНК.

После 30 циклов амплификации образуются миллионы копий нужной последовательности.

Нами это используется для исследования экспрессии мРНК цитокинов.

Флюоресцентная гибридизация in situ (FISH-метод).

FISH реакция - цитогенетический метод, который применяют для детекции и определения положения специфической последовательности ДНК на хромосомах. Для определения расположения специфической последовательности ДНК при флюоресцентной гибридизации in situ используют флюоресцентные зонды (короткие последовательности ДНК, которые являются комплементарными по отношению к последовательностям ДНК, представляющим объект изучения) Зонды гибридизуются (связываются) с комплементарными участками ДНК и благодаря тому, что они помечены флуоресцентной меткой, дают возможность видеть локализацию интересующих генов в составе ДНК или хромосом с помощью флюоресцентных микроскопов. В отличие от других методов изучения хромосом, требующих активного деления клетки, FISH можно выполнять на неделящихся клетках, благодаря чему достигается гибкость метода.



3) Изучение внутриклеточного содержания цитокинов и их продукции в клетках и тканях.

- Внутриклеточное окрашивание цитокинов,**
- Метод проточной цитофлуориметрии,**
- Elispot**

Эти методы дают возможность изучить экспрессию цитокинов на клеточном и тканевом уровне и выявить изменение соотношения клеток, продуцирующих различные цитокины, что может отражать патогенез заболевания и быть критерием оценки прогноза и проводимой терапии.

Методом внутриклеточного окрашивания определяют экспрессию цитокина на уровне одной клетки.

Метод проточной цитофлуориметрии предоставляет возможность идентифицировать множество различных цитокинов в различных типах клеток одновременно или подсчитать кол-во клеток, экспрессирующих тот или иной цитокин.

Нестимулированные клетки продуцируют небольшое кол-во цитокинов, к тому же они не депонируются, следовательно необходимо простимулировать клетки и заблокировать выход цитокинов наружу. Индукторов продукции цитокинов - **форбол-12-миристат-13-ацетат, иономицин** и блокатор внутриклеточного транспорта - **брефелдин А, моненсин**.

После осуществляется инкубация, фиксация, пермеабелизация (обработка сапонином, повышающим проницаемость клеточной мембраны) клеток, окраска с помощью моноклональных ат к цитокину. После идет подсчет клеток на проточном цитофлуориметре.



Проточный цитофлуориметр.

4) Тестирование биологической активности ЦИТОКИНОВ.

Биологическое тестирование проводят на основе знания основных свойств цитокинов, их действия на клетки-мишени. Изучение биологических эффектов цитокинов позволило разработать четыре разновидности тестирования цитокинов:

- 1) по индукции пролиферации клеток-мишеней;
- 2) по цитотоксическому эффекту;
- 3) по индукции дифференцировки костно-мозговых предшественников;
- 4) по противовирусному действию.

ИЛ-1 определяют по стимулирующему действию на пролиферацию мышинных тимоцитов, активированных митогеном *in vitro*; ИЛ-2 — по способности стимулировать пролиферативную активность лимфобластов; по цитотоксическому действию на мышинные фибробласты (L929) тестируют ФНО α и лимфотоксины. Колонiestимулирующие факторы оценивают по их способности поддерживать рост костно-мозговых предшественников в виде колоний в агаре. Противовирусную активность ИФН выявляют по угнетению цитопатического действия вирусов в культуре диплоидных фибробластов человека и опухолевой линии фибробластов мышей L-929.

Спасибо за внимание.

Список использованной литературы.

- 1) А.Ройт, Дж.Бростофф, Д.Мейл. Иммунология. Издательство “Мир” 2000.
- 2) Иммунология практикум. Л.В. Ковальчук, Г.А. Игнатъева, Л.В. Ганковская
- 3) Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатъева, И.Г. Сидорович. Иммунология. 2000.