ГБОУ ВПО НижГМА Росздрава

Кафедра патологической физиологии

РЕФЕРАТ

***Проточная цитофлоуметрия как метод иммунологии***

Выполнила: студентк 4 курса

лечебного факультета

Колесников Р.П.

Проверила: профессор кафедры

Шевченко Е.А.

Н. Новгород 2014

***Содержание***

Введение

Принципиальная схема устройства

Принцип работы проточного цитофлуориметра

Сравнительная характеристика приборов для проточной цитометрии

Диагностические наборы для проточной цитометрии

Литература

# ***Введение***

Первый патент на устройство, которое легло в основу проточной цитометрии, использующее принцип сопротивления Култера было зарегистрировано в США в 1953 году, его автор Wallace H. Coulter. Адсорбционные методы на тот момент были распространены гораздо шире флуоресцентных. Первый прибор, использующий флуоресценцию, был создан в 1968 году Wolfgang Göhde из University of Münster и почти сразу получил коммерческое использовани немецким разработчиком и изготовителем Партеком (Partec) в Геттингене. Новый метод быстро получил свое признание и развитие, и в период 70 х годов появилось несколько инструментов для проточной цитометрии включая Cytofluorograph (1971) от Bio/Physics Systems Inc., PAS 8000 (1973) от Partec, первые FACS оснащают датчиками от Becton Dickinson (1974), ICP 22 (1975) от Partec/Phywe и Epics от Коултера (1977/78). Изначально методику называли пульсовой цитофлоуметрией. Только 20 лет спустя в 1988, на Конференции американского Технического Фонда в Пенсаколе, штат Флорида, название было изменено на "проточную цитометрию".

проточная цитофлоуметрия иммунология диагностический

# ***Принципиальная схема устройства***

Проточный цитометр включает три основных блока:

) Оптический, где производится измерение

2) Блок обработки сигналов, где сигналы усиливаются и преобразуются в электрические.

) Блок сбора и обработки данных.

**Оптические системы**

Источником света обычно служит лазер. Он способен направить на клетку интенсивный световой сигнал и создать чувствительную систему обнаружения.

Световой сигнал проходит через соответствующие линзы и зеркала и попадает на ФЭУ. На этой стадии передачи сигнала используются оптические фильтры для выделения света с определенной длиной волны, благодаря чему на каждый детектор попадает только избранный тип светового сигнала, например зеленое или красное излучение клеток при флуоресценции или рассеянный свет. Оптический блок предназначен для измерения рассеяния света и флуоресценции. Современные цитометры оборудованы несколькими фотоэлектронными умножителями, что позволяет одновременно регистрировать несколько типов флуоресценции.

**Система сбора и обработки данных**

Сигналы, поступающие от детекторов, усиливаются, их амплитуды измеряются и анализируются в цифровой форме для каждой клетки отдельно. Результаты анализа используются для построения распределений (гистограмм) исследованных клеток по их характеристикам.

# ***Принцип работы проточного цитофлуориметра***

**Проточная цитометрия** - метод исследования дисперсных сред в режиме поштучного анализа элементов дисперсной фазы по сигналам светорассеяния и флуоресценции. Название метода связано с основным приложением, а именно, с исследованием одиночных биологических клеток в потоке.

Метод проточной цитофлуориметрии широко используется в медико-биологических исследованиях. Востребованность цитометрии объясняется быстротой, точностью и надежностью метода. Определение фенотипа каждой клетки в сочетании с анализом большого количества событий дает максимально полную информацию в кратчайшие сроки.



При проведении исследования клетки, окрашенные тем или иным флуоресцентным красителем, вводят с потоком буферного раствора в вибрирующую камеру с форсункой. В каждой капле жидкости, выходящей из форсунки, содержится одна клетка. Источник света (чаще всего лазер) освещает отдельные клетки в проходящей через световой пучок тонкой струе жидкости. Исходный световой луч рассеивается клеткой. Это рассеяние измеряется с помощью фотоэлектронного умножителя (ФЭУ). Рассеяние света под малыми углами может быть использовано для определения размеров клетки. На основе данного параметра можно отличить жизнеспособные ядерные клетки от мертвых и эритроцитов. Рассеяние света под углом 90 градусов позволяет судить о соотношении размеров ядра и цитоплазмы и наличии гранул в клетке. Полученные характеристики позволяют разделить анализируемые лейкоциты на лимфоциты, моноциты, нейтрофилы.

Одновременно можно проводить анализ поверхностных и внутриклеточных антигенов клеток с помощью моноклональных антител к ним, конъюгированных с различными флуоресцентными метками. Если анализируемая клетка содержит флуорохром, то он испускает излучение соответствующих параметров, при этом интенсивность флуоресценции коррелирует плотностью антигена на клеточной поверхности, а уровень флуоресценции измеряется с помощью ФЭУ.

В практике широко используются два флуоресцентных красителя - ***флуоресцеин-5-изотиоционат (ФИТЦ) и R-фикоэритрин (ФЭ).*** Они возбуждаются аргоновым лазером и длиной волны 488 нм и излучают флуоресценцию в разных диапазонах волн: ФИТЦ излучает свет в зеленом спектре, а ФЭ - в оранжево-красном. Красители различаются как по специфичности их молекулярного связывания, так и по оптическим характеристикам, таким как спектр поглощения, возбуждение флуоресценции и др. В настоящее время спектр используемых флуорохромов расширился. Основные используемые флуорохромы: Alexa Fluor 405, Pacific Blue, AmCyan, Alexa Fluor 488, FITC, PE, PE-Texas Red, Texas Red,APC, Alexa Fluor 647 и др. А также флуорохромы, связывающиеся с ДНК: Бромистный этидий, Пропидиум йодид.

# ***Сравнительная характеристика приборов для проточной цитометрии***

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  **Проточный цитофлуориметр СYTOMICS FC 500**  |  **Проточный цитофлуориметр CELL LAB QUANTA SC**  |  **Проточный цитофлуориметр CyAn ADP** |  **Проточный цитофлуориметр GALLIOS**  |
| **Источник возбуждения** | Лазеры: Однофазный аргоновый, 488 нм, выходная мощность 20 мВт Однофазный красный диодный, 638 нм, выходная мощность 22 мВт  | -Синий лазер (488 нм) меркуриевая лампа дугового разряда. (При помощи фильтров из её спектра выделяются фиолетовые (405 и 435 нм) и УФ (366 нм) линии.)  | Твердотельный лазер 405 нм, 50 мВт (CyAn ADP 9 color); Твердотельный лазер 488 нм, 25 мВт; Диодный лазер 642 нм, 60 мВт | -Синий полупроводниковый диодный лазер, 488 нм, 22 мВт -Красный полупроводниковый диодный лазер, 638 нм, 25 мВт -Фиолетовый полупроводниковый диодный лазер, 405 нм, 40 мВт (опция)  |
| **Чувствительность и разрешение** | Определяет частицы диаметром от 0,5 мкм до 40 мкм  | от 3 до 40 мкм  | Чувствительность MESF FITC < 100, MESF РЕ < 50 | 0,404 мкм - 40 мкм |
| **Размер проточной кюветы** | Прямоугольный канал BioSense 150 x 450 мкм  | Стандартная треугольная проточная ячейка 125 мкм | Из кварцевого стекла, с 250 мкм внутренним каналом квадратного сечения | Прямоугольная кварцевая, 150\*460 мкм |
| **Скорость анализа** | 3300 событий/сек | До 10000 событий в секунду | До 70000 событий в секунду | До 10000 событий в секунду |
| **Скорость тока**  | Скорость потока (низкая, средняя, высокая) задается оператором | Скорость потока пробы (в базовом варианте) 4,17-100 мкл/мин  | До 150 мкл/мин (2,5 мкл/с)  | Скорость потока (низкая, средняя, высокая) задается оператором  |
| **Детекторы** | -Детектор светорассеяния в прямом направлении - запатентованный полупроводниковый детектор на основе модели Фурье Детектор бокового светорассеяния - высокоэффективный светодиод Детекторы флуоресценции - высокоэффективные фотоумножители со спектральной чувствительностью от 185 до 900 нм | 3 высокочувствительных широкополосных фотоумножителя | -Детектор светорассеивания в прямом направлении -Детектор светорассеивания в боковом направлении -Детекторы флуоресценции (7)  |  - Детектор светорассеивания в прямом направлении -Детектор светорассеивания в боковом направлении -Детекторы флуоресценции |

# ***Диагностические наборы для проточной цитометрии***

Набор APOPTEST-FITC для определения апоптоза. **Производство - Dako.**

Набор APOPTEST-FITC включает конъюгированный с флуоресцентной меткой аннексин V и краситель - иодид пропидия, таким образом можно разделить апоптозные, жизнеспособные и некротизированные клетки.

Набор MACSPlex для определения 12 цитокинов человека. Производство - Miltenyi Biotec.

В состав набора входят 12 популяций микросфер, покрытых иммобилизированными антителами, специфичными к следующим цитокинам: GM-CSF, IFN-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-17A и TNF-α.

Набор QIFIKIT для количественного определения антигенов на клеточной поверхности. **Производство - Dako.**

Набор QIFIKIT состоит из 6 популяций микросфер диаметром ~10мкм, несущих на поверхности различные, четко определенные количества мышиных моноклональных антител (Mab). Число молекул Mab на 6 популяциях микросфер определено в диапазоне от 0 до 400000-800000. Микросферы, имитирующие клетки, помечены специфическими первичными мышиными моноклональными антителами.

Набор для количественной оценки CD34 клеток **Производство - Dako.**

Набор включает два антитела, анти-человеческий CD34 и анти-человеческий CD45. Кроме того, он содержит CytoCount, суспензию флюоресцентных микросфер, которые используются в качестве референсной популяции для подсчета абсолютных значений CD34+. В дополнении, набор содержит EasyLyse, не требующий отмывки и фиксации, аммониум хлоридный реагент для лизиса эритроцитов, а так же раствор для определения жизнеспособности 7-аминоактиномицин D (7-AAD), который позволяет исключить мертвые клетки из анализа.

Набор для определения 11 цитокинов методом проточной цитометрии, 11 plex (IFN-g, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12,TNF-a,TNF-b. **Производство - Bender Medsystems.**

Набор для определения 11 цитокинов методом проточной цитометрии \_11plex (IFN-g, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12,TNF-a,TNF-b. Производство - Bender Medsystems.

Данный набор предназначен для количественного определения интерферона-гамма, интерлейкина 1-бета, интерлейкина-2, интерлейкина-4, интерлейкина-5, интерлейкина-6, интерлейкина-8, интерлейкина-10, интерлейкина-12р70, фактора некроза опухолей-альфа и - бета (IFN-g, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF-a, TNF-b) в супернатантах культур клеток, сыворотках, плазме, цельной крови и других биологических жидкостях методом проточной цитофлуориметрии.

Набор для определения 6 кардиомаркеров методом проточной цитометрии 6 plex (sCD40L, IL-6, IL-8, MCP-1, P-селектин, t-PA), 96. **Производство - Bender Medsystems.**

Набор для определения 6 хемокинов методом проточной цитометрии 6plex (G-CSF, IL-8, MCP-1, MIG, MIP-1a, MIP-1b 96. **Производство - Bender** Medsystems.

Набор для определения 9 маркеров ожирения методом проточной цитометрии 9plex (sCD40L, sICAM-1, IL-6, лептин, MCP-1, MPO, OPG, резистин, sTNF-R1), 96. **Производство - Bender Medsystems.**

Набор для фенотипирования МСК (мезенхимальных стромальных клеток) человека. **Производство - Miltenyi Biotec.**

Набор включае реагенты, предназначенные для: подсчета МСК, основываясь на экспрессии CD73, CD90, CD105, исключения нецелевых клеток, основываясь на экспрессии CD14, CD20, CD34, CD45, контрольного окрашивания при помощи коктейля изотип-контролей, компенсации с использованием одноцветных конъюгированных с флуорохромами антител.

Набор IngoFlowEx Kit для оценки фагоцитарной активности. Производство - ExBio

В состав набора входят E. Coli-FITC, гасящий реагент, промывочный буфер, лизирующий раствор и краситель ДНК (PI).

# ***Литература***

1. <http://www.ld.ru/flow-cytometry/ilist-3997.html>

2. http://www.awt.ru/datas/catalogs/katalog\_2012/citoflourimeters. pdf <http://www.awt.ru/datas/catalogs/katalog\_2012/citoflourimeters.pdf>

3. Л.В. Ковальчук, Г.А. Игнатьева, Л.В. Ганковская "Иммунология. Практикум. "