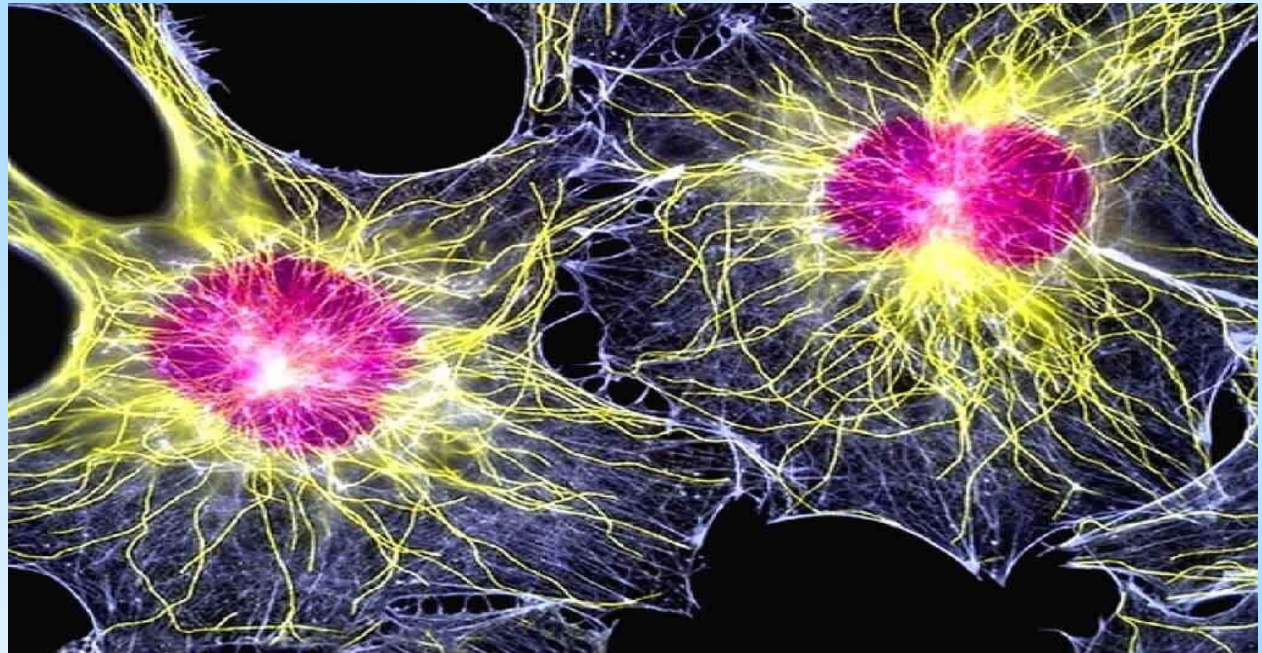


Понятие о стволовых клетках

Стволовые клетки - предшественники всех типов клеток.

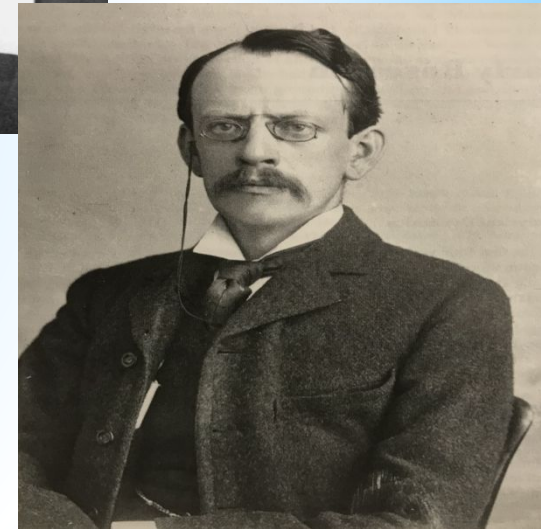
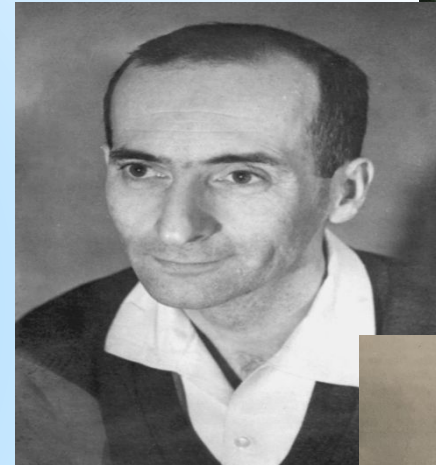
Это недифференцированные клетки, способные к делению, широкой специализации и самообновлению в течение жизни.

Они восстанавливают организм человека с момента его рождения.



История открытия и изучения

- В 1908 г. русский учёный-гистолог Александр Александрович Максимов сделал доклад на съезде гематологов в Берлине о том, что в нашем организме пожизненно сохраняются недифференцированные клетки, которые могут превращаться в специализированные клетки крови и соединительной ткани. Позднее он назвал эти клетки «стволовыми».
- В 1960-1970 гг. А.Я. Фриденштейн обнаружил в костном мозге не только гемопоэтические, но и мезенхимальные стволовые клетки.
- В 1998 г. Джеймс Томсон опубликовал статью о выделении эмбриональных стволовых клеток из бластоцист человека.

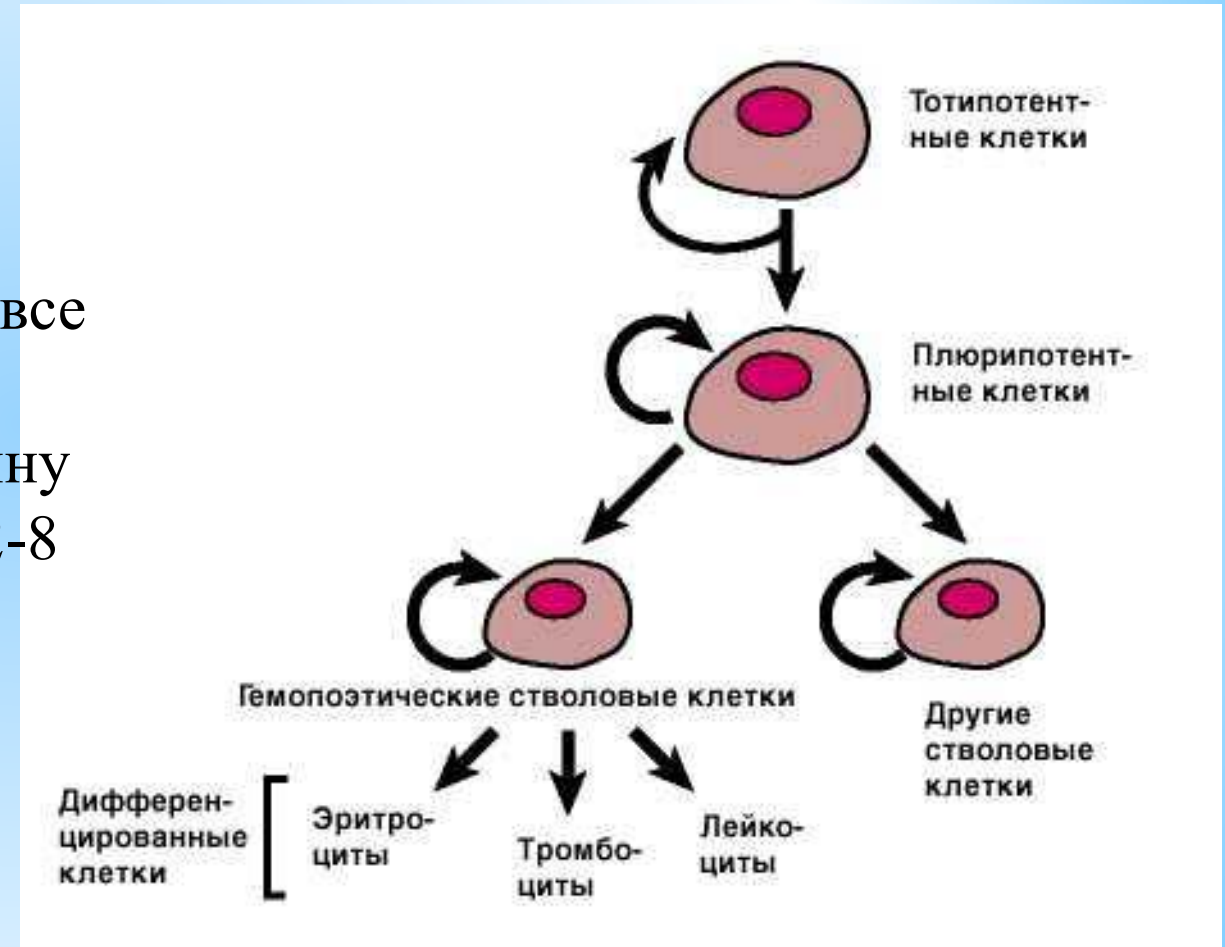


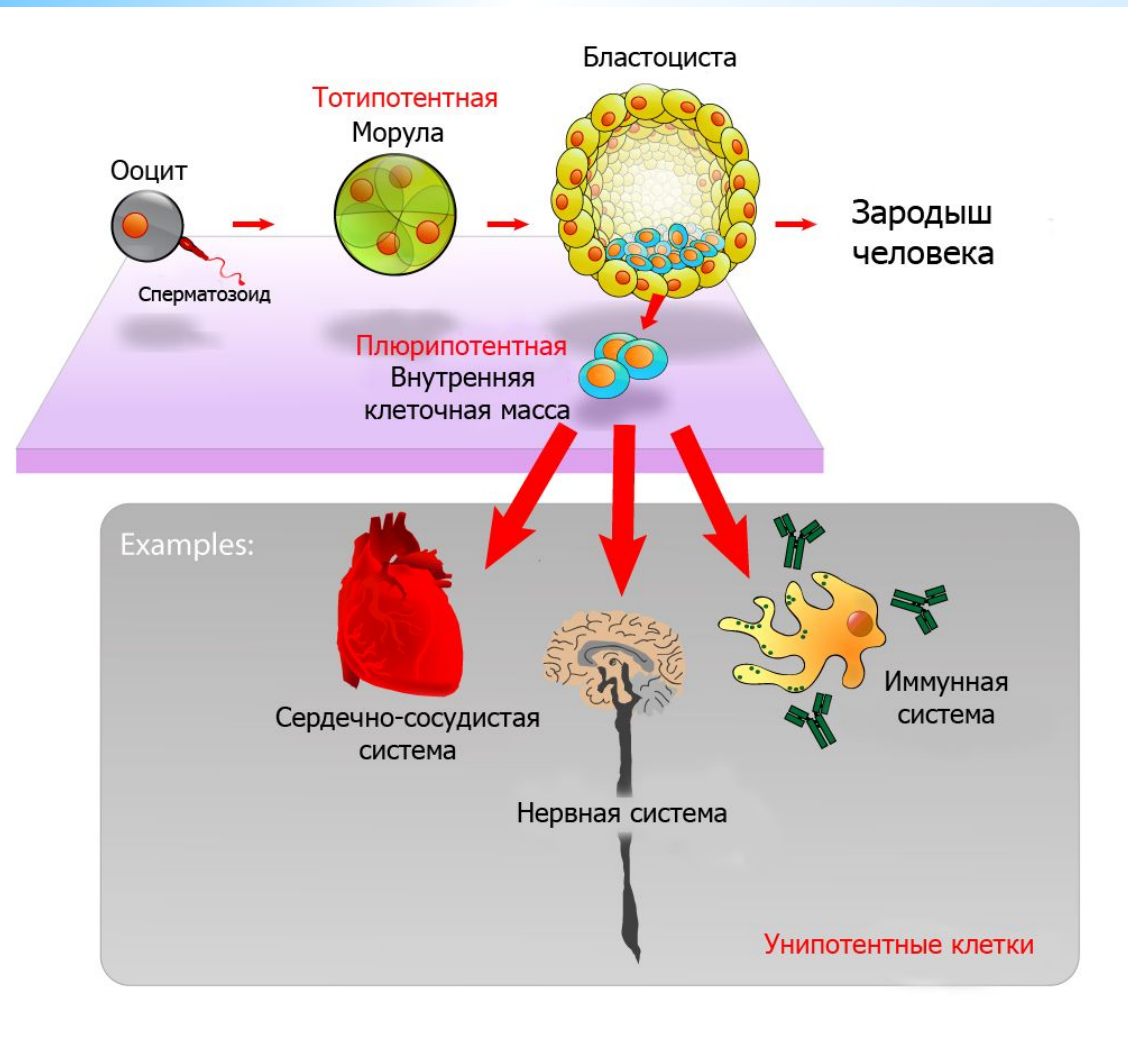
- 1970 год - Первые трансплантации стволовых клеток. Есть сведения, что в 70-х годах в бывшем СССР делали «прививки молодости» пожилым членам Политбюро КПСС, вводя им 2-3 раза в год препараты стволовых клеток.
- 1988 год - Стволовые клетки были впервые использованы для трансплантации.
- 2005 год - Перечень заболеваний, при лечении которых может быть успешно применена трансплантация стволовых клеток, достигает нескольких десятков. Основное внимание уделяется лечению злокачественных новообразований, различных форм лейкозов и других болезней крови. Появляются сообщения об успешной трансплантации стволовых клеток при заболеваниях сердечно-сосудистой и нервной систем. Проводятся многоцентровые исследования при лечении инфаркта миокарда и сердечной недостаточности. Ищутся подходы к лечению инсульта, болезни Паркинсона и Альцгеймера.

Классификация стволовых клеток по способности к дифференцировке:

1. Тотипотентная стволовая клетка.

Эта единственная клетка воспроизводит все органы эмбриона и необходимые для его развития структуры – плаценту и пуповину (оплодотворенный ооцит и бластомеры 2-8 клеточной стадии)





2) Плюрипотентная стволовая клетка.

Может быть источником клеток, производных любого из трех зародышевых листков (эктодермы, энтодермы, мезодермы).

Это ЭСК, первичные половые клетки и клетки эмбриональных карцином

3) Мультипотентная стволовая клетка.

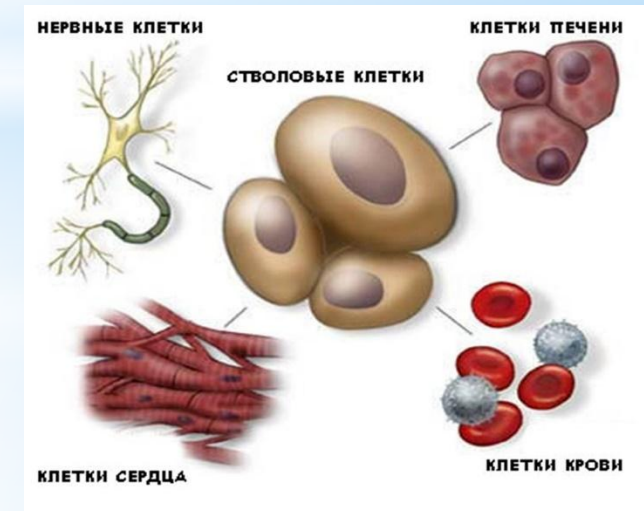
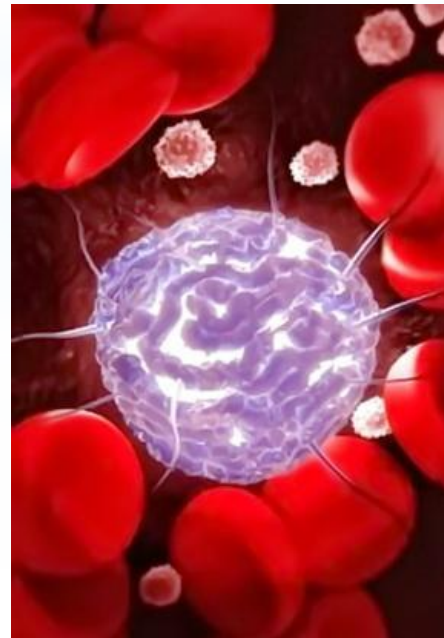
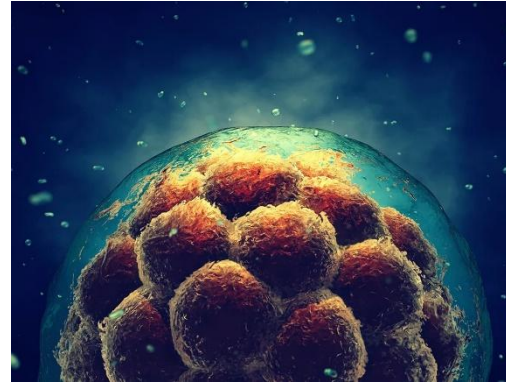
Способна образовывать специализированные клетки нескольких типов (печени, крови и т.д.)

4) Унипотентная стволовая клетка.

Клетка, дифференцирующаяся в обычных условиях только в специализированные клетки определенного типа

Источники выделения СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

- ❖ **Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК)** получают из внутренней клеточной массы бластоцисты, которая формируется к 4-7-му дню развития после оплодотворения. Эти СК способны дифференцироваться во все типы клеток взрослого организма. Основным источником ЭСК является абортный материал или материал, оставшийся после искусственного оплодотворения.
- ❖ **Фетальный клеточный материал** получают из абортного материала на 9-12 неделе беременности.
- ❖ **Стволовые клетки пуповинной и плацентарной крови (СКП).** Источником стволовых клеток является плацентарно-пуповинная кровь. Эти СКП можно использовать для восстановления любых тканей и органов и лечения разных заболеваний.
- ❖ **СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ВЗРОСЛОГО ОРГАНИЗМА.** Региональные стволовые клетки (РСК) имеются у взрослого человека в тех органах и тканях, которые нуждаются в частом обновлении



Региональные стволовые клетки

- все СК костного мозга
- тканеспецифичные стволовые клетки располагаются в различных видах тканей и отвечают за обновление их клеточной популяции, первыми активируются при повреждении. СК содержатся если не во всех, то в большинстве органов и тканей взрослого организма: в костном, головном и спинном мозге, крови, эпителии кожи и пищеварительного тракта, пульпе зубов, роговице и сетчатке глаза, эндотелии сосудов, скелетных мышцах, поджелудочной железе, печени и др.

Виды региональных тканеспецифичных СК взрослого организма:

- СК кожи;
- СК жировой ткани;
- СК нервной ткани;
- СК мышечной ткани;
- СК костного мозга;
- резидентные СК сердца.

Популяция стволовых клеток кожи.

Основным клеточным компонентом являются кератиноциты

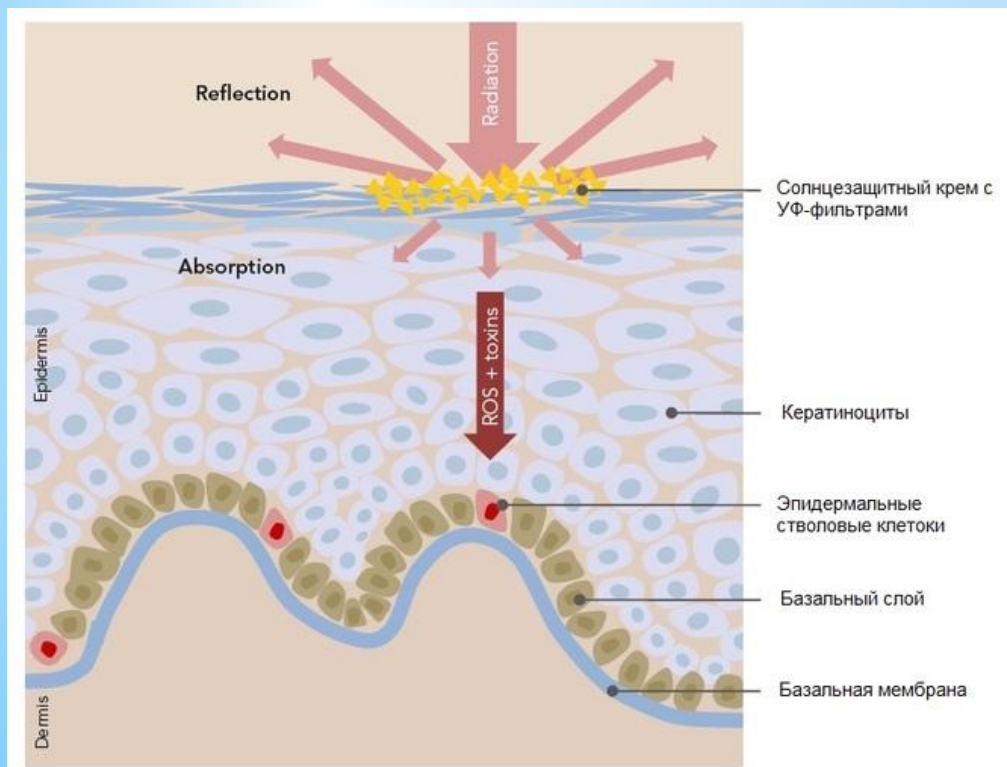
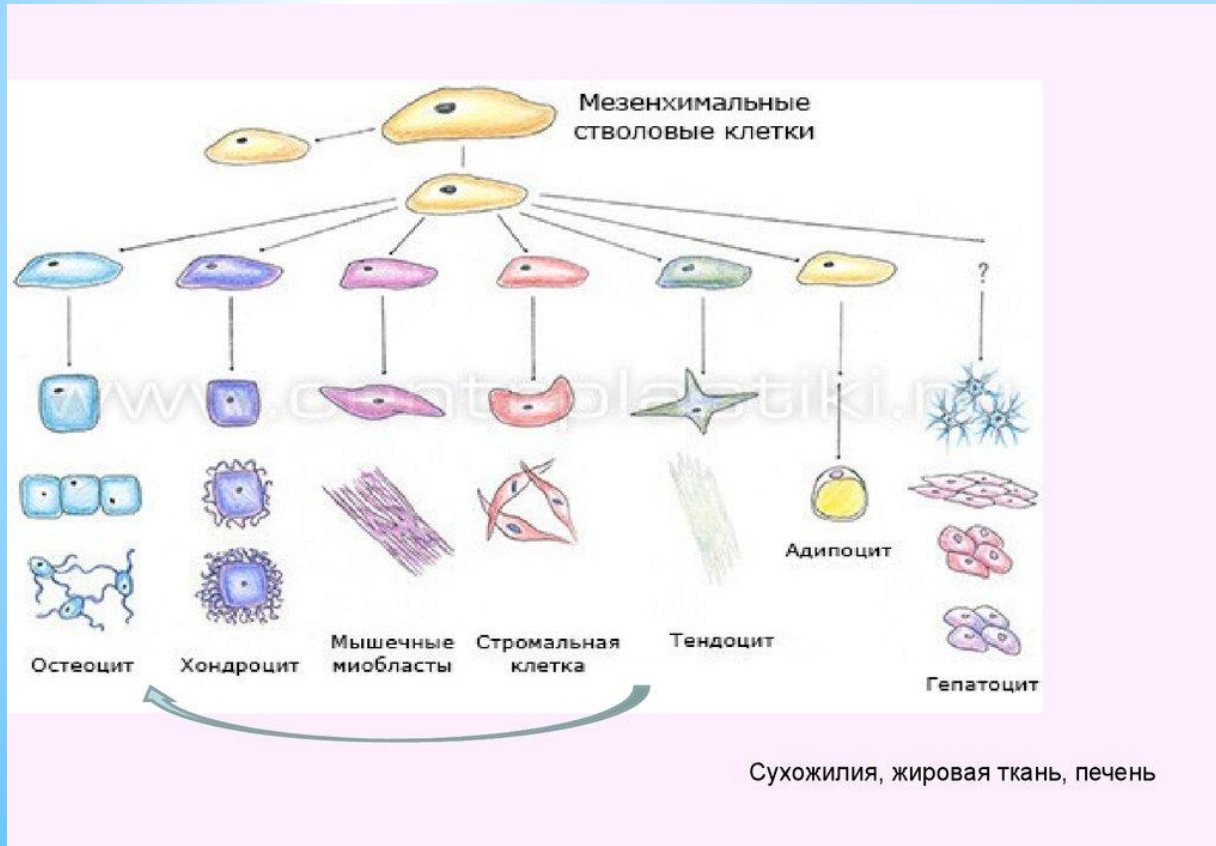


Рис.1 Стволовые клетки кожи и УФ стресс

Базальный слой эпидермиса включает стволовые и транзиторные клетки, которые начинают интенсивно дифференцироваться после перехода в шиповатый слой

СК жировой ткани

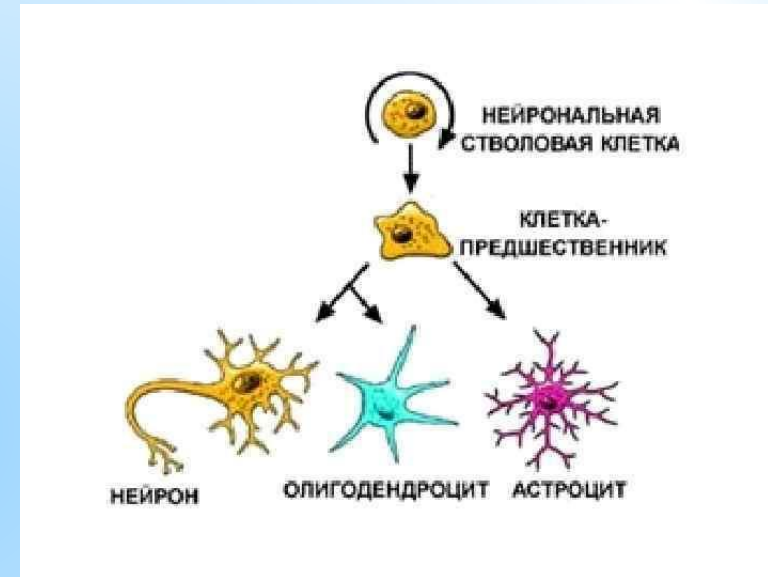
По данным литературы, из 1 мл жира сразу после его забора можно выделить около 1 млн СК, через 2 часа – 500 тыс. При этом совершенно не важно, из какого участка забирали жировую ткань – количество, жизнеспособность и функциональная активность клеток будет одинаковой.



Мезенхимальные клетки жировой ткани обладают высокой пластичностью и способны превращаться не только в хондробласты – в хрящевую ткань, в остеобласты – костную ткань, но и фибробласты – рыхлую соединительную ткань, строму, адипоциты – жировую ткань, в миоциты – мышечную ткань, кардиомиоциты – сердечную мышечную ткань, нейроны – нервную ткань, гепатоциты – ткань печени, эндотелиальные клетки – обеспечивают рост артериальных, венозных и лимфатических сосудов и т. д.

Нейральные стволовые клетки

Нейрогенез и самообновление нейральных стволовых клеток в ЦНС обнаружено в строго локализованных областях мозга. Нейральные СПК – это мультипотентные клетки, имеющие способность дифференцироваться в любую зрелую клетку нервной системы (астроциты, олигодендроциты, нейроны). Маркером для нейральных СПК является белок промежуточных филаментов – нестин.

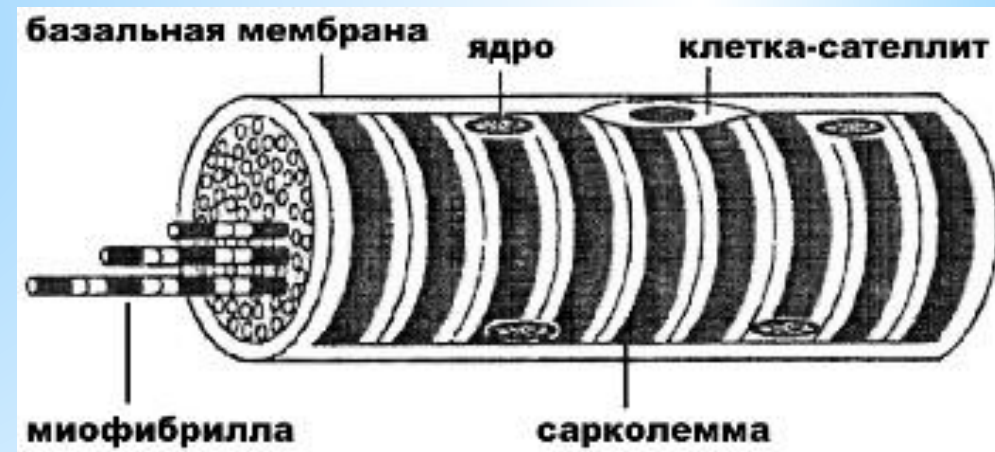


СК мышечной ткани

- клетки-сателлиты. являются предшественниками миоцитов поперечно-полосатой мускулатуры и располагаются под базальной мембраной мышечного волокна. В норме эти клетки находятся в состоянии покоя, но в период постнатального роста или при необходимости регенерации мышечного волокна они способны к пролиферации

- клетки в дорсальном участке аорты;

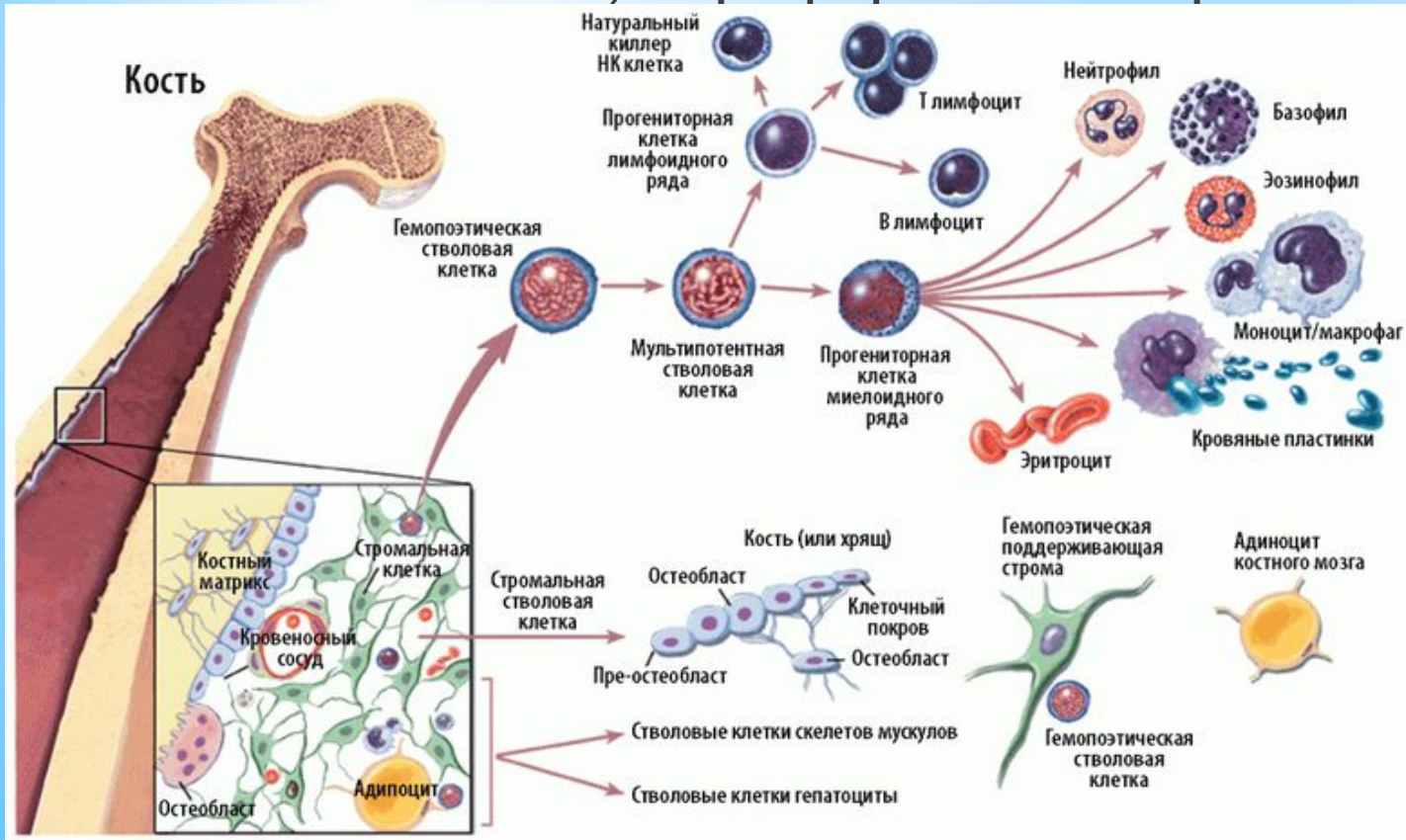
- клетки побочной популяции («side population» cells) или SP-клетки. Стволовые SP-клетки присутствуют в мышцах, костном мозге и принимают участие в регенерации мышц



Популяция стволовых клеток костного мозга

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК).

* ГСК обеспечивают регенерацию клеточных компонентов крови и иммунной системы (эритроцитов, тромбоцитов, лимфоцитов, моноцитов и др.). Источники ГСК – костный мозг, периферическая кровь



Мезенхимальные (стромальные) стволовые клетки (МСК).

МСК костного мозга представляют собой популяцию плюрипотентных клеток, способных дифференцироваться в направлении хондроцитов, остеобластов, адипоцитов, гепатоцитов, альвеолярных и ряда других стромальных клеток. МСК способны мигрировать к месту повреждения, закрепляться, дифференцироваться и осуществлять функцию замещенных клеток. Именно эти свойства МСК позволяют использовать их для репарации и регенерации тканей, например миокарда, нервной ткани, костей, сухожилий, хряще



Основные свойства СКК

- Способность к самообновлению и пролиферации- длительному размножению и продукции большого кол-ва себе подобных клеток
- Способность к ассиметричному делению. При делении одной клетки одна часть остается стволовой, а другая более или менее детерминированной
- Иммор탈ность (бессмертие)
- Мобилизация-миграция к поврежденному органу и хоуминг-способность возвращаться домой изначальной локализации
- Способность к дифференцировке и трансдифференцировке

Отличия стволовой клетки от соматической

- В отличие от соматической клетки, стволовая клетка является бессмертной (иммортальной)
- Отличаются способностью существовать *in vivo* в недифференцированном состоянии и самообновляться

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК)

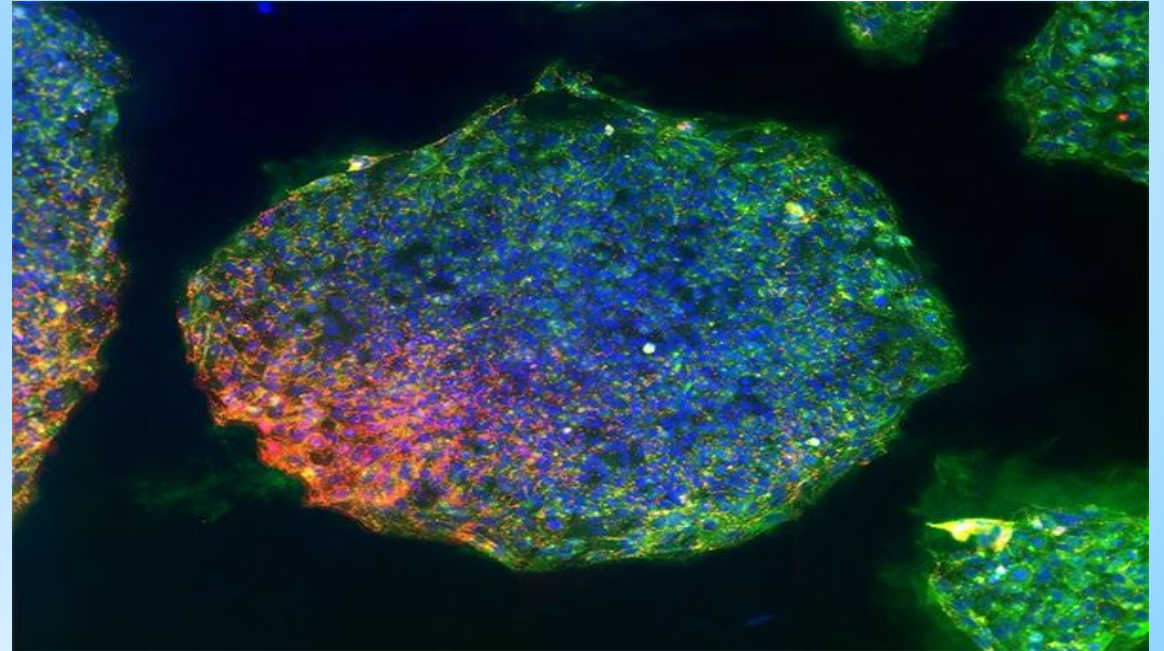
- ИПСК - клетки, полученные при репрограммировании соматических клеток человека, путем переноса генетического материала в клетку, такую как фибробласт, с помощью вирусных векторов (ретровирусов).
- ИПСК обладают сходной с эмбриональной стволовой клеткой (ЭСК) морфологией, ростковыми свойствами, а также экспрессируют маркерные гены.
- ИПСК могут давать начало любому типу клеток взрослого организма.

Использование ИПСК

1. Из биопсии кожи пациента получают его соматические клетки *in vitro*
2. Соматическую клетку превращают в ИПСК
3. Дифференцировка плюрипотентных клеток в нужный тип

4. Трансплантация пациенту

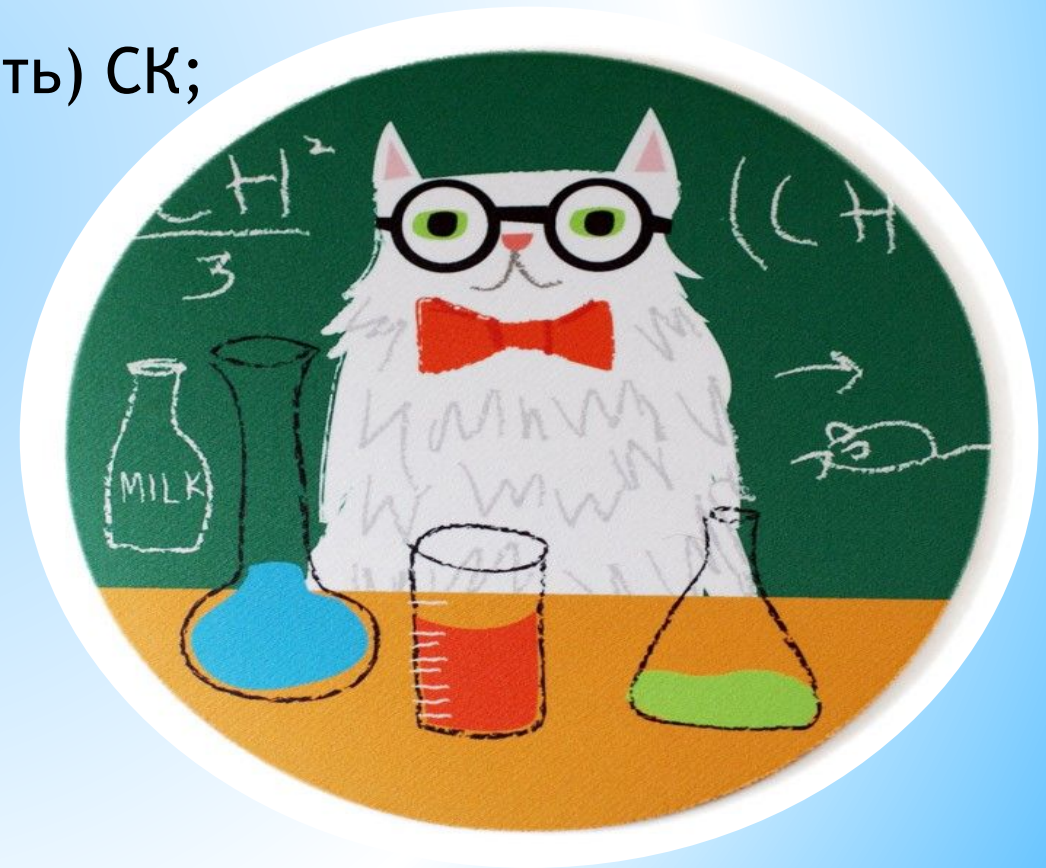
Плюс ИПСК в том, что они получены из собственных клеток пациента и имеют его генотип, в свою очередь ЭСК имеют отличный генетический материал и являются предметом для неутрачивающих этических разногласий



• Клеточные технологии

Основные направления, по которым развиваются биомедицинские клеточные технологии:

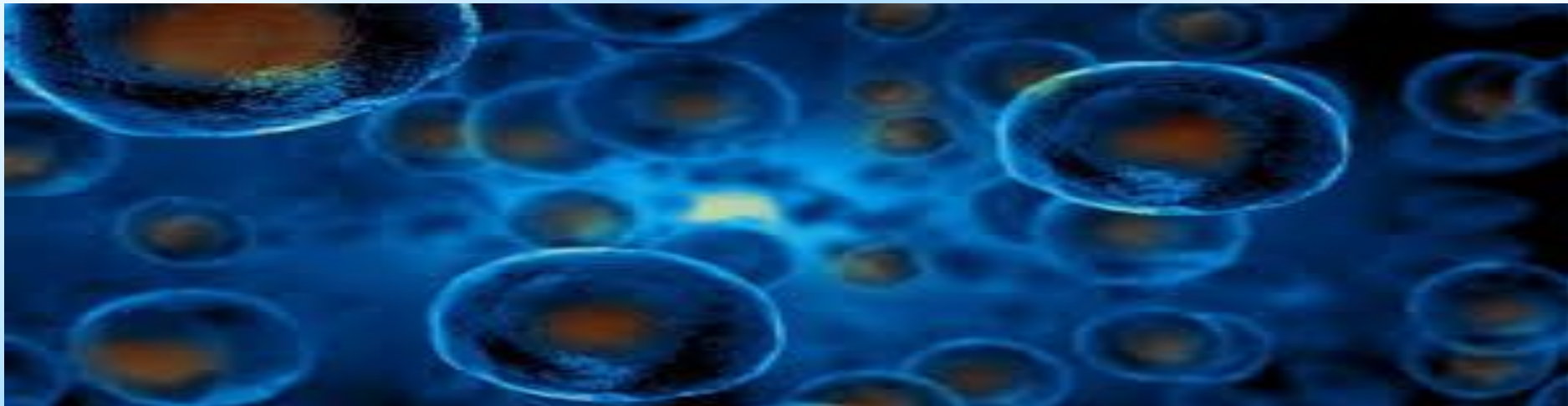
1. Технологии культивирования (получения, хранения СК);
2. Создание банков (хранение, управляемость) СК;
3. Клеточная трансплантология;
4. Терапевтическое клонирование;
5. Тканевая инженерия;
6. Регенеративная медицина.



Технологии культивирования (получения, хранения СК)

Данная технология постепенно сложилась на протяжении последних 100 лет. Еще в начале прошлого века были начаты исследования структуры и функций фрагментов тканей *in vitro* и возможности их переживании в различных биологически активных жидкостях организма, таких как плазма крови и сыворотка крови.

По мере накопления экспериментального опыта сложилась технология выделения и культивирования клеток, которая, тем не менее, продолжает развиваться и в настоящее время. Этот метод поможет создать универсальные «донорские» структуры СК. Такие культуры можно пересаживать любому пациенту, если удалить гены, которые делают клетку «чужеродной» для организма реципиента.

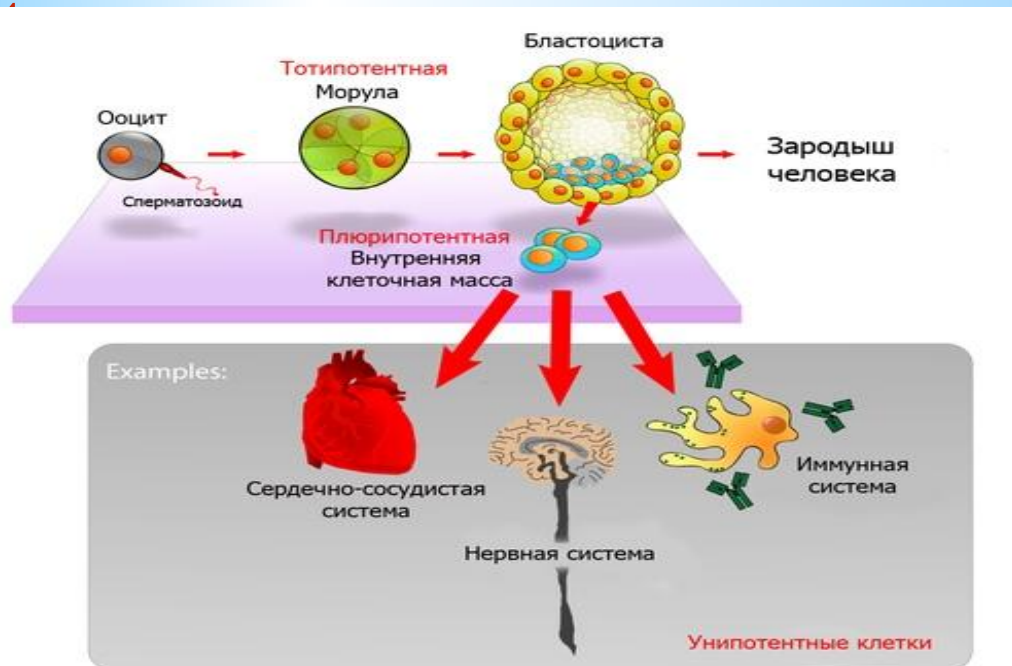


Банк стволовых клеток.

Банк стволовых клеток - это сложное высокотехнологичное медицинское предприятие, производящее гарантирование, по определенным правилам, хранение клеточных образцов, обеспечивающее их последующие применение.

Задачи банков СК:

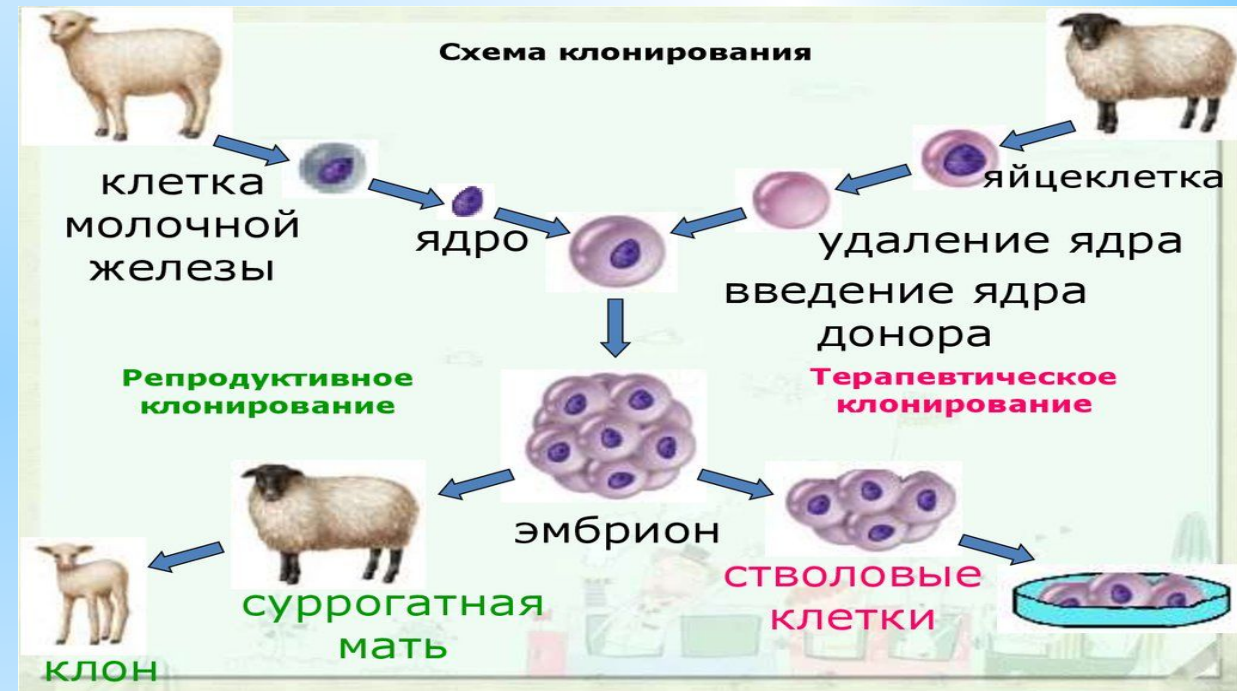
1. Заготовка пуповинной крови.
2. Выделение СК.
3. Исследование и подготовка к их хранению.



Терапевтическое клонирование.

В терапевтическом клонировании используется процесс, известный как пересадка ядер соматических клеток, (замена ядра клетки, исследовательское клонирование и клонирование эмбриона), состоящий в изъятии яйцеклетки (ооцита) из которой было удалено ядро, и замена этого ядра ДНК другого организма. После многих митотических делений культуры (митозов культуры), данная клетка образует бластоцисту (раннюю стадию эмбриона состоящую из приблизительно 100 клеток) с ДНК почти идентичным первичному организму.

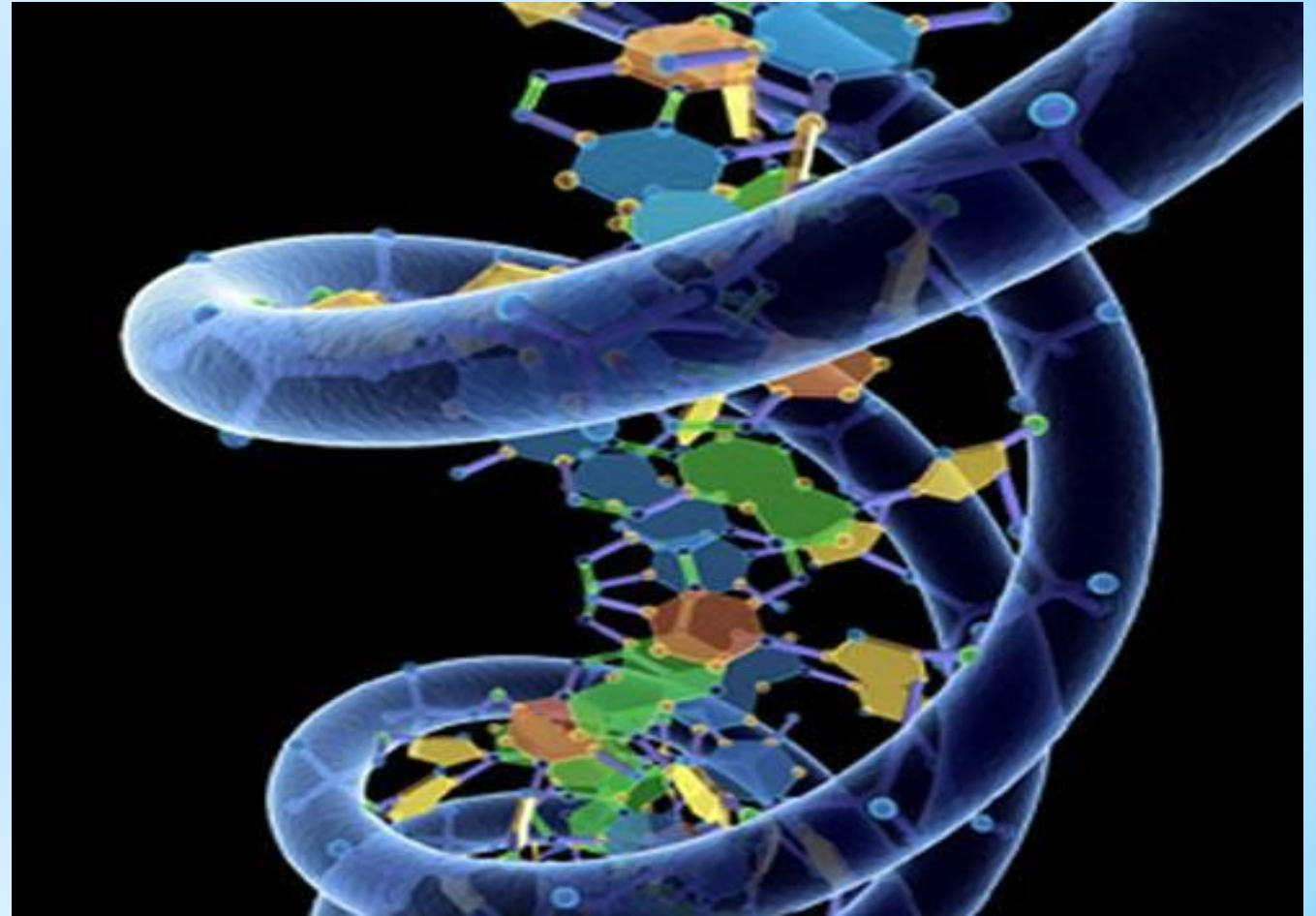
Цель данной процедуры – получение стволовых клеток, генетически совместимых с донорским организмом. Например, из ДНК больного болезнью Паркинсона можно получить эмбриональные стволовые клетки, которые можно использовать для его лечения, при этом они не будут отторгаться иммунной системой больного.



Генная инженерия.

Генная инженерия - это одно из клеточных инновационных технологий XXI века, при которой применяют принципы биологии и инженерного искусства к разработке функциональных заменителей тканей.

Это получение изготовленного на заказ органа из тканей самого пациента.



Тканевая инженерия.



Тканевая инженерия - создание новых тканей и органов для терапевтической реконструкции поврежденного органа посредством доставки в нужную область опорных структур, клеток, молекулярных и механических сигналов для регенерации.

Целью тканевой инженерии является восстановление биологических (метаболических) функций, т. е. регенерация ткани, а не простое замещение ее синтетическим материалом.

В мире ежегодно осуществляется 100 800 пересадок цельных органов:

69 400 пересадок почек, 20 200 пересадок печени, 5 400 пересадок сердца, 3 400 пересадок легких и 2 400 пересадок поджелудочной железы.

Регенеративная медицина.

Регенеративная медицина - это современное направление медицины, позволяющее восстанавливать нарушенные функции органа или целого организма путём стимуляции внутренних восстановительных процессов.

При создании ткане-инженерных эквивалентов с целью их использования в регенеративной медицине необходима разработка новых подходов к оптимизации культивирования клеток в 3D-матрицах.

В этом случае помимо среды ключевую роль в культивировании клеток играет матрица.

Определены 4 основные перекрывающиеся дисциплины, составляющие регенеративную медицину:

1. Использование собственных генов и белков организма для восстановления организма.
2. Использование для лечения СК (например, тканевая инженерия).
3. Использование ЭСК (создание клеточных линий).
4. Использование искусственных тканей и органов на основе новых материалов (Искусственные клапаны сердца).



Основы иммуногистохимических исследований

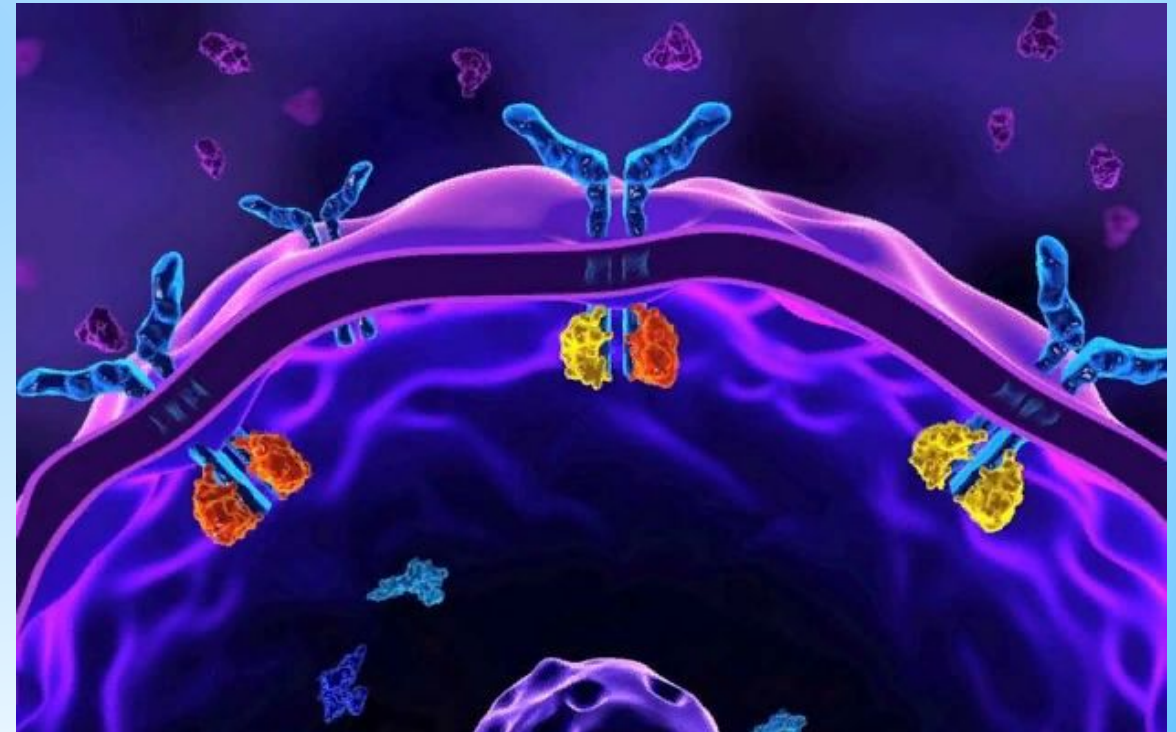
Иммуногистоцитохимия - метод идентификации и определения локализации в клетке и тканях различных структур, имеющих антигенные свойства, основанный на реакции антиген-антитело.

Иммуногистоцитохимия является высокотехнологичным методическим дополнением к традиционным гистологическим методам исследования в клинической диагностике.

Так как в настоящее время стало доступным большое количество поли- и моноклональных антител, обладающих высокой специфичностью и авидностью, количество прикладных задач, для решения которых могут использоваться методы ИГХ, стало практически неограниченным

Эти методы широко используются для:

1. дифференциальной диагностики опухолей, определения источника
2. метастаза при неясном очаге опухоли, оценки гормонального статуса опухоли, иммунофенотипирования опухолей, например,
3. опухолей лимфоидной системы, определения факторов прогноза опухолевого процесса;
4. идентификации различных микроорганизмов (бактерий, вирусов);
5. определения гормонов и их рецепторов и т.д.



Принцип метода

Основой ИГХ-метода является иммунологическая реакция антигена и антитела.

ИГХ-методы позволяют локализовать и идентифицировать клеточные и тканевые антигены, основываясь на их связывании с антителами.

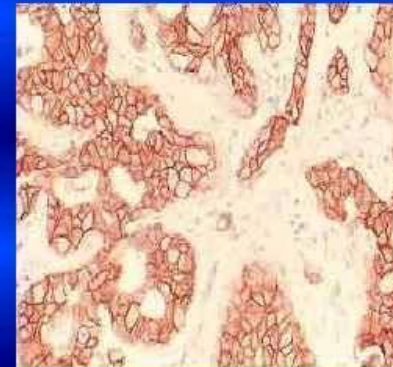
Использование антител лежит в основе исследований самых разных молекулярных образований:

- структурных компонентов клетки;
- рецепторов клеточной поверхности;
- клеточных продуктов (гормонов, ферментов, иммуноглобулинов).

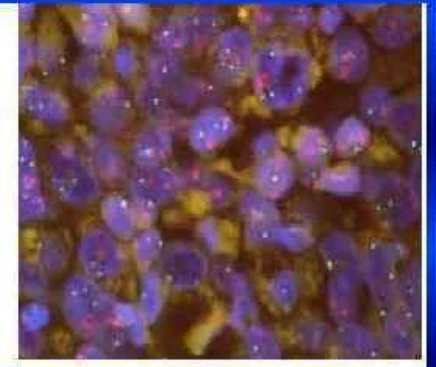
Для визуализации места связывания антигена с антителом используется целый ряд меток:

- флуоресцентные красители;
- ферментные метки;
- металлы;
- металлопротеины;
- радиоизотопы.

■ **Иммуногистохимический метод** визуализации белка на опухолевых клетках — первичный скрининг:



■ **Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH)** для оценки амплификации гена при ИГХ 2+:



Моноклональные антитела получают методом гибридной технологии. Несмотря на то, что их получение многоэтапное и сложное, они, являются высокоспецифичными и высокоаффинными антителами и направлены к одному антигену.

Поликлональные антисыворотки, получаемые при иммунизации животных, содержат АТ к различным эпитопам антигена (АГ). Для получения поликлональной антисыворотки лабораторному животному вводят очищенный АГ вместе с неспецифическим стимулятором иммунного ответа - адъювантом. АГ стимулирует множество В-лимфоцитов, каждый из которых дает клон плазматических клеток, продуцирующий АТ. АГ может иметь несколько эпитопов и антисыворотка содержит иммуноглобулины против каждого из них, причем каждый клон плазматических клеток способен вырабатывать АТ лишь к одному типу эпитопов.

Антитела

- Моноклональные
- Поликлональные

Поликлональные антитела



Моноклональные антитела

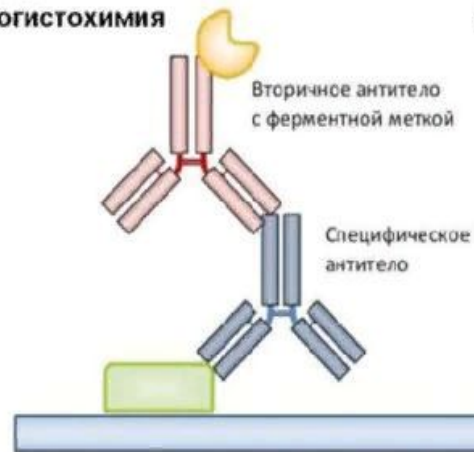


Существует несколько наиболее часто используемых вариантов постановки ИГХ метода:

Визуализация = детекция

- Прямой метод
- Непрямой метод

Непрямая
иммуногистохимия



Прямая
иммуногистохимия



Прямой метод

Достоинства	Недостатки
Простота в применении	Сложная технология получения антител → редкие и дорогие реагенты
Протокол короче	Не все антитела возможно конъюгировать с меткой
Нет перекрёстной реакции	Меньше чувствительность

Непрямой метод

Достоинства	Недостатки
Чувствительность выше	Возможны перекрёстные реакции
Первичные антитела легче проникают в ткани	

Учет результатов исследования.

Для учета результатов ИГХ-исследования необходим световой микроскоп соответствующего класса. Системы архивации и анализа изображения, состоящие из светового микроскопа, цифровой фотокамеры и компьютера, позволяют сохранять изображения полученных микропрепаратов в оцифрованном виде и подвергать его различным методам морфоанализа с помощью специализированных программ.



Самый распространённый анализ, определяемый при иммуногистохимическом исследовании, это наличие рецепторной чувствительности к гормонам у опухоли.

Иммуногистохимическое исследование при раке выполняется для того, чтобы понять, какими препаратами можно лечить злокачественную опухоль, и к каким видам препаратов она чувствительна.



Иммуногистохимическое исследование проводится для определения наличия в опухолевых клетках различных точек приложения, например, наличие рецепторов эстрогенов (ER) и прогестеронов (PR). Также иммуногистохимия выполняется для определения показателя Ki-67 (индекс пролиферативной активности опухолевых клеток), гиперэкспрессии белка Her2neu.

1. ER / PR (Эстрогеновые и прогестероновые рецепторы, ER- estrogen receptor, PR-progesterone receptor)

ER и PR - протеиновые рецепторы на поверхности опухолевых клеток. В организме человека постоянно вырабатываются гормоны - эстроген и прогестерон. Эти гормоны воздействуют на ER и PR рецепторы, что приводит к стимуляции роста опухолевых клеток.

Определение Эстрогеновых и Прогестероновых рецепторов является одним из важнейших моментов, определяющих чувствительность опухоли к терапии гормональными препаратами. Чаще всего наличие рецепторов ER/PR определяют при раке молочной железы. Их наличие дает возможность, помимо стандартных методов лечения, применить гормональную терапию.

2. Her2Neu (от англ. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)

Her2Neu - это рецептор эпидермального фактора роста раковой клетки. Это - ген, который воздействует на мембранные рецепторы клетки, и стимулирует её к усиленному делению. В некоторых опухолях (чаще всего рак молочной железы, рак пищевода, рак желудка) присутствует гиперэкспрессия (повышенная активность) Her2Neu, что вызывает быстрое деление опухолевой клетки и её повышенную активность.

Иммуногистохимическое исследование:

Результаты иммуногистохимического исследования выражаются в баллах:

- * 0-1 означает, что опухоль без гиперэкспрессии Her2neu.
- * 3 означает, что опухоль с гиперэкспрессией Her2neu.

3. Ki-67 Ki-67 - это маркер пролиферативной активности опухолевой клетки.

Данный параметр оценивается в процентах и показывает, сколько процентов опухолевых клеток активно делятся. Если Ki-67 меньше 15%, опухоль считается слабоагрессивной, при показателе Ki-67 от 30 до 50% опухоль считается агрессивной, а при показателе Ki-67 выше 50% опухоль является высокоагрессивной.

Иммунофлюоресценция

Более полувека назад иммунофлюоресценция, ворвавшись в медицину, совершила технологическую революцию в изучении патогенеза и разработке новых методов диагностики ряда заболеваний аутоиммунного происхождения, таких как аутоиммунная пузырчатка, буллезный пемфигоид Левера, приобретенный буллезный эпидермолиз, герпетиформный дерматит Дюринга, линейный IgA-зависимый буллезный дерматоз.

Иммунофлюоресцентный метод (РИФ, реакция иммунофлюоресценции, реакция Кунса) - метод выявления специфических АГ с помощью АТ, конъюгированных с флюорохромом. Обладает высокой чувствительностью и специфичностью.



Применение

Применяется для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний (идентификация возбудителя в исследуемом материале), а также для определения АТ и поверхностных рецепторов и маркеров лейкоцитов (иммунофенотипирование) и др. клеток.

Обнаружение бактериальных и вирусных антигенов в инфекционных материалах, тканях животных и культурах клеток при помощи флюоресцирующих антител (сывороток) получило широкое применение в диагностической практике.

Приготовление флюоресцирующих сывороток основано на способности некоторых флюорохромоов (например, изотиоцианата флюоресцеина) вступать в химическую связь с сывороточными белками, не нарушая их иммунологической специфичности.

Классификация

Различают три разновидности метода: прямой, непрямой, с комплементом. Прямой метод РИФ основан на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, меченными флюорохромами, способны светиться в УФ-лучах люминесцентного микроскопа. Бактерии в мазке, обработанные такой люминесцирующей сывороткой, светятся по периферии клетки в виде каймы зеленого цвета. Непрямой метод РИФ заключается в выявлении комплекса антиген - антитело с помощью антиглобулиновой (против антитела) сыворотки, меченной флюорохромом. Для этого мазки из взвеси микробов обрабатывают антителами антимикробной кроличьей диагностической сыворотки. Затем антитела, не связавшиеся антигенами микробов, отмывают, а оставшиеся на микробах антитела выявляют, обрабатывая мазок антиглобулиновой (антикроличьей) сывороткой, меченной флюорохромами. В результате образуется комплекс микроб + антимикробные кроличьи антитела + антикроличьи антитела, меченные флюорохромом. Этот комплекс наблюдают в люминесцентном микроскопе, как и при прямом методе.

Реакция иммунофлюоресценции

Antigen Detection Methods

Fluorochrome
(e.g. FITC)

Specific
primary antibody

Peroxidase-
antiperoxidase
complex

Avidin

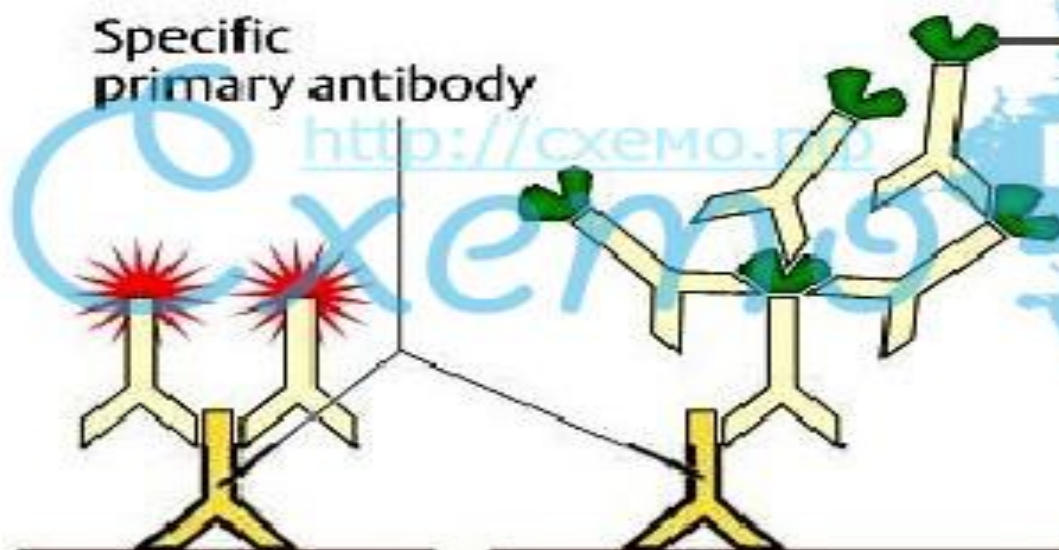
Biotin

Enzyme

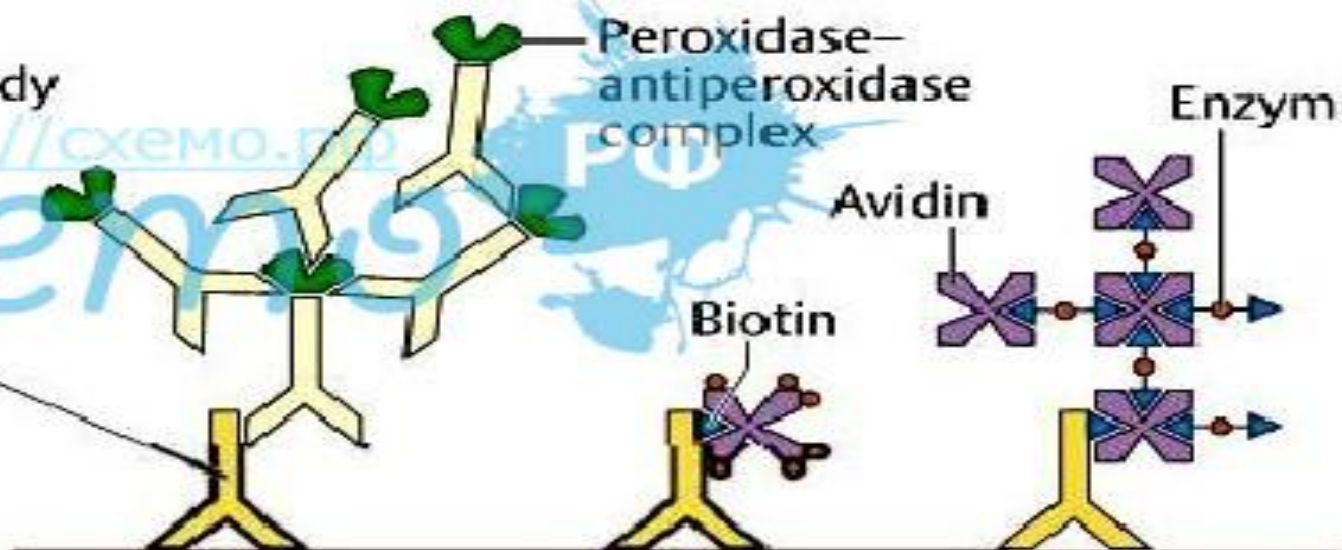


Tissue section

a Direct



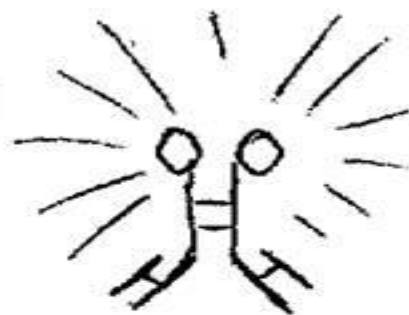
b Indirect



c Indirect with amplification

Непрямая /прямая иммунофлюоресценция (ИРИФ)

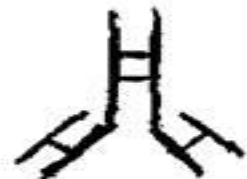
2-й этап



**Античеловеческая
сыворотка, меченная
флюоресцеином**

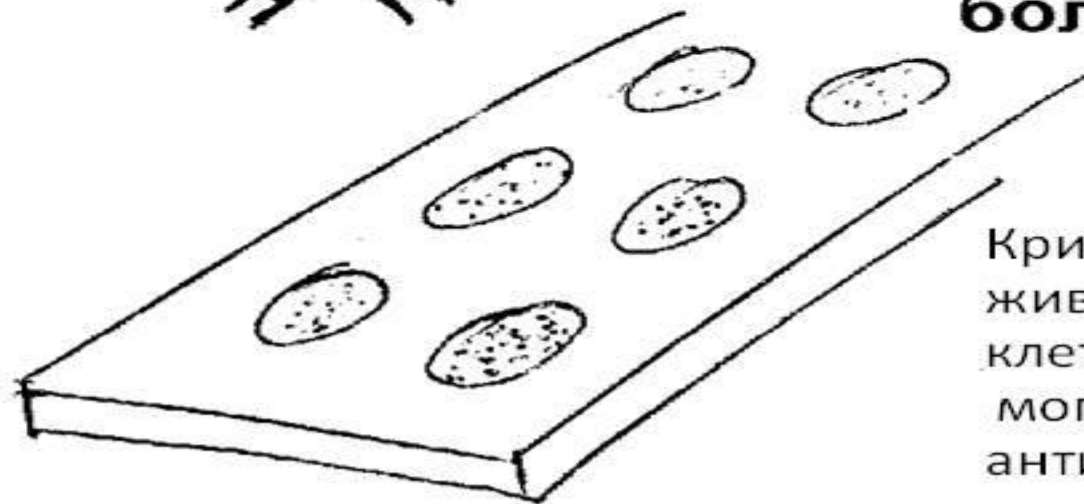
Монтирование в щелочном
глицерине (pH=8,3) и
флюоресцентная
микроскопия

1-й этап



**Аутоантитела
в сыворотке
больного**

Серийные разведения
сыворотки больного в
буфере близком сыворотке
крови



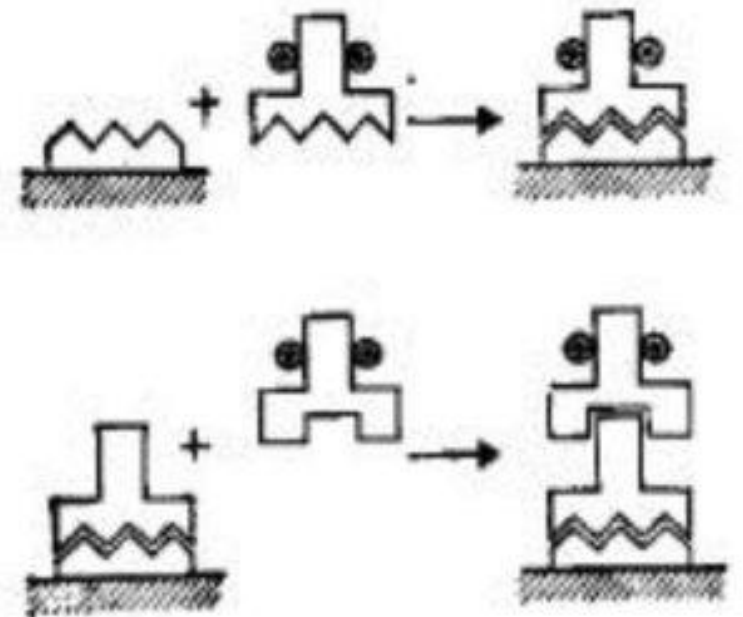
Криосрезы ткани лабораторных
животных, клеточные линии, выделенные
клеточные популяции,
могут быть нанесены очищенные
антигены (spot-IFF)

Прямая реакция иммунофлюоресценции

Прямой метод иммунофлюоресцентного анализа

- Препарат отмывают ФСБ в течение 10 минут (однократная смена буфера), высушивают.
- Инкубируют препарат с различными разведениями коньюгата.
- Препарат промывают ФСБ в течение 30 минут (троекратная смена буфера).
- Препарат высушивают и заключают в подходящий материал.

Прямой метод



Механизм действия

Механизм. На предметном стекле готовят мазок из исследуемого материала, фиксируют на пламени и обрабатывают иммунной кроличьей сывороткой, содержащей антитела против антигенов возбудителя. Для образования комплекса антиген – антитело препарат помещают во влажную камеру и инкубируют при 37 °С в течение 15 мин, после чего тщательно промывают изотоническим раствором хлорида натрия для удаления не связавшихся с антигеном антител. Затем на препарат наносят флюоресцирующую антиглобулиновую сыворотку против глобулинов кролика, выдерживают в течение 15 мин при 37 °С, а затем препарат тщательно промывают изотоническим раствором хлорида натрия. В результате связывания флюоресцирующей антиглобулиновой сыворотки с фиксированными на антигене специфическими антителами образуются светящиеся комплексы антиген – антитело, которые обнаруживаются при люминесцентной микроскопии.

Проточная цитофлуориметрия

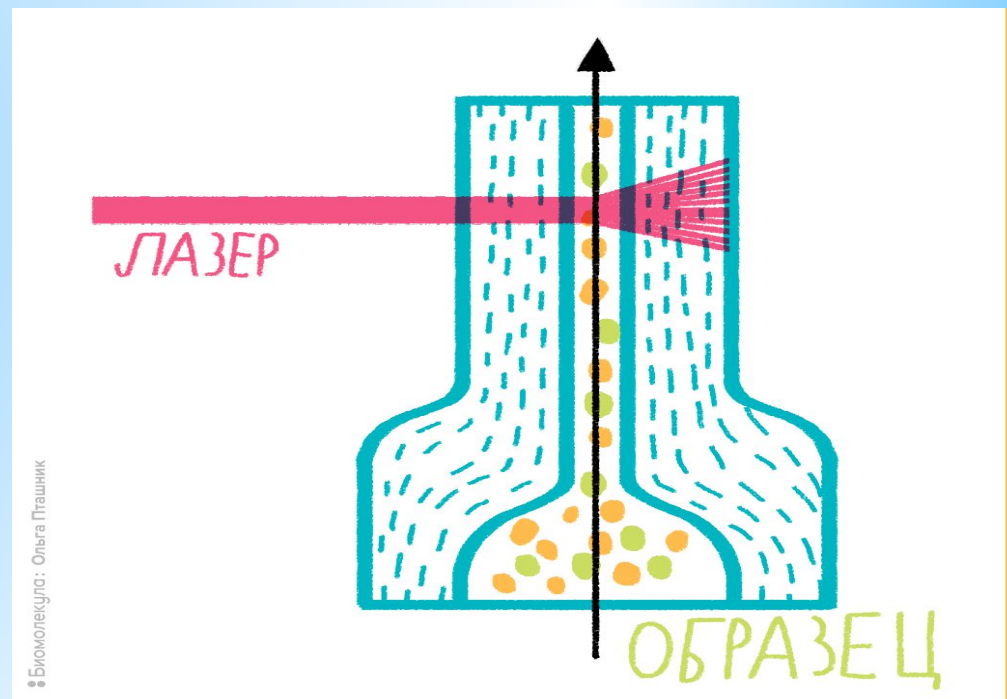
- это метод, основанный на измерении светорассеивания и специфической флуоресценции клеток при освещении их лазером. Светорассеивание определяется размерами клеток, наличием гранул и других внутриклеточных органелл, что позволяет распределить их по соответствующим признакам. Специфическая флуоресценция обусловлена окраской клеток моноклональными антителами против CD-антигенов, меченных флуорохромами.

Для того чтобы отличить клетки друг от друга и проанализировать их параметры ЦФ

Ее физические принципы весьма просты. Суспензия клеток, предварительно помеченных *флуорохромами*, помещается в поток жидкости, пропускаемый через проточную ячейку. Получается как бы «поток в потоке», что порождает эффект гидродинамического фокусирования: исследуемые клетки выстраиваются в цепочку и в таком порядке пересекают пучок лазерных лучей, служащих для анализа каждой отдельно взятой клетки.

Свет, исходящий от флуорохромов, фокусируют при помощи оптической системы, состоящей из нескольких зеркал и линз, а затем раскладывают на определенные компоненты. Полученные световые сигналы преобразуют в электрические импульсы и анализируют при помощи специального программного обеспечения.

Таким образом, результат цитометрического анализа — определение состояния каждой клетки в каждой из популяций образца. Всего за несколько десятков секунд сквозь проточную ячейку проходят тысячи клеток, позволяя исследователю сделать вывод о составе и характеристиках клеточной суспензии



Лейкоциты,
окрашенные
мечеными
антителами

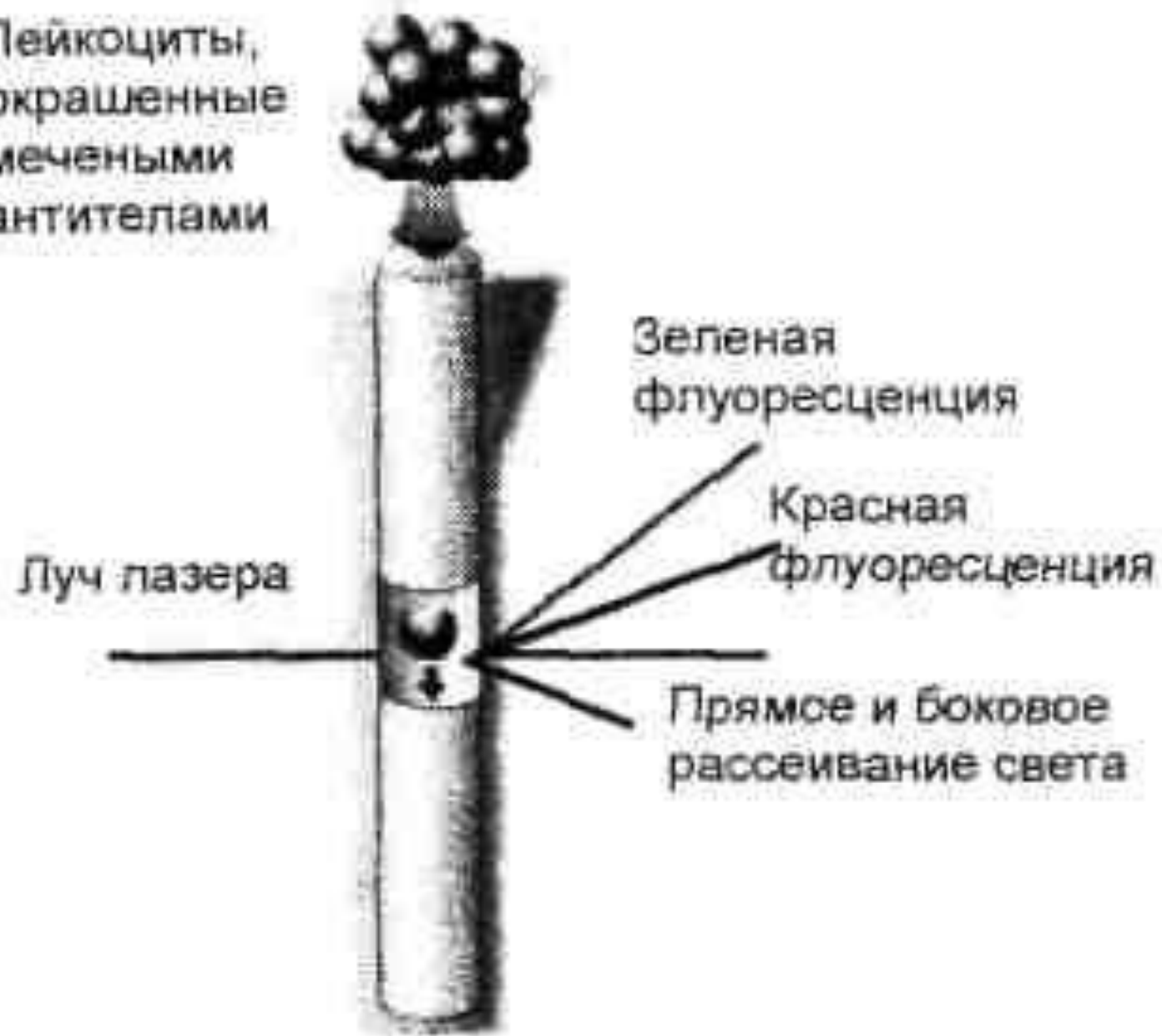


Схема 3. Цитофлуориметрия

В ходе анализа возможно определять 5-10 различных параметров клетки: размер, содержание ДНК, белков и липидов, антигенные свойства и активность ферментов, а также возможны исследование клеточного цикла, мониторинг состояния вирусного процесса и др.

Преимущества проточной цитометрии

- * Проточная цитометрия является достаточно мощным методом с массой уникальных достоинств:
- * быстрый анализ (до 30 000 событий в секунду);
- * анализ большого количества клеток (до 10^6 - 10^8 клеток в образце);
- * количественное измерение интенсивности флуоресценции;
- * получение данных для каждой конкретной клетки;
- * одновременный анализ разных процессов;
- * разделение популяций, а значит, возможность анализировать происходящее только в минорной популяции, не проводя для этого дополнительных операций для ее выделения или концентрирования;

Важнейшие области применения цитофлуориметрии

- * онкогематология (определение происхождения и степени дифференцировки опухолей крови);
- * трансплантация (ауто трансплантация) красного костного мозга и стволовых клеток;
- * клиническая иммунология (морфофункциональный анализ состояния иммунокомпетентных клеток (ИКК) организма человека;
- * научные исследования;
- * другие задачи, требующие анализа частиц в суспензии (микробиология, цитология и др.).