

## **ПРОТОЧНА ЦИТОМЕТРІЯ: ФІЗИЧНІ ОСНОВИ ТА ПРАКТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ У МЕДИЦИНІ І БІОЛОГІЇ**

**Буковинський державний медичний університет (м. Чернівці)**

Сучасною технологією швидкого вимірювання характеристик клітин, їхніх органел і процесів, які у них відбуваються, є проточна цитометрія. Вона є ефективним підходом до вирішення багатьох важливих завдань медицини, біології клітини та клітинної інженерії. Досягнення в області флуоресцентних барвників, розвиток лазерних і комп'ютерних технологій, створення ефективного програмного забезпечення призвели до широкого використання даної технології в медичній і біологічній практиці.

Проточна цитометрія – метод дослідження дисперсних середовищ в режимі поштучного аналізу елементів дисперсної фази за сигналами світлорозсіювання і флуоресценції. Основа методу полягає у: 1) використанні системи гідрофокусування, яка забезпечує проходження клітин у потоці поодиночі; 2) опроміненні клітини лазерним випромінюванням; 3) реєстрації сигналів світлорозсіювання і флуоресценції від кожної окремо взятої клітини в клітинній суспензії зі швидкістю до 3000 клітин в секунду [10].

Фізичні властивості клітин (розмір і цитоплазматична гранулярність) можуть бути вимірні на будь-якій окремій нефарбованій клітині. Клітини також можуть бути помічені специфічними барвниками, що зафарбовують ДНК, РНК або білок, або цілим набором флуорохром-кон'югованих антитіл, спрямованих до мембранних і внутрішньоклітинних компонентів клітин. В ході аналізу враховується як рівень флуоресценції хімічних сполук, що входять до складу клітини (аутофлуоресценція), так і внесених у зразок перед проведенням проточної цитометрії.

Суспензію попередньо забарвлених флуоресціюючими барвниками клітин під тиском проганяють через капіляр. Клітини, підхоплені потоком рідини, шикуються одна за одною, утворюючи «ланцюжок». Так реалізується принцип гідродинамічного фокусування, завдяки якому створюються умови ламінарного потоку без перемішування суспензії клітин з обтікаючою рідиною. Коли такий струмінь перетинає сфокусований лазерний промінь, то в точці перетину потоку і променя одночасно виявляється, як правило, тільки одна клітина, що дозволяє уникнути артефактів, пов'язаних з різною віддаленістю клітин від точки перетину лазерного променя з потоком.

У вимірювальній камері приладу молекули деяких клітинних структур, перетинаючи промінь монохромного лазера, поглинають світло певної довжини хвилі і переходять в збуджений стан. Повертаючись через короткий час в початковий стан, клітини випромінюють кванти світла з іншими довжинами хвиль. Це вторинне випромінювання, що має строго визначені для кожного виду клітин або їх структур довжини хвиль, проходячи через оптичну систему приладу реєструється фотоелектронним помножувачем, який перетворює його в електричні сигнали, зручні для комп'ютерної обробки та зберігання інформації.

У момент перетину клітиною лазерного променя детектори фіксують: 1) розсіювання світла під малими кутами (від 1° до 10°), отримана характеристика використовується для визначення розмірів клітин; 2) розсіювання світла під кутом 90°, що дозволяє робити висновки про співвідношення ядро / цитоплазма, а також про неоднорідність і гранулярність клітин; 3) інтенсивність флуоресценції по декількох каналах флуоресценції (від 2 до 18-20) – дозволяє визначити субпопуляційний склад клітинної суспензії та ін.; 4) поляризацію флуоресценції і час прольоту частки, що дозволяє оцінити ступінь в'язкості клітинних мембран, яка змінюється в залежності від їх функціонального стану, а також ступінь асиметричності клітин чи досліджуваних органел.

Два або три флуоресцентних сигнали, кожен з яких свідчить про реакцію одного маркера зі специфічним розпізнаваним антигеном, можуть бути зафіксовані разом з сигналами переднього (FSC-forward scatter) і бічного розсіювання (SSC-side scatter) світла. Сигнали розсіювання світла, що характеризують розмір клітини (FSC), а також цитоплазматичні і мембранні особливості (SSC), пов'язують результати флуоресцентного аналізу з морфологічно певними популяціями.

Мультипараметричний аналіз проточної цитометрії дозволяє зменшити необхідний обсяг біологічного матеріалу (до 100 мкл), час пробопідготовки і фактичного аналізу (секунди) за рахунок високої швидкості. Перевагою методу також є можливість аналізу великої кількості клітин (до 108 клітин); вимірюються параметри рідкісних клітин; відбувається

об'єктивне вимірювання інтенсивності флуоресценції. Можливості аналізу результатів збільшує використання статистичних і математичних моделей.

Методом проточної цитометрії досліджуються такі зразки: кров; кістковий мозок; ліквор; суглобова, плевральна та асцитична рідини; суспензійовані клітини тканин.

Розглянемо основні області застосування методу в медичній і біологічній практиці.

Основним завданням проточної цитометрії в імунології є імунофенотипування нормальних і патологічних імунокомпетентних клітин, визначення фагоцитарної активності, внутрішньоклітинних цитокінів, внутрішньоклітинних білків, проліферативної активності, дослідження клітинного циклу, оцінка клітинної цитотоксичності. Найбільша кількість досліджень за останнє десятиріччя стосувалася системи вродженого імунітету. Використання моноклональних антитіл, кон'югованих з різними флуорохромами, призвело до розвитку багатопараметричного аналізу і значно спростило роботу фахівців в діагностиці різних порушень імунної системи [5, 8].

Проточна цитометрія в онкології – це кількісний аналіз внутрішньоклітинних компонентів (ДНК); аналіз стадій клітинного циклу; виявлення анеуплоїдного клону та визначення його проліферативної активності; визначення специфічних маркерів; моніторинг пацієнтів, що входять до групи ризику; оцінка стану імунної системи, що полягає у оцінці клітинної ланки імунітету та оцінці функціональної спроможності імунокомпетентних клітин [6, 12].

У сучасних нанонейротехнологіях є надзвичайно перспективним використання магнітних наночастинок для транспортування біологічно активних речовин і ліків до клітин-мішеней у разі зовнішнього маніпулювання та в протипухлинній терапії. Методами проточної цитометрії та фотонної кореляційної спектроскопії досліджується зв'язування наночастинок з нервовими терміналами та тромбоцитами. Розмір частинок у препаратах визначали за прямим (FS), а цитоплазматичну гранулярність – за бічним (SS) світлорозсіюванням [2].

В цитології метод використовується для визначення цитоморфологічної приналежності клітини; оцінки активності внутрішньоклітинних ферментів; визначення експресії поверхневих антигенів; для аналізу стадій клітинного циклу; виміру фізіологічних параметрів клітини – внутрішньоклітинного рН, концентрації вільних іонів  $Ca^{2+}$ , потенціалу зовнішньої клітинної мембрани [4]. Проточна цитометрія використовується для вивчення трансмембранного обміну іонів кальцію в мітохондріях, наприклад для виявлення змін мітохондріального потенціалу та рівня активних форм кисню тощо. Також метод використовується для вивчення обміну іонів  $Ca^{2+}$  в ізольованих мітохондріях [1].

Гематологія використовує даний метод для аналізу субпопуляційного складу клітин периферичної крові; підрахунку ретикулоцитів, аналізу тромбоцитів за специфічними маркерами; диференційної діагностики лімфопроліферативних захворювань і

реактивних лімфоцитозів; діагностики гострих лейкозів; оцінки мінімальної резидуальної хвороби.

Метод проточної цитометрії в фармакології створює можливості для виміру експресії маркерів, активності внутрішньоклітинних ферментів; визначення стадій клітинного циклу в рамках вивчення механізмів впливу різних біологічно активних речовин на клітинному рівні.

Проточна цитометрія широко застосовується для виявлення в досліджуваних зразках бактеріальних, грибкових і власних клітин організму людини (в кількості 10-100 штук в 1 мл крові); для визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів. Піддані впливу антибіотиків мікроорганізми (in vivo або in vitro) порівнюють з контрольними зразками того ж штаму для встановлення їх життєздатності, а також змін в нуклеїнових кислотах, білках, оболонці клітин і ін., що дозволяє оцінити ступінь ефекту антибіотика і точку прикладання його дії.

Високу чутливість методу забезпечує використання моноклональних антитіл, помічених флуоресцюючою речовиною.

Метод дозволяє проводити моніторинг стану вірусного процесу у ВІЛ-інфікованих пацієнтів і може використовуватися для контролю ефективності проведеної терапії [9].

Проточна цитометрія також може бути використана в області білкової інженерії для ідентифікації варіантів клітинної поверхні білкової молекули.

Проточна цитометрія може бути використана для вимірювання оксидативного стресу в соматичних клітинах у робітників, експонованих до зварювального пилу, та для інших виробничих середовищ. Рахування індексу оксидативного стресу є корисним для передбачення наслідків захворювань та для визначення ефективності профілактичних заходів [11].

У біології, зокрема в рослинництві (сільському господарстві), метод використовують для визначення плоідності клітин, аналізу стадій клітинного циклу, аналізу і сортування протопластів. У морській біології можуть бути проаналізовані об'єми і розподіл фотосинтезу планктону [3].

Важливим є контроль екологічного стану природних екосистем, зокрема полідисперсних водних середовищ, які є складовою частиною значної кількості об'єктів природного походження. Полідисперсні водні середовища – складні полідисперсні системи, що включають у себе частинки різних типів, розмірів і форми, які знаходяться у závisлому стані в колоїдних розчинах та перебувають у складній взаємодії. Ці частинки переважно є біологічними клітинами та їх агломератами. Скануюча проточна цитометрія дозволяє визначати розмір і показник заломлення окремих часток і тим самим сприяє їх ідентифікації [7].

Поява нових напрямків у проточній цитометрії, напр., проточної цитоензимології, відкриває широкі перспективи для подальшої ідентифікації пошкоджених або змінених клітин і дозволяє приймати адекватні рішення щодо ефективного лікування виявлених патологічних змін.

### Література

1. Використання методу протокової цитометрії для визначення вмісту  $Ca^{2+}$  в мітохондріях та впливу на нього антагоністів кальмодуліну / Л. Г. Бабіч, С. Г. Шликов, Н. В. Наумова [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 4. – С. 51-58.
2. Взаємодія наночастинок магнетиту, покритих полімерами, з нервовими терміналями головного мозку та тромбоцитами крові / Т. О. Борисова, Н. О. Дудченко, О. Б. Брик [та ін.] // Біотехнологія. – 2011. – Т. 4, № 5. – С. 45-56.
3. Єльнікова Т. О. Автоматизована система для вимірювання геометричних параметрів фітопланктону / Т. О. Єльнікова // Вісник ЖДТУ. Технічні науки. – 2009. – № 1 (48). – С. 160–164.
4. Залесский В. Н. Молекулярная диагностика: лазерная сканирующая и проточная цитометрия в исследовании апоптоза / В. Н. Залесский // Український медичний часопис. Актуальні питання медичної практики. – 2010. – № 4 (78). – С. 27-31.
5. Іваненко М. О. Лазерна проточна цитометрія в оцінці фагоцитарного процесу / М. О. Іваненко, І. С. Громакова // Укр. радіол. журнал. – 2011. – Т. 19, № 3. – С. 364.
6. Лисенко С. А. Проточна ДНК-цитометрія в оцінці перенеопластичного ревматологічного синдрому у хворих на рак легені / С. А. Лисенко // Укр. науково-медичний молодіжний журнал. – 2013. – № 4. – С. 32-36.
7. Метод та прилад контролю стану полідисперсних водних середовищ за спектрополяриметричними зображеннями частинок / В. Г. Петрук, С. М. Кватернюк, О. Є. Кватернюк [та ін.] // Вісник ЖДТУ, Технічні науки. – 2010. – № 31 (52). – С. 119-125.
8. Хайдуков С. В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине / С. В. Хайдуков, А. В. Зурочка // Медицинская иммунология. – 2007. – Т. 9, № 4-5. – С. 373-378.
9. Davey H. M. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses / H. M. Davey, D. B. Kell // Microbiological Reviews. – 1996. – Vol. 60, № 4. – P. 641–696.
10. Shapiro H. M. Practical Flow Cytometry, second edition / H. M. Shapiro. -New York : Alan R. Liss, Inc, 1988. – 353 p.
11. Du Plessis L. Flow cytometric analysis of the oxidative status in human peripheral blood mononuclear cells of workers exposed to welding fumes / Du L. Plessis, P. Laubscher, J. Jooste [et al.] // J. Occup. Environ. Hyg. – 2010. – Vol. 7, № 6. – P. 367–374.
12. Zackrisson B. Cell kinetic changes in human squamous cell carcinomas during radiotherapy studied using the in vivo administration of two halogenated pyrimidines / B. Zackrisson, P. Flygare, H. Gustafsson [et al.] // Eur. J. Cancer. – 2002. – Vol. 38 (8). P. 1100-1106.

УДК 535.36/.37:57.085.2:61

#### ПРОТОЧНА ЦИТОМЕТРІЯ: ФІЗИЧНІ ОСНОВИ ТА ВИКОРИСТАННЯ В МЕДИЦИНІ І БІОЛОГІЇ

Микитюк О. Ю.

**Резюме.** У даній статті розглянуто фізичні принципи методу проточної цитометрії та показано можливості даного методу для медичної і біологічної науки. Метод є ефективним при вирішенні важливих завдань медицини, біології клітини та клітинної інженерії. Дано перелік зразків, що досліджуються методом проточної цитометрії у медицині. Показано переваги даного методу. Розглянуто основні області застосування методу у медико-біологічній практиці.

**Ключові слова:** проточна цитометрія, медицина, біологія.

УДК 535.36/.37:57.085.2:61

#### ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ: ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ

Микитюк О. Ю.

**Резюме.** В данной статье рассмотрены физические принципы метода проточной цитометрии и показаны возможности данного метода для медицинской и биологической науки. Метод эффективен при решении важных задач медицины, биологии клетки и клеточной инженерии. Дан перечень образцов исследуемых методом проточной цитометрии в медицине. Показаны преимущества данного метода. Рассмотрены основные области применения метода в медико-биологической практике.

**Ключевые слова:** проточная цитометрия, медицина, биология.

UDC 535.36/.37:57.085.2:61

#### Flow Cytometry: Physical Fundamentals and Practical Applications in Medicine and Biology

Mykytiuk O. Yu.

**Abstract.** This article describes the physical principles of flow cytometry and the potential of this method for medical and biological sciences. Flow cytometry is a modern technology quickly measuring the characteristics of cells and their organelles and processing all events occur in them. The method is effective in solving important problems of medicine, cell biology and cell engineering.

Flow cytometry – method of research of biological cells in the single stream subjected to laser radiation which records scattered light and fluorescence signals from each individual cell at a rate of up to 3000 cells per second.

Secondary radiation having well-defined for each type of the cells or structures wavelengths passes through the optical system of the device and is recorded by a photomultiplier tube which converts it into electrical signals suitable for computer processing and storing information.

## МЕТОДИ І МЕТОДИКИ

---

---

The analysis of light scattered at low angles ( $1^\circ$  to  $10^\circ$ ) is used to determine the size of the cells; registration of the scattered light at an angle of  $90^\circ$  gives an indication of the correspondence between the nucleus/ cytoplasm, as well as the heterogeneity and granulation of cells. Subpopulations of cell suspensions are determined on a fluorescence intensity of 2 fluorescence channels 18-20.

Light scattering signals characterizing the size of the cells, as well as the cytoplasmic and membrane characteristics associated with fluorescence analysis results in morphologically defined population.

Multiparametrical flow cytometry analysis allows to reduce the required volume of biological material to a 100  $\mu$ l, time of sample preparation and analysis. Actual analysis of large number of cells (up to 108 cells) is performed simultaneously. An objective measurement of the fluorescence intensity is carried out.

Blood; bone marrow; liquor; articular, pleural and ascitic fluids. suspended cells and tissues can be investigated by flow cytometry.

Immunology, oncology, cytology, hematology are main fields of the method application. The method is also used in pharmacology.

Flow cytometry is used to detect bacterial, fungal, and own human cells in the samples, in determination of microorganisms sensitivity to antibiotics, as well as allows you to monitor the status of the viral process in HIV-infected patients.

The method used to determine the ploidy of cells, cell cycle analysis stages, analysis and sorting of protoplasts in biology, particularly in agriculture and plant breeding. It is possible to analyze a volume and distribution of plankton photosynthesis in marine biology. Flow cytometry is used to monitor the ecological state of natural ecosystems by determining the size and refractive index of the individual particles in aqueous media and thus contributes to their identification.

The emergence of new trends in flow cytometry, for example flow cytoenzymology, opens up broad prospects for further identification of damaged or altered cells.

**Keywords:** flow cytometry, medicine, biology.

*Рецензент – проф. Ілащук Т. О.  
Стаття надійшла 06. 02. 2015 р.*