

### ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ – ПРЕИМУЩЕСТВА МЕТОДА И ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

Проточной цитометрией называют методику исследования дисперсионных субстанций в режиме поштучного анализа частиц, входящих в состав дисперсной фазы по сигналам, получаемым в ходе флуоресценции и рассеивания света. Название методики точно отражает сущность обозначаемого процесса, состоящего в исследовании потока одиночных биологических частиц.

Проточная цитометрия осуществляется на специальных аппаратах – сортерах и проточных цитрометрах. Оба варианта количественной цитометрии имеют широчайшие возможности применения в практике медицинских и биологических исследований. Несмотря на разность используемого клинического материала и экспериментальных моделей решаемые ими задачи подчиняются общим принципам исследования.

Методика проточной цитометрии была создана на базе специальных экспериментов по определению размера исследуемых частиц и подсчету их количества. Первый клеточный сортер был создан в 1965 году, а с начала следующего десятилетия был налажен выпуск приборов, предназначенных для измерения интенсивности флуоресценции при нескольких длинах волн с целью определения сразу нескольких параметров изучаемых клеток.

Современные исследователи для осуществления проточной цитометрии используют приборы двух типов:

- Приборы, предназначенные для измерения флуоресценции при двух (и более) длинах волн и рассеивании света под углом в десять (так называемом малоугловом прямом рассеивании) и девяносто градусов. Приборы этого типа отличаются простотой использования.
- Довольно громоздкие клеточные сортеры, способные измерить более пяти параметров исследуемых ядер или частиц, а также отсортировать клетки, обладающие определенным набором параметров.

Устройство современных проточных цитометров настолько сложно и разнообразно, что с трудом поддается какому-либо обобщению и систематизации, однако несколько общих моментов, характерных для всех приборов, все же существует:

- Для проведения анализа на цитометре любого типа требуется гомогенная суспензия клеток определенного типа.
- Не должно быть недостатка в количестве исследуемых клеток или их ядер.
- Чтобы не допустить слипания клеток, исследователь должен обладать всей полнотой информации о характере рассеивания света и иметь под рукой таблицы с соответствующими данными.



#### **Образцы.**

В ходе медицинских и биологических исследований изучаются образцы, приготовленные из клеток:

- костного мозга;
- крови;
- спинномозговой жидкости (ликвора);
- синовиальной (суставной) жидкости;
- плевральной жидкости;
- перитонеальной (асцитической) жидкости, накапливающейся в брюшной полости в процессе развития асцита;
- опухолевых и здоровых тканей.

#### **Принцип метода проточной цитометрии.**

Принципы, заложенные в основу процедуры цитометрии, чрезвычайно просты:

Суспензия, приготовленная из клеток, предварительно помеченных флуоресцирующими моноклональными антителами или флуорохромами, помещается в поток дисперсионной среды, пропускаемый через проточную ячейку.

Гидродинамическое фокусирование струи клеточной суспензии в струе дисперсионной среды приводит к тому, что исследуемые клетки или их ядра выстраиваются поодиночке и в таком порядке пересекают пучок сфокусированных световых (обычно лазерных) лучей. Под воздействием определенных световых волн происходит одновременное возбуждение молекул разных флуоресцирующих красителей, что делает возможным анализ сразу нескольких параметров клеточных структур. Свет, исходящий от флуорохромов, фокусируют при помощи оптической системы, состоящей из нескольких зеркал и линз, а затем раскладывают на определенные компоненты. Полученные световые сигналы подвергают анализу и преобразованию в электрические импульсы, а затем – в определенные формы, приемлемые для компьютерной обработки и хранения полученной информации.

#### **Флуорохромы**

Для того чтобы облегчить процесс определения клеточных структур в ходе процедуры проточной цитометрии, используемую дисперсионную среду подкрашивают специальными флуоресцирующими красителями – флуорохромами. После такой обработки исследуемые клетки приобретают способность флуоресцировать (светиться) под воздействием пучка световых лучей.

При выборе того или иного красителя пользуются целым рядом критериев:

- Используемый флуорохром должен быть специфичным по отношению к исследуемой ДНК.

- Спектральные характеристики красителя должны соответствовать возможностям используемой аппаратуры.
  - Немаловажным фактором является стоимость флуорохрома (она не должна быть очень высокой).
  - Используемые красители должны быть удобны в работе (обладать стабильностью и хорошей растворимостью).
- Одним из самых востребованных флуорохромов является йодистый пропидий: его спектральные характеристики идеально подходят для выполнения проточной цитометрии.

Чтобы активизировать флуоресценцию, используя йодистый пропидий, исследователи прибегают к помощи обычного аргонового лазера (рабочая длина его волны составляет 480 нм). Площадь флуоресцирующего участка такова, что позволяет использовать вышеозначенный флуорохром для выполнения многопараметрических измерений.

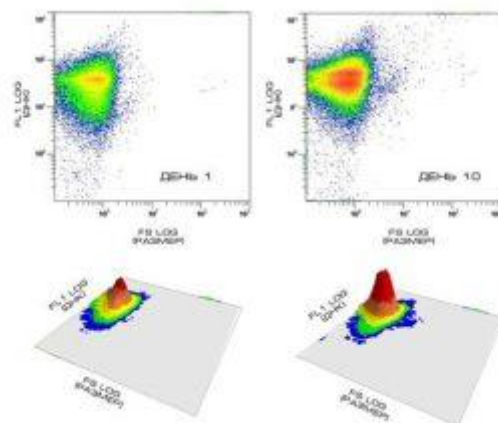
Для проведения проточной цитометрии также используют:

- изотиоцианатфлуоресцеина;
- фикоэритрины (Су5, Су7, техасский красный);
- аллофикоцианин;
- Перидинин-Хлорофилл Протеин.

В качестве флуорохромов могут использоваться также флуоресцирующие моноклональные антитела.

Вне зависимости от того, какой именно краситель принимает участие в процедуре, его количество должно быть прямо пропорционально содержанию ДНК в структуре клетки. Чтобы добиться качественного прокрашивания всех клеточных структур, количество применяемого флуорохрома должно быть избыточным. Большинство флуорохромов, вступающих в контакт с ДНК, не способно пройти сквозь мембраны неповрежденных (интактных) клеток. Для повышения проницаемости клеточных мембран исследуемые клетки обрабатывают поверхностно-активными веществами (детергентами) или спиртом.

#### Преимущества проточной цитометрии.



- Высокая (до ста тысяч эпизодов в секунду) скорость выполнения анализа.
- Возможность определения клеточных субпопуляций.
- Способность выполнить анализ огромного (до 108 элементов в одном мл дисперсионной среды) количества клеток.
- Возможность определения параметров любых клеток и клеточных структур (в том числе и редко встречающихся).
- Высокую степень объективности в измерении интенсивности свечения (флуоресценции).

Проточная цитометрия является высокотехнологичным методом быстрого измерения характеристик клеток. Проточная цитометрия основывается на арсенале флуоресцентных методов анализа структурных компонентов клеток, их антигенов и внутриклеточных процессов. Этим методом исследуются выборки от нескольких тысяч до нескольких миллионов клеток, что гарантирует статистическую достоверность результатов. Проточные цитометры обладают высокой чувствительностью и высоким уровнем автоматизации, простотой эксплуатации и имеют небольшие размеры, что позволяет рассматривать их не только как исследовательские, но и как клинико-диагностические инструменты.

#### Где применяется?

В клинической практике наиболее часто проточную цитометрию используют для исследования клеток крови и костного мозга, их антигенного состава, функциональной активности, количества ДНК и РНК, определения уровня внутриклеточной продукции цитокинов, фагоцитарной активности, активности внутриклеточных ферментов («проточная цитоэнзимология»).

Также возможно количественное и качественное исследование таких физиологических внутриклеточных параметров, как рН (флуоресцеин и 7-гидроксикумарин), концентрация свободных ионов кальция (Fura-2, Indo-1, Fluo-3), уровень окислительных процессов, активация митохондрий, потенциал наружной мембраны клеток, процессы, связанные с апоптозом, и т. д.

Примеры стандартных наборов моноклональных антител для проточной цитометрии для использования в клинической практике и их примерная стоимость

При онкологических заболеваниях:

- Т-лимфоциты (**CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>**) – 675 240 тг (на 50 тестов);
- Т-хелперы/индукторы (**CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>**) – 675 240 тг (на 50 тестов)
- Т-цитотоксические лимфоциты (Т-ЦТЛ) (**CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>**) – 675 240 тг (на 50 тестов)
- истинные натуральные "киллеры" (NK-клетки) (**CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>**),
- В-лимфоциты (**CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>**) – 675 240 тг (на 50 тестов)
- Т-лимфоциты, экспрессирующие маркеры NK-клеток (Т-NK-клетки) (**CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>**) – 675 240 тг (на 50 тестов)
- NK-клетки цитолитические (**CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>**) – 675 240 тг (на 50 тестов)
- NK-клетки цитокинпродуцирующие (**CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>**) – 675 240 тг (на 50 тестов)
- NK-клетки, экспрессирующие альфа-цепь антигена CD8 (**CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>**) – 675 240 тг (на 50 тестов)
- активированные В-лимфоциты (**CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>**) – 675 240 тг (на 50 тестов)
- активированные Т-лимфоциты (**CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>**) и активированные цитотоксические лимфоциты (**CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>**) – 675 240 тг (на 50 тестов)
- В-лимфоциты и активированные NK-клетки (**CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>**) – 675 240 тг (на 50 тестов)
- активированные Т-лимфоциты, экспрессирующие альфа-цепь рецептора ИЛ-2 (**CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>**)

При иммунодефицитах:

- Т-лимфоциты (**CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>**) – 675 240 тг (на 50 тестов)

- Т-хелперы/индукторы (CD3+CD4+CD45+) – 675 240 тг (на 50 тестов)
  - Т-цитотоксические лимфоциты (Т-ЦТЛ) (CD3+CD8+CD45+) – 675 240 тг (на 50 тестов)
  - истинные натуральные "киллеры" (NK-клетки) (CD3+CD56+CD45+) – 675 240 тг (на 50 тестов)
  - В-лимфоциты (CD19+CD3-) – 675 240 тг (на 50 тестов)
  - Т-лимфоциты, экспрессирующие маркеры NK-клеток (Т-NK-клетки) (CD3+CD16+56+CD45+) – 675 240 тг (на 50 тестов)
  - NK-клетки цитолитические (CD3+CD16+CD56+CD45+) – 675 240 тг (на 50 тестов)
  - NK-клетки цитокинпродуцирующие (CD3+CD16+CD56+CD45+) – 675 240 тг (на 50 тестов)
  - NK-клетки, экспрессирующие альфа-цепь антигена CD8 (CD3+CD8+CD45+) – 675 240 тг (на 50 тестов)
  - активированные В-лимфоциты (CD3+CD25+CD45+) – 675 240 тг (на 50 тестов)
  - активированные Т-лимфоциты (CD3+HLA-DR+CD45+) и активированные цитотоксические лимфоциты (CD8+HLA-DR+CD45+) – 675 240 тг (на 50 тестов)
  - В-лимфоциты и активированные NK-клетки (CD3+HLA-DR+CD45+) – 675 240 тг (на 50 тестов)
  - активированные Т-лимфоциты, экспрессирующие альфа-цепь рецептора ИЛ-2 (CD3+CD25+CD45+) – 675 240 тг (на 50 тестов)
- Применение метода проточной цитометрии позволит вывести научные исследования КазНМУ на качественно новый уровень, соответствующий мировым стандартам в различных областях фундаментальной и прикладной медицинской науки. Предлагаем варианты для использования проточной цитометрии для выполнения научных исследований в следующих областях:

#### **Иммунология.**

- иммунофенотипирование (определение типа и функционального состояния) клеток крови;
- определение фагоцитарной активности иммунных клеток;
- идентификация внутриклеточных белков;
- определение степени пролиферативной активности клеток;
- исследование стадий клеточного цикла;
- оценка степени цитотоксичности клеток.

#### **Цитология.**

- определение цитоморфологических характеристик любой клетки (ее размеры, уровень асимметричности, соотношение между ядром и цитоплазмой);
- оценка активности ферментов, входящих в состав клетки;
- анализ стадии клеточного цикла;
- измерение физиологических внутриклеточных параметров (уровень pH, потенциал клеточной мембраны, концентрацию свободных ионов).

#### **Ревматология.**

- определение уровня экспрессии HLA-белков
- определение экспрессии рецепторов к цитокинам при проведении антицитокиновой терапии
- иммунологический мониторинг терапии аутоиммунных заболеваний

#### **Гематология.**

- анализ субпопуляционного состава клеток крови;
- подсчет количеств ретикулоцитов и тромбоцитов с помощью специфических маркеров;
- оценка последствий резидуальной болезни;
- диагностика острого лейкоза;
- обнаружение анеуплоидных клонов (аномальных клеток с нестандартным набором хромосом), выявление степени пролиферативной активности (тенденции к активному делению) анеуплоидных клонов;
- проведение дифференциальной диагностики реактивного лимфоцитоза и лимфолифферативных болезней;
- диагностика заболеваний лимфолифферативной этиологии.
- определение и подсчет низкого уровня иммуноглобулинов, связанных с эритроцитами и не определяемых прямым антиглобулиновым тестом у пациентов с гемолизом.
- определение эритроцитарного химеризма.
- фенотипирование эритроцитов после многочисленных трансфузий.
- оценка перекрестного взаимодействия с тромбоцитами.
- определение комбинации лейкоцитов в продуктах крови.

#### **Онкология.**

- количественный анализ внутриклеточных структур (ДНК и РНК);
- исследование основных параметров клеточного цикла;
- идентификация и подсчет клеток, относящихся к разным периодам клеточного цикла;
- обнаружение опухолевых маркеров;
- наблюдение за состоянием пациентов, находящихся в группе риска;
- оценка функционирования иммунной системы и функциональной состоятельности иммунных клеток (иммунологический мониторинг);
- количественная оценка субпопуляций лимфоцитов.

#### **Инфекционные болезни.**

- измерение фагоцитарной и бактерицидной активности нейтрофилов,
- мониторинг септического состояния пациентов,
- измерение количества клеток, находящихся на различных стадиях апоптоза
- определение пролиферативной активности клеток и др.

#### **Трансплантология.**

- Трансплантация стволовых клеток: соответствие числа CD34 у доноров или реципиентов.
- Определение аллоантител к HLA при трансплантации органов.

#### **Микробиология.**

- определение присутствия гетерогенных популяций с разной чувствительностью к антибиотикам.

#### **Фармакология.**

- оценка уровня экспрессии белковых маркеров чувствительности к лечению лекарственными препаратами;
- измерение активности ферментов, входящих в состав клеток;
- изучение действия биоактивных веществ на состояние клеток человеческого организма путём определения стадии клеточного цикла.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Menon, Vishal; Thomas, Ria; Ghale, Arun R.; Reinhard, Christina; Pruszek, Jan (2014-12-18). "Flow Cytometry Protocols for Surface and Intracellular Antigen Analyses of Neural Cell Types" // Journal of Visualized Experiments. – 2014. - №94. – P. 96-103.
- 2 Хайдуков С.В. Многоцветный анализ в проточной цитометрии для медико-биологических исследований: автореф. дисс. ... д-р. мед. наук – М., 2008. – 59 с.
- 3 Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине // Медицинская иммунология. – 2007. - №9(4). - С. 373-378.
- 4 Хайдуков С.В., Агафонова С.А., Литвинов И.С. Сравнительный анализ фенотипических характеристик наивных Т-клеток и Т-клеток памяти селезенки мышей линии СВА // Биологические мембраны. – 2005. - №22(6). - С. 482-491.
- 5 Vlasova E.V., Kovalenko E.I., Lukin S.V., Khaidukov S.V., Nifant'ev N.E., Piskarev V.E., Bovin N.V. Myeloid Blind Panel biochemical analysis: Specificity of anti-carbohydrate MA submitted to Myeloid cells section // Leucocyte Typing VI. White Cell Differentiation Antigens, Tadimitsu Kishimoto (Eds.), Garland Publishing, Inc. – London: 1997. - P. 1038-1040.