

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ

ЛЕКЦИЯ 3

FLOW
CYTOMETRY



Проточная цитометрия – исследовательская технология, позволяющая на основе измерений оптических параметров, охарактеризовать **физические и биохимические свойства клеток**. В ходе анализа одновременно производят фотометрию и флуориметрию отдельных клеток, которые в составе ламинарного потока жидкости поочерёдно пересекают монохроматический световой поток, создаваемый лазером.

Гелий-неоновый лазер, $\lambda = 633 \text{ nm}$ (красный)

Аргонный лазер, $\lambda = 488 \text{ nm}$

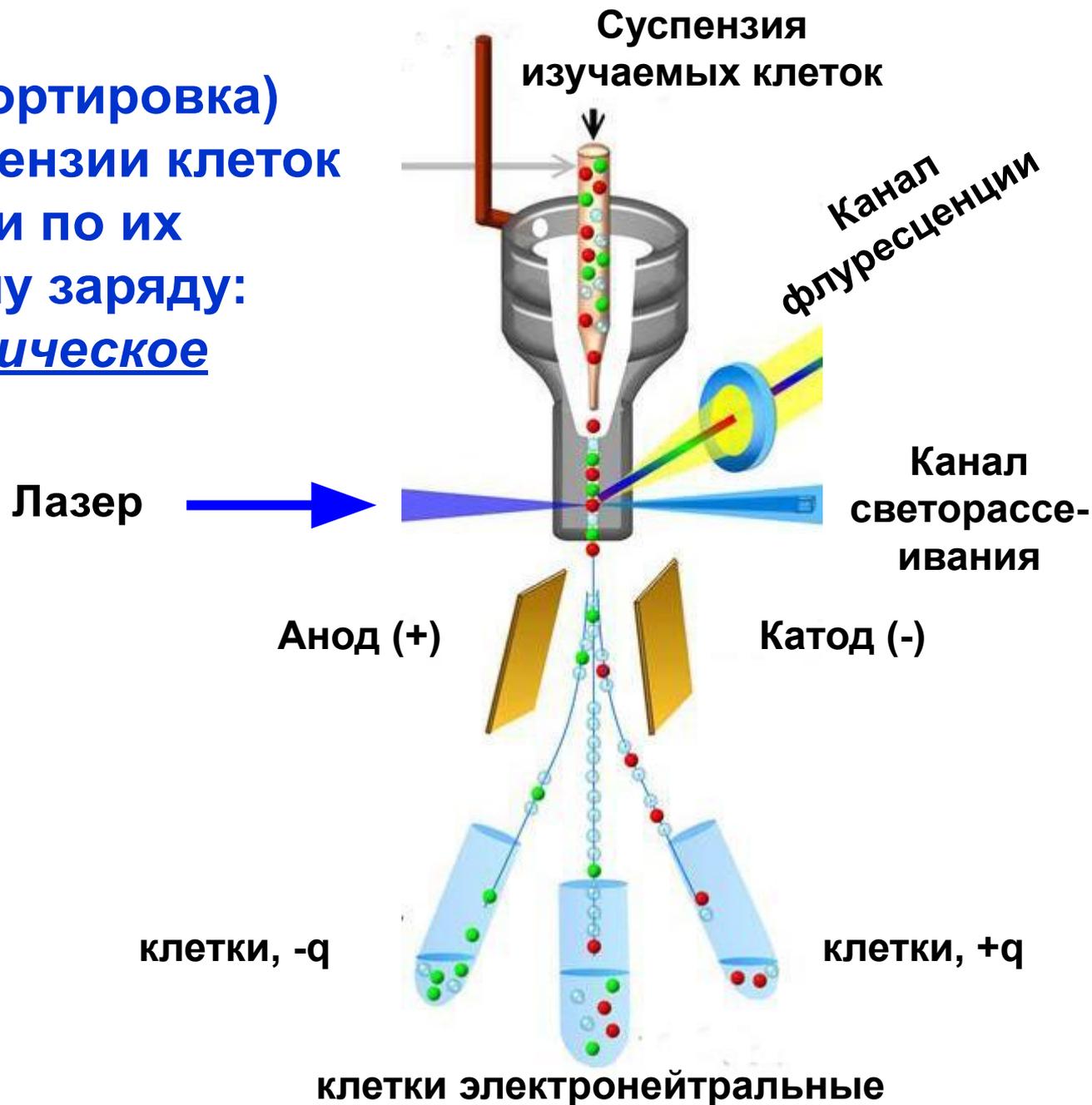
Гелий-кадмиевый лазер, λ около 400 nm (УФ)

Принцип проточной цитометрии (подсчет клеток крови) был запатентован в **1953** году в США **Уоллесом Коултером** (Wallace H. Coulter).

Первая лабораторная установка для регистрации флуоресценции потока клеток из первичной суспензии создана в **1968** году **Вольфгангом Гёде** (Wolfgang Göhde) в Университете Мюнстера (Германии).

На три года раньше, в **1965** году **Марк Фульвейлер** (Mark Fulwyler) разработал устройство, позволяющее разделять суспензию клеток по их электрическому заряду. Этот методический подход широко используется и сегодня.

Разделение (сортировка)
исходной суспензии клеток
на три фракции по их
электрическому заряду:
электростатическое
отклонение



В **1969** году был выпущен **первый серийный проточный цитометр** в форме приставки к флуоресцентному микроскопу фирмы «Zeiss».

С **1970** года в цитометре стали использовать гелий-неоновый лазер с излучением, $\lambda = 633$ нм. («Cytograph»). Этот прибор позволял быстро разделить изучаемую суспензию клеток на живые и погибшие клетки по включению в погибшие клетки красителя трипанового синего. Позже прибор был усовершенствован благодаря использованию аргонового лазера, $\lambda = 488$ нм. («Cytofluorograph»).

Термин «**проточная цитометрия**» («**flow cytometry**») был предложен на международной конференции «**The Conference of the American Engineering Foundation in Pensacola, Florida**» в **1976** году.

С тех пор этот термин утвердился во всем мире.

Иногда можно встретить термин **проточная цитофлуориметрия**.

Этот термин не корректный, поскольку одновременно измеряется не только флуоресценция, но и интенсивность рассеянного светового потока.

Проточная цитометрия позволяет охарактеризовать физические и биохимические свойства суспензии клеток в диапазоне их размеров от 0,2 до 150 μm .

Преимущества метода проточной цитометрии:

- 1. Короткое время анализа (за счет высокой скорости движения клеток по капилляру, до 1000 клеток/с);**
- 2. Анализ большого количества клеток (до 10^8 клеток);**
- 3. Высокая точность измерения интенсивности флуоресценции и светорассеивания.**

Образцами являются: костный мозг, ликвор, суставная, плевральная или асцитическая жидкости, а также суспендированные клетки крови и различных тканей.

В ходе анализа возможно определять 5-10 различных параметров клетки: размер, содержание ДНК, белков (цитокинов, транскрипционных факторов) и липидов, антигенные свойства и активность ферментов, а также возможны исследование клеточного цикла, мониторинг состояния вирусного процесса, количественный анализ внутриклеточных компонентов и количественные измерения путем дифференцировки интенсивности рассеяния / флуоресценции при различных длинах волн.

Проточная цитометрия в её современных вариантах - **мультипараметрический анализ.**

Это позволяет минимизировать необходимый объем биологического материала (до **100 мкл), снизить время пробоподготовки и фактического анализа, сокращая тем самым, путь от получения образца до **клинической интерпретации результата – ответа лаборатории клинике.****

Луч лазера одновременно:

- 1. Рассеивается клетками:** *малоугловое (прямое) светорассеивание* (угол ок. 10° , если \varnothing клетки $\approx \lambda$) и *боковое светорассеяние* (угол ок. 90° , если \varnothing клетки $< \lambda$). **Интенсивность светорассеяния измеряют с помощью фотометрического оптического канала.**
- 2. Возбуждает флуоресценцию:** *собственная (аутофлуоресценция) и после предварительной обработки клеток одним или несколькими флуоресцентными красителями, либо МКА, конъюгированными с молекулой флуорохрома.* **Интенсивность флуоресценции измеряют с помощью флуоресцентного оптического канала.**

Два световых потока, образующихся при пересечении клеткой лазерного луча

Флуоресценция может быть, как собственная (аутофлуоресценция), так и за счёт обработки клеток различными специальными флуоресцентными красителями.

side scatter

Клетка, пересекающая лазерный луч

лазер

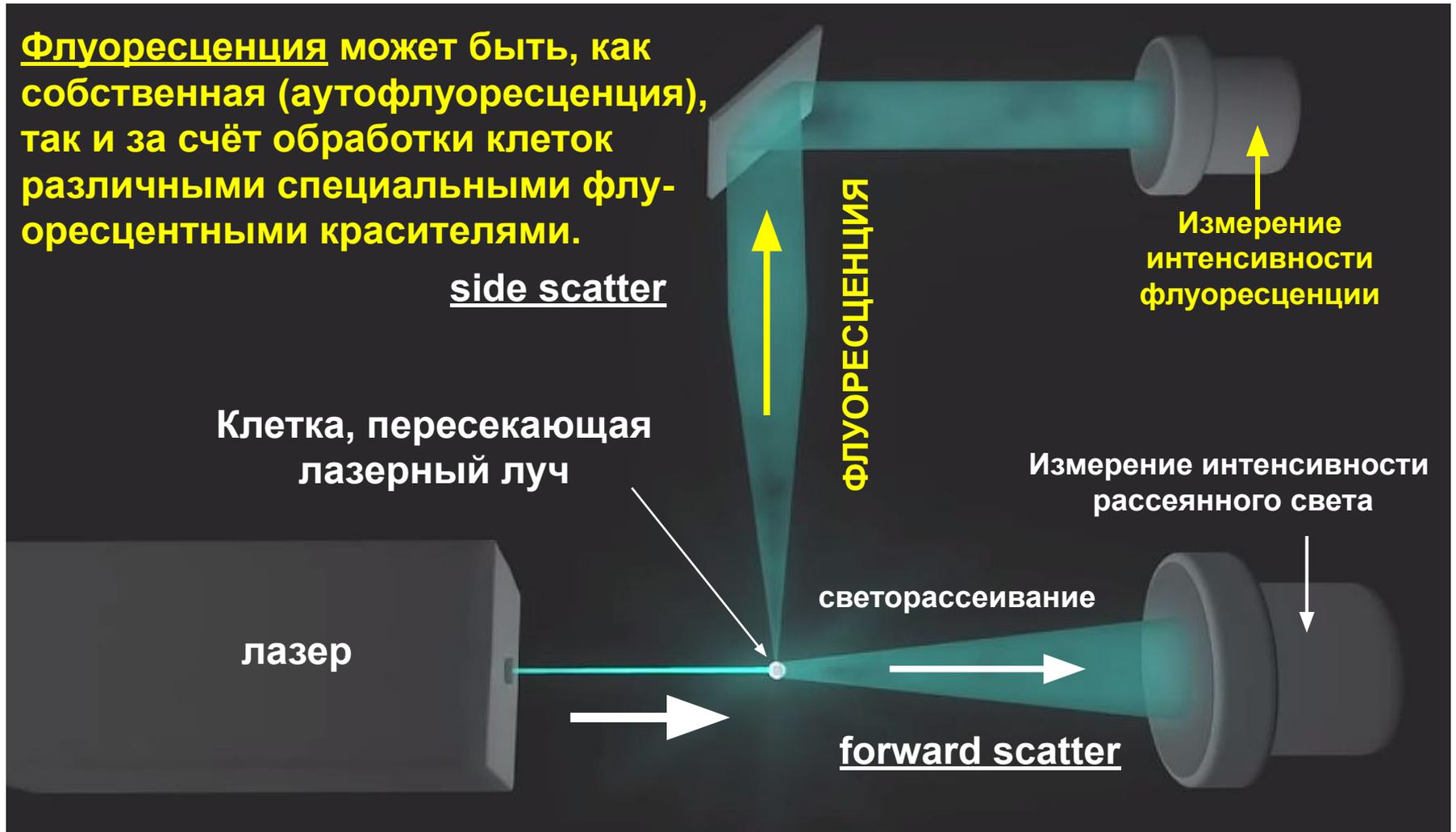
ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ

Измерение интенсивности флуоресценции

Измерение интенсивности рассеянного света

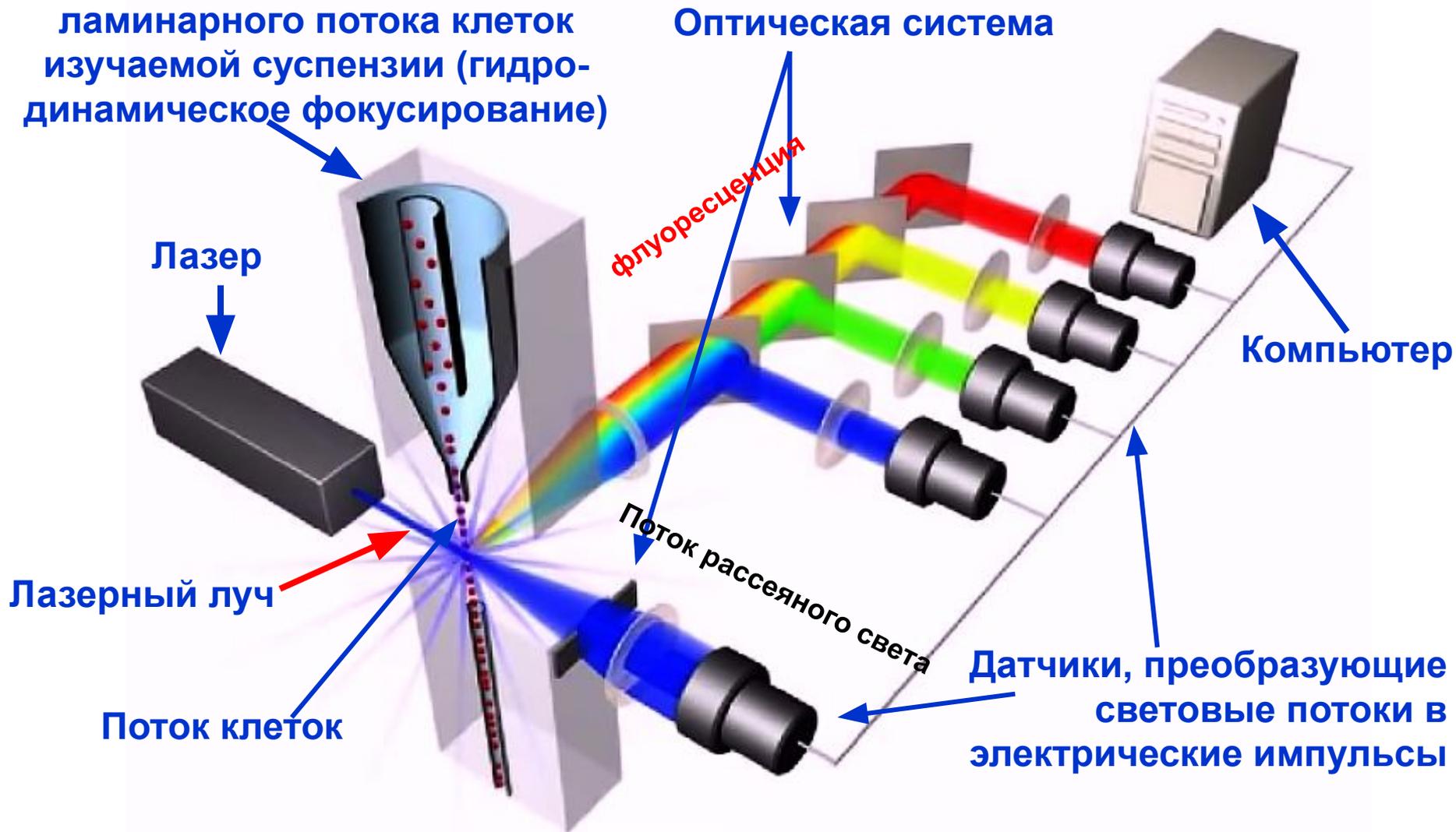
светорассеивание

forward scatter



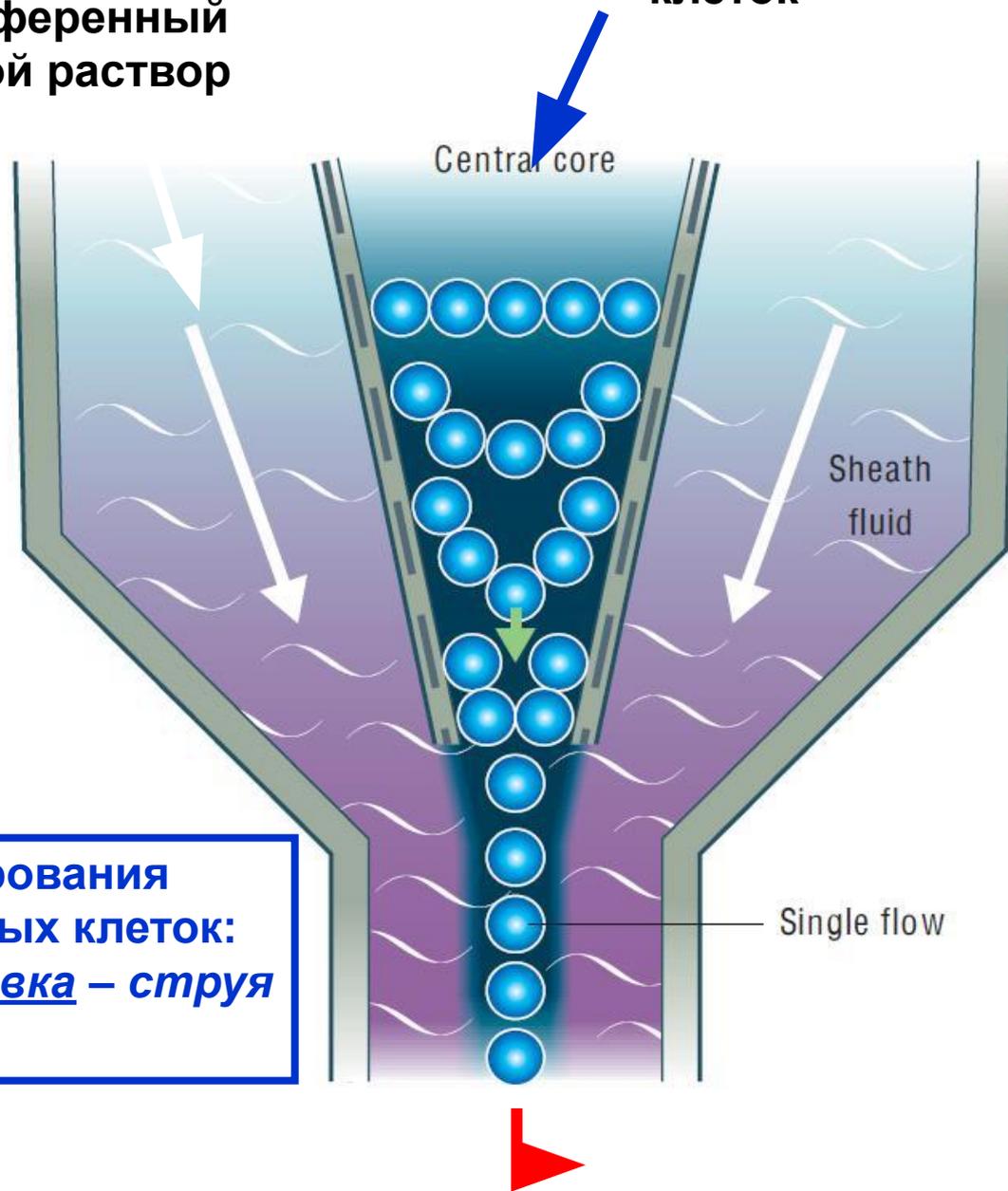
Принципиальное устройство проточного цитометра (flow cytometer)

Устройство для создания ламинарного потока клеток изучаемой суспензии (гидродинамическое фокусирование)



Изотоничный
и забуференный
солевой раствор

Суспензия изучаемых
клеток



1. Устройство для формирования
ламинарного потока изучаемых клеток:
гидродинамическая фокусировка – струя
в струе

Изотоничный
и забуференный
солевой раствор

Суспензия изучаемых клеток

1. Устройство для формирования
ламинарного потока изучаемых клеток:
гидродинамическая фокусировка – струя
в струе

Кварцевая
проточная
кювета
(в форме
капилляра):
скорость по-
тока 30 м/с

Датчик для измерения
интенсивности
флуоресценции

ФЭУ

светорассеивание

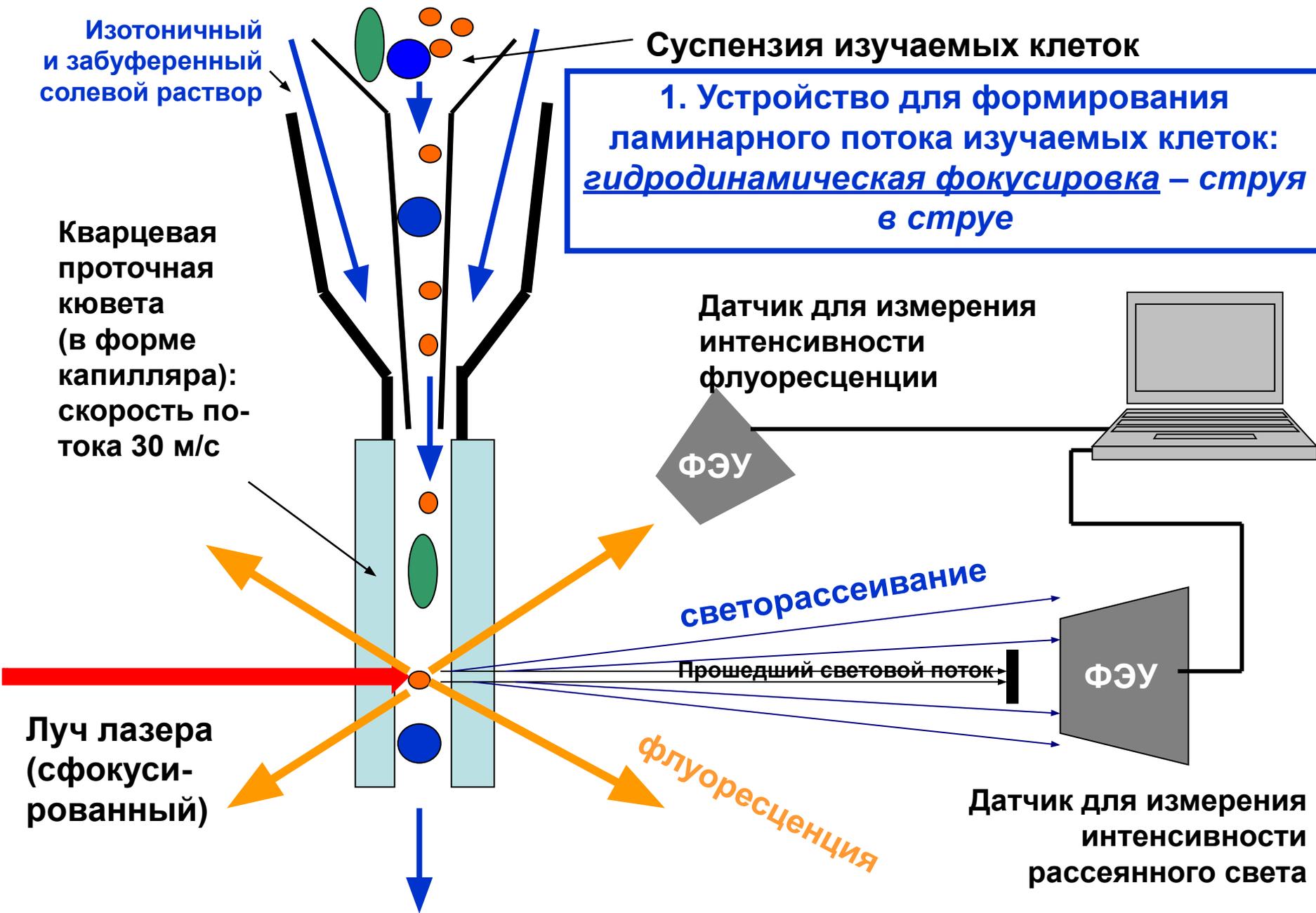
Прошедший световой поток

ФЭУ

Луч лазера
(сфокуси-
рованный)

флуоресценция

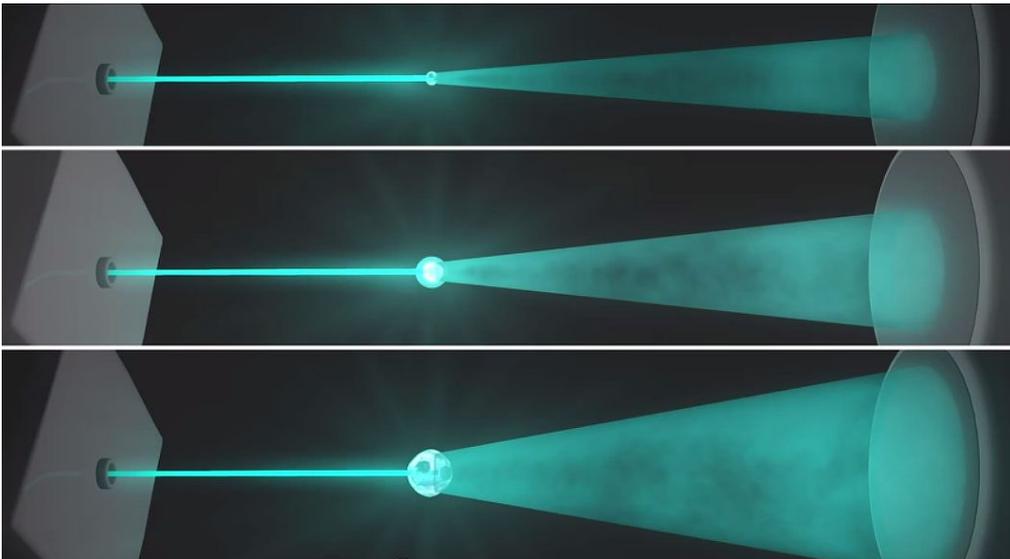
Датчик для измерения
интенсивности
рассеянного света



2. Оптическая система для регистрации интенсивности рассеянного светового потока

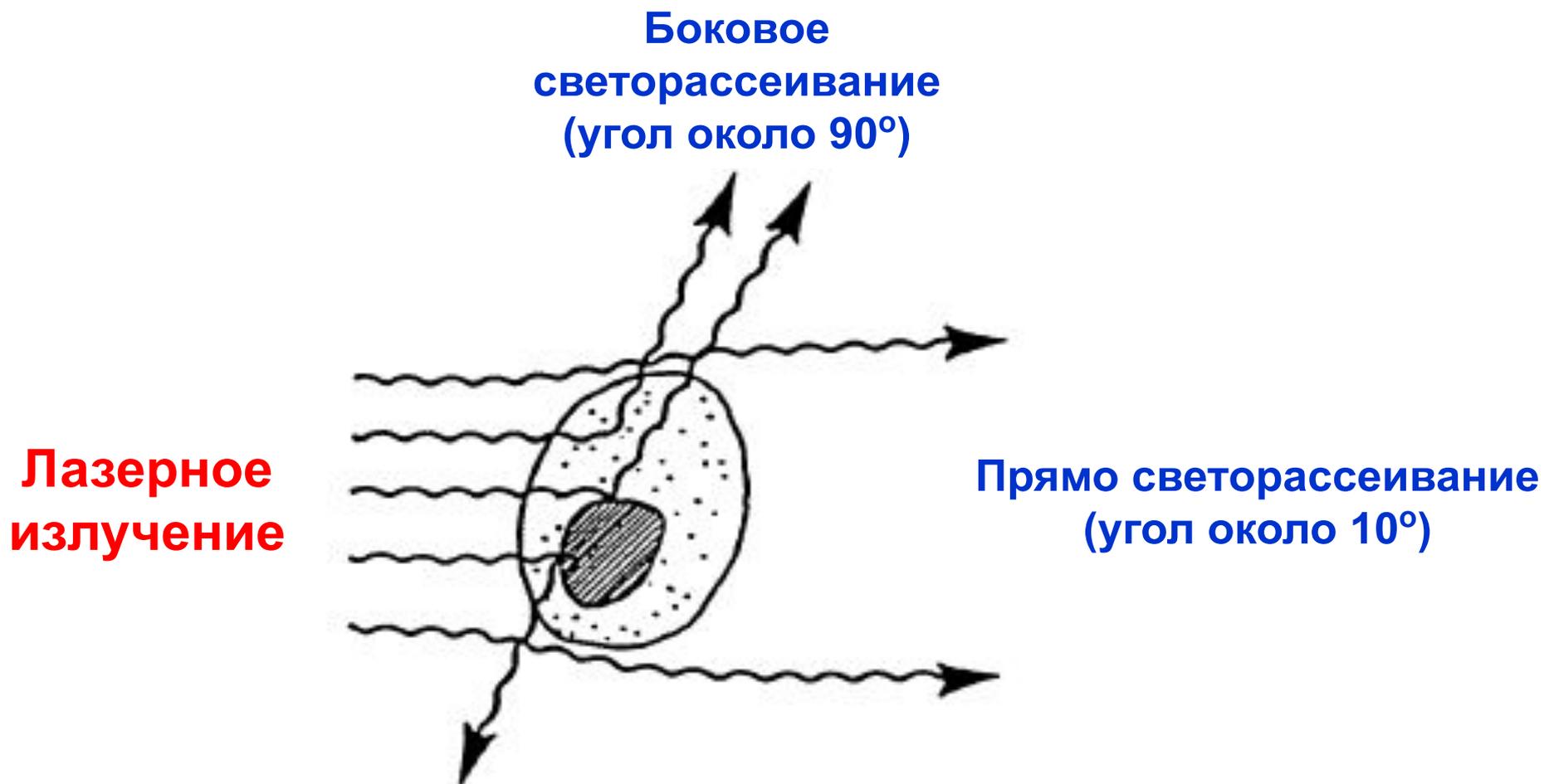
Измерение интенсивности рассеянного клетками светового потока от лазера позволяет:

- а). сосчитать клетки;
- б). определить их размер (по прямому / малоугловому светорассеиванию);

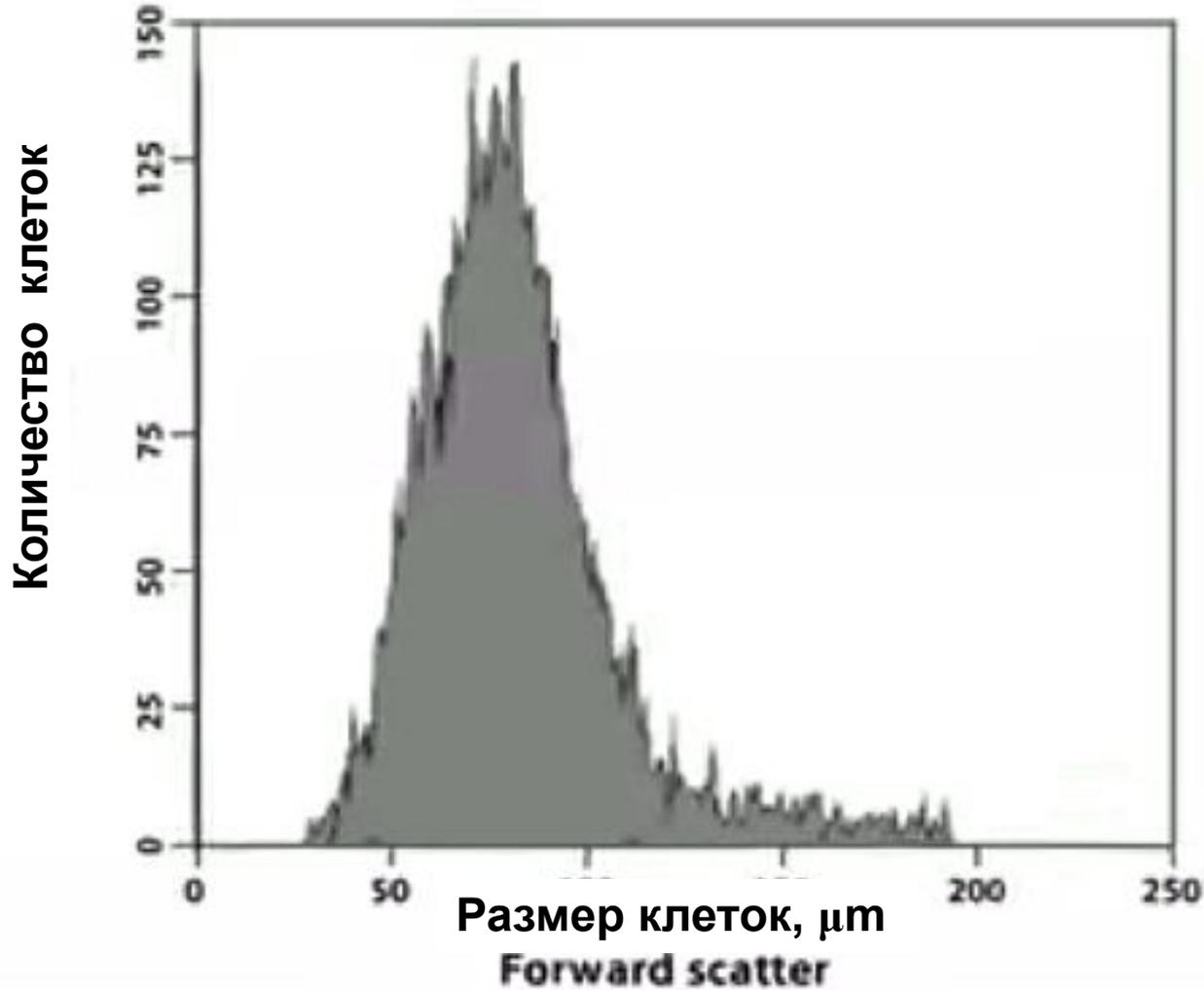


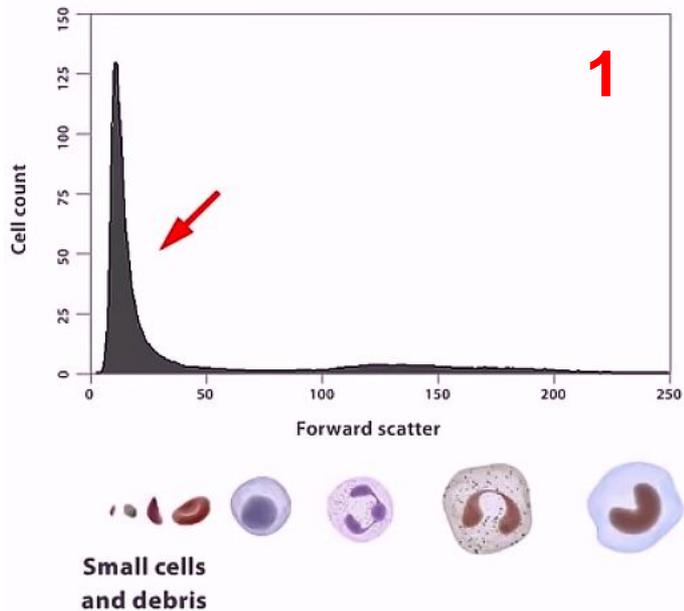
Чем больше размер клетки (диаметр), тем сильнее будет светорассеивание.

Прямое и боковое светорассеивание лазерного луча клеткой

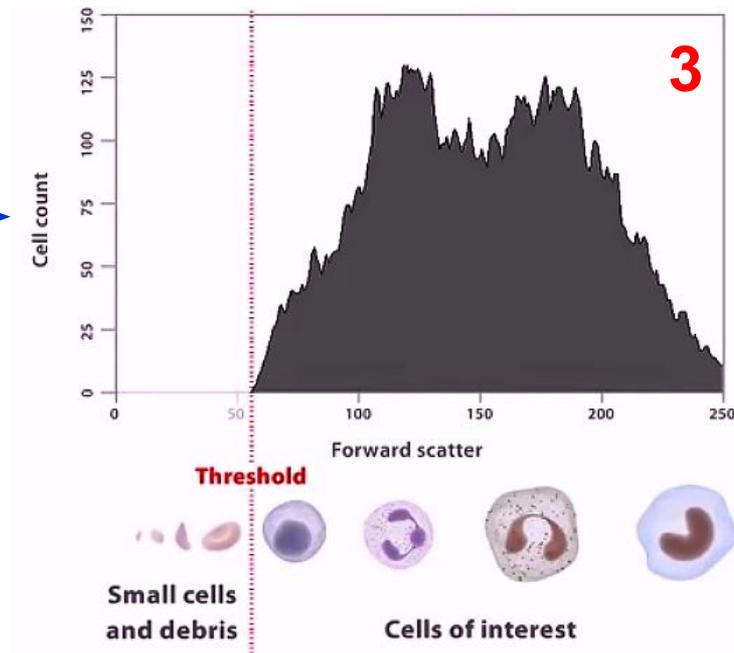
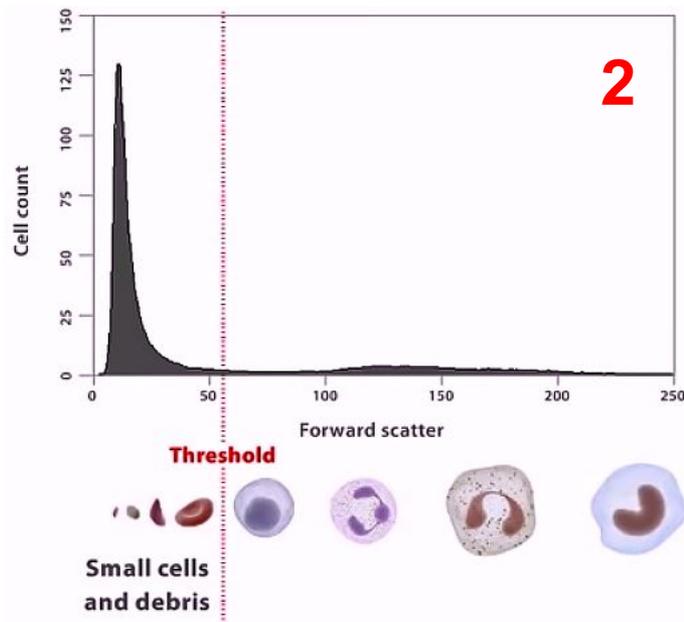


Представление распределения клеток изучаемой суспензии по их размерам (гистограмма распределения)

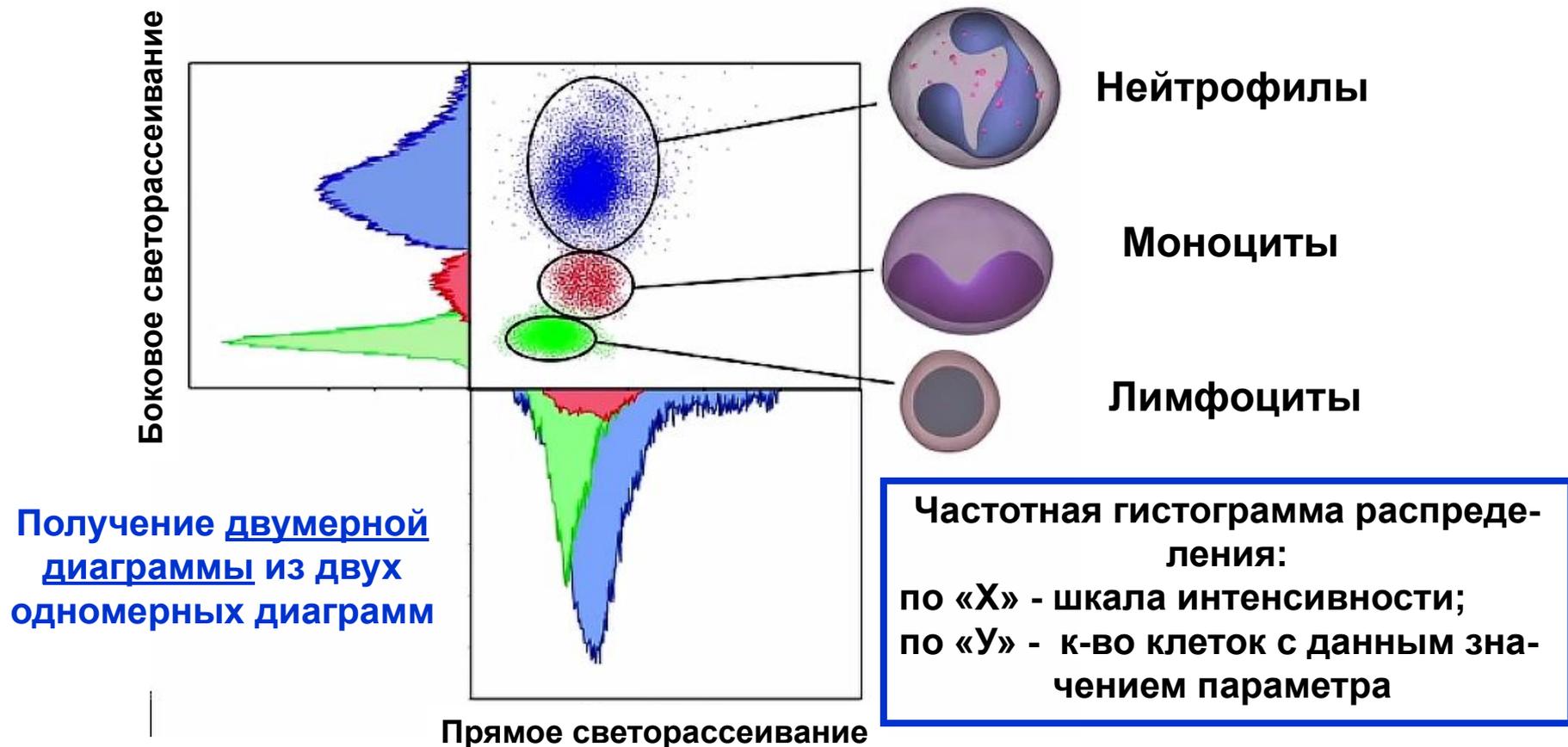




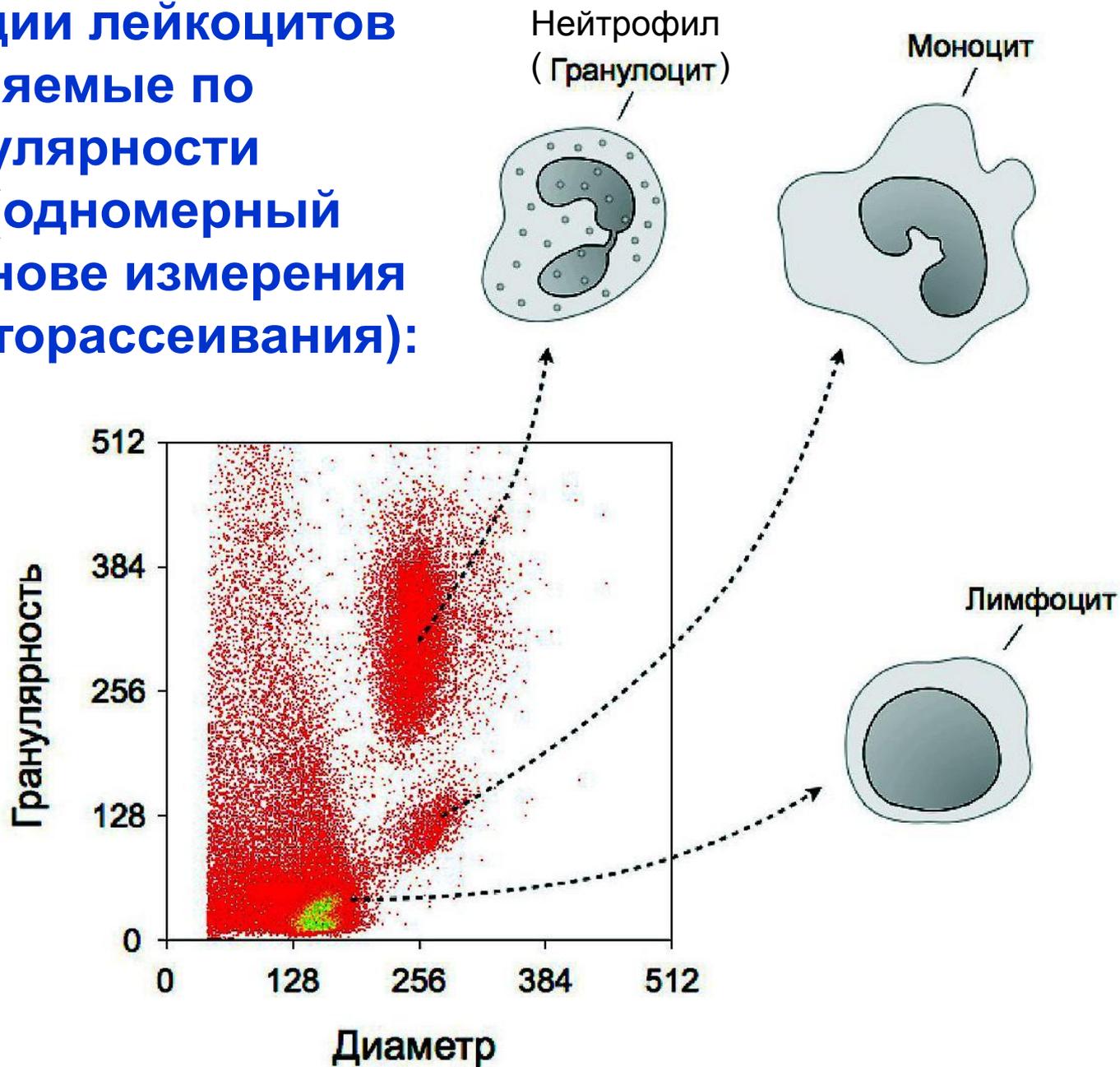
Повышение чувствительности цитометрического анализа суспензии клеток крови, обозначением порога чувствительности



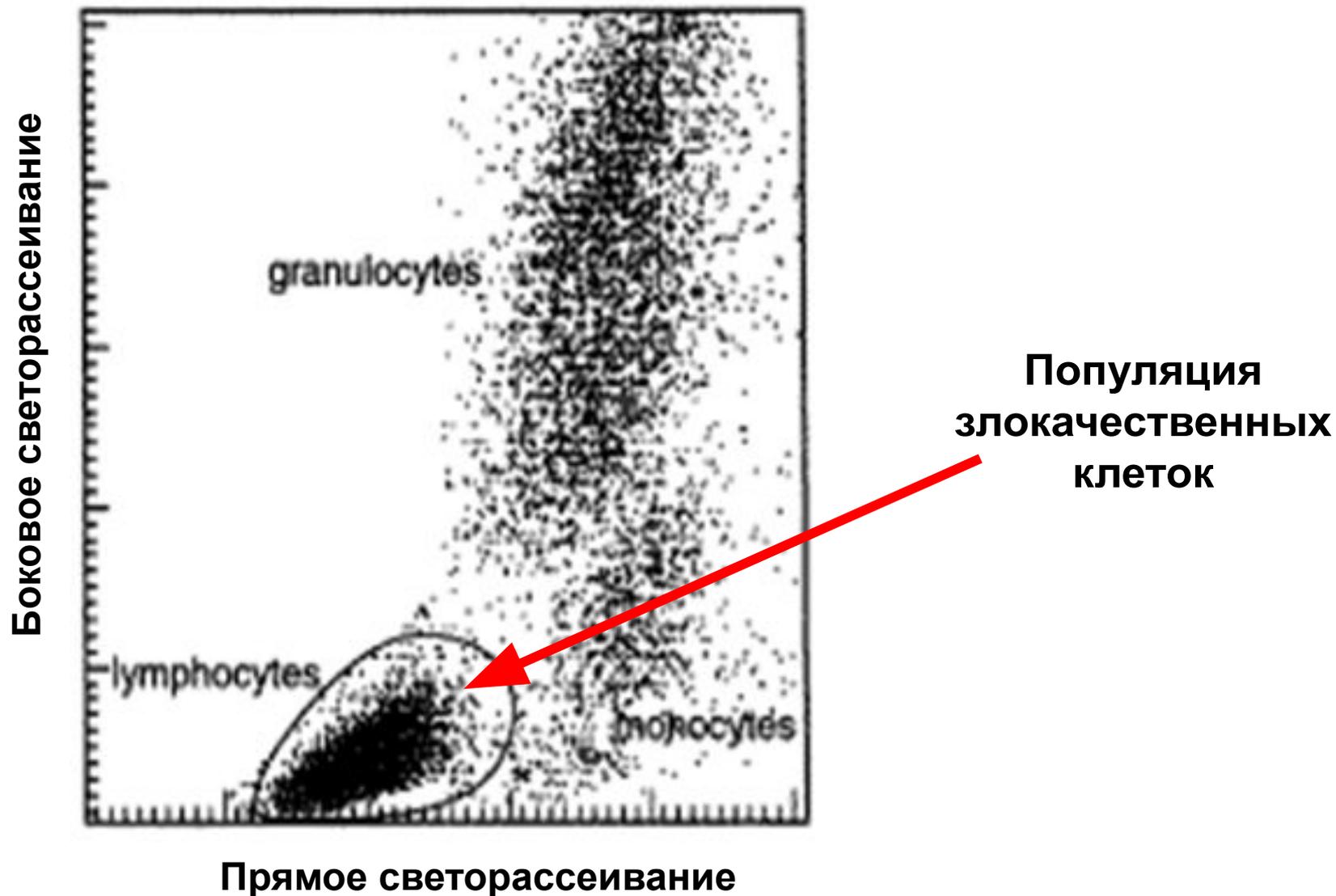
в). одновременное измерение прямого и бокового светорассеяния, без окраски клеток флуоресцентными красителями, позволяет выделить все клеточные субпопуляции лейкоцитов (в основном, по степени гранулярности их цитоплазмы): лимфоциты, моноциты и нейтрофилы.



Субпопуляции лейкоцитов крови, выявляемые по степени гранулярности цитоплазмы (одномерный график на основе измерения бокового светорассеивания):



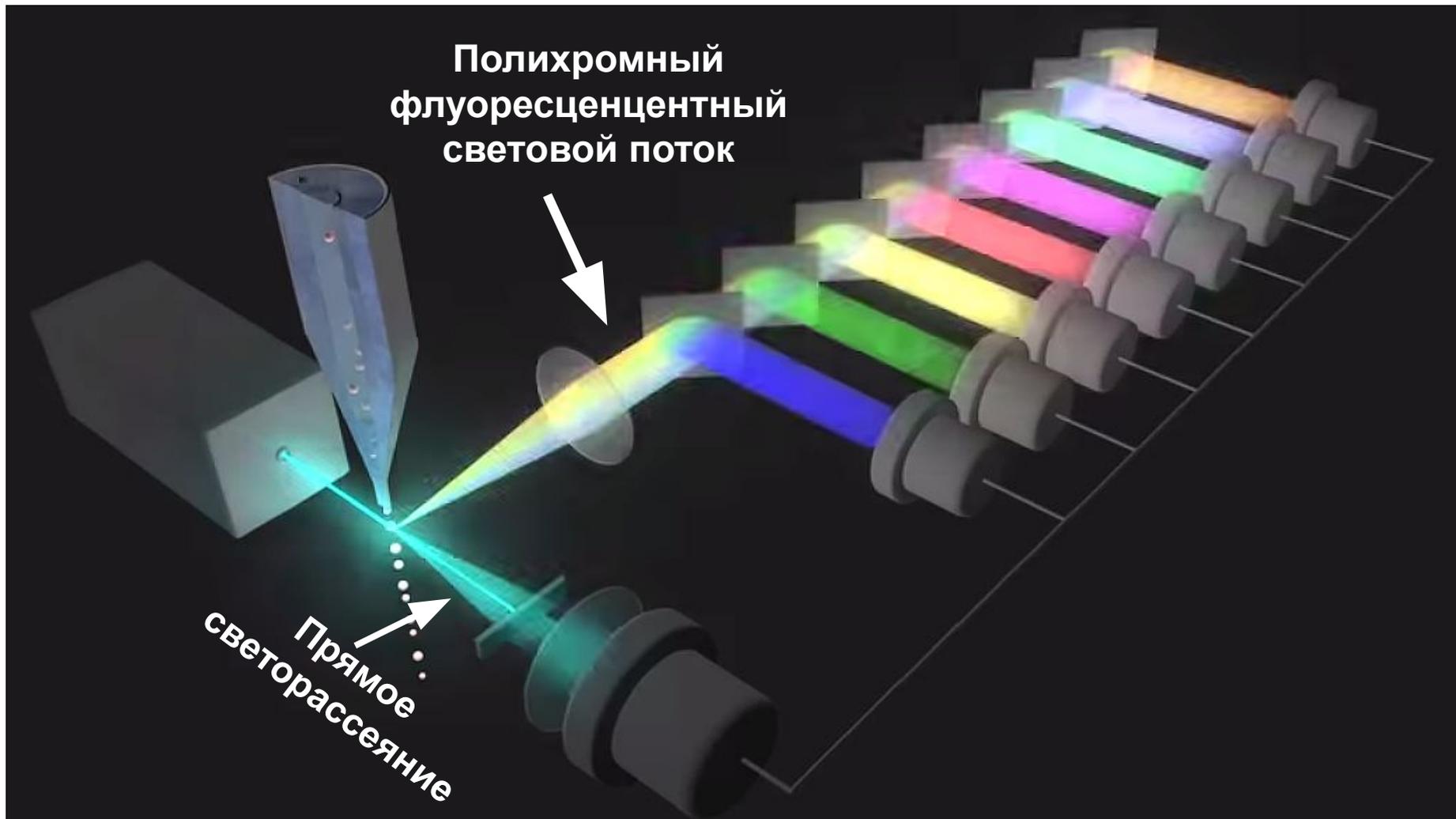
Проточно-цитометрический анализ мононуклеарных клеток периферической крови пациента с В-клеточным хроническим лимфолейкозом (двумерная диаграмма)



3. Оптическая система для измерения интенсивности как собственной флуоресценции клеток, так и после их предварительного окрашивания флуоресцентным(и) красителем(ями).

В настоящее время синтезированы флуоресцентные красители, которые имеют максимумы возбуждения в диапазоне λ 400 - 650 нм. Их флуоресценция (вторичный световой поток) имеет **определенную длину волны**. Часто изучаемые клетки окрашивают сразу несколькими красителями. Как результат – флуоресценция (вторичный световой поток) является **полихромным**. Оптический канал позволяет выделить из общего потока флуоресценции все его составляющие (каждый из которых имеет определенную длину волны) и измерить их интенсивность.

Одновременное измерение интенсивности флуоресценции восьми различных флуоресцентных красителей, которым были обработаны изучаемые клетки



Флуоресцентные красители для обработки клеток (иммунофлуоресцентное мечение)

Флуорохромы (флуоресцентные красители): флюоресцеинизотиоцинат (**FITC**, $\lambda_{\text{флуор.}} = 530 \text{ nm}$), тетраме-тил-родамин (**TRITC**), фикоэритрин (**PE**, $\lambda_{\text{флуор.}} = 585 \text{ nm}$), белок хлорофилла – перидинхлорофилл протеин (**PerCp**, $\lambda_{\text{флуор.}} = 650 \text{ nm}$), алло-фикоцианин (**APC**, $\lambda_{\text{флуор.}} = 661 \text{ nm}$), тандем цианин-5/фикоэритрин (**Cy5/PE**, $\lambda_{\text{флуор.}} = 670 \text{ nm}$) и др.

Наиболее распространенным является использование 2 - 4-х флуоресцентных меток (при наличии нескольких лазеров в приборе). Возбужденные лазерным лучом флюоресцентные красители, генерируют вторичные световые потоки (имеющие различные $\lambda =$ различные цвета), что позволяет определять 2 или 3 антигена одновременно.

Спектральные характеристики некоторых современных флуоресцентных красителей для проточной цитометрии

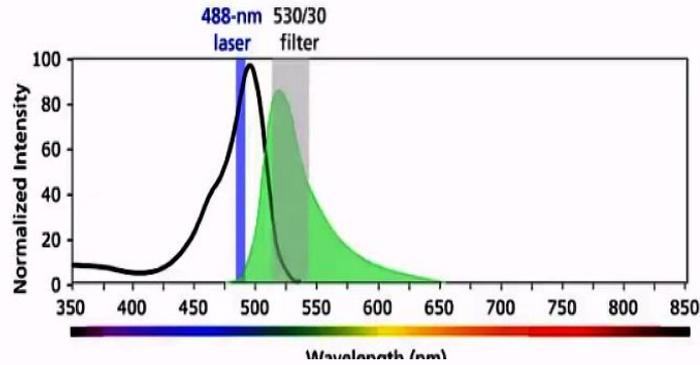
FITC

PE

PerCP-Cy5.5

PE-Cy7

APC



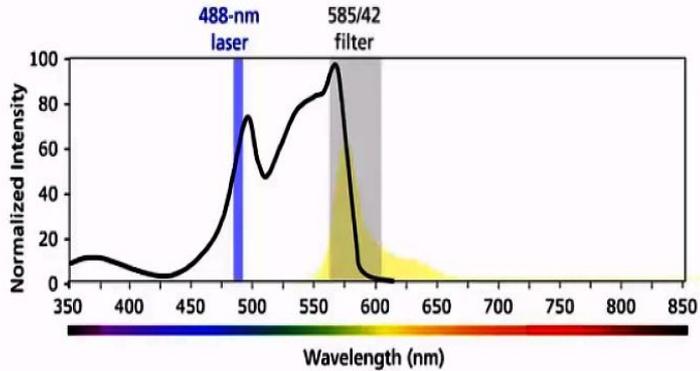
FITC

PE

PerCP-Cy5.5

PE-Cy7

APC



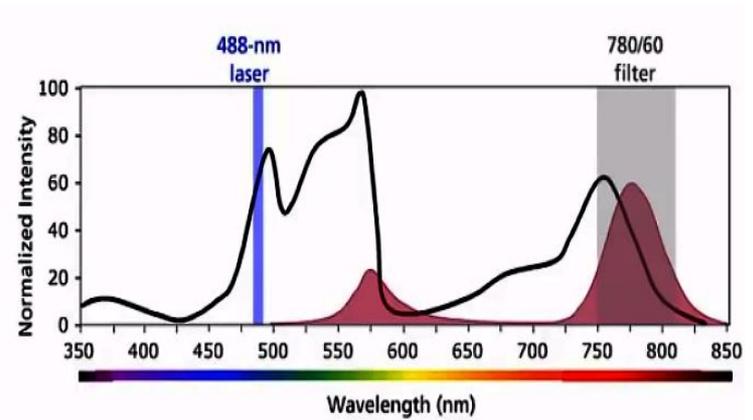
FITC

PE

PerCP-Cy5.5

PE-Cy7

APC



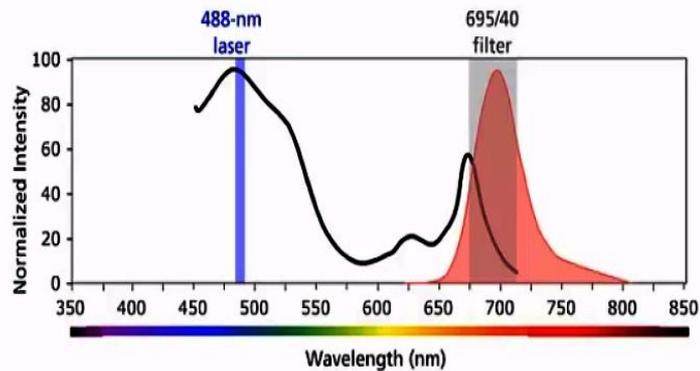
FITC

PE

PerCP-Cy5.5

PE-Cy7

APC



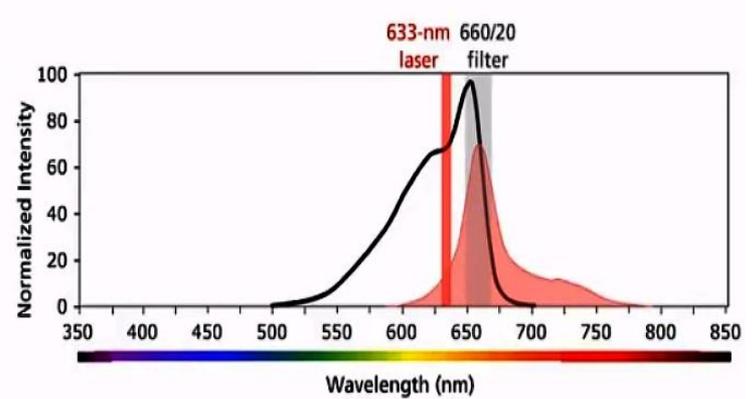
FITC

PE

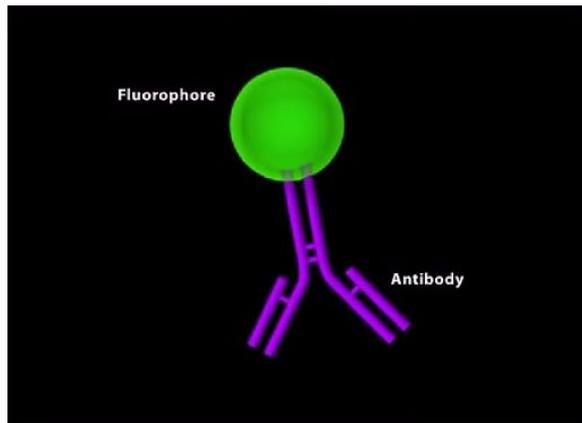
PerCP-Cy5.5

PE-Cy7

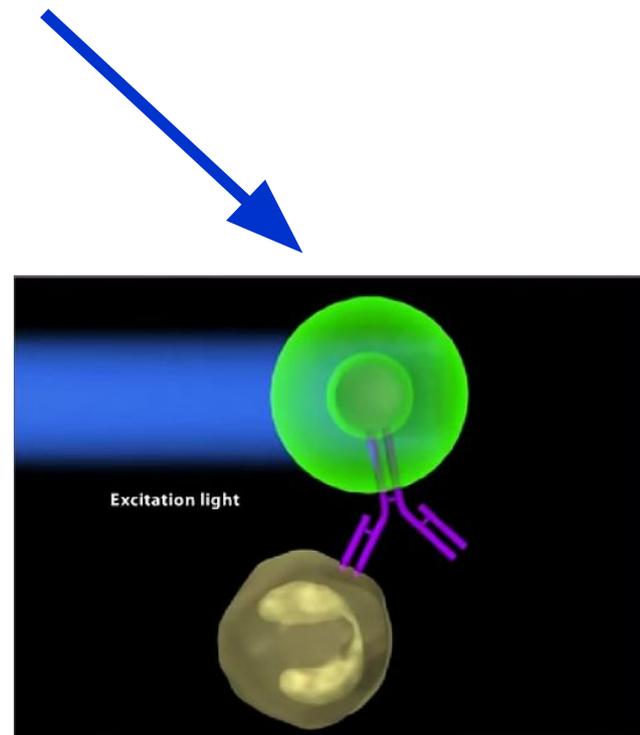
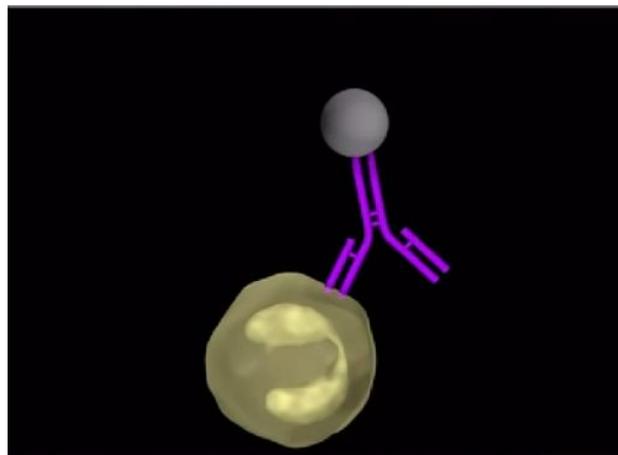
APC



Принцип выявления клеточных маркёров с помощью меченых флуорохромами моноклональ-ных антител (МКА)

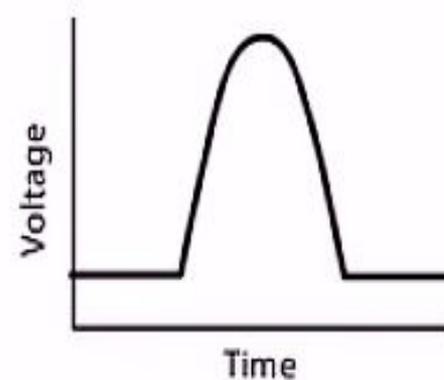
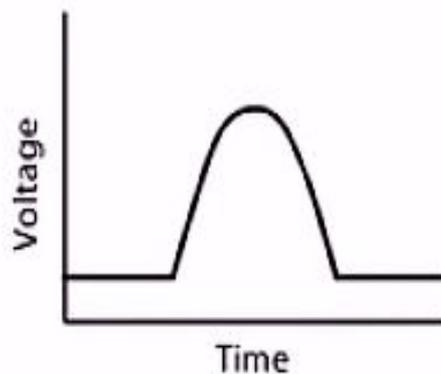
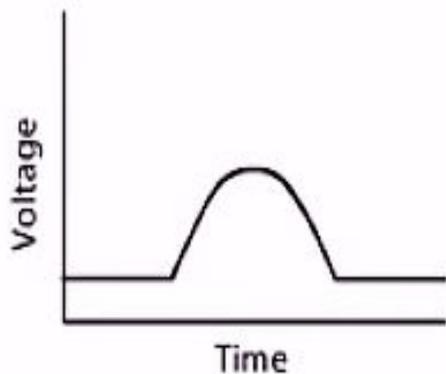
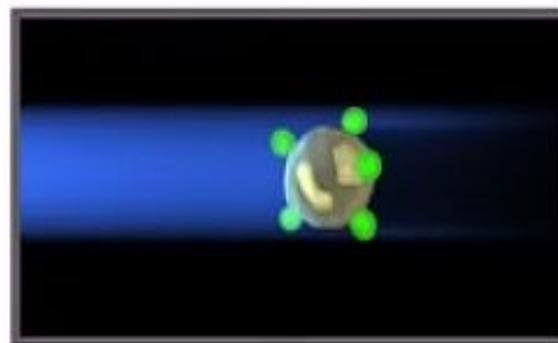
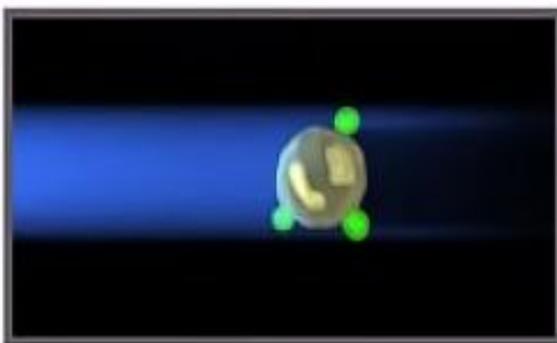


Моноклональное антитело (МКА), конъюгированное с флуоресцентным красителем (флуоресцеин изотиоцианат, ФИТЦ). Клетки, с экспрессией соответствующих антигенов на поверхности, связывают эти МКА и начинают флуоресцировать.



Интенсивность флуоресценции пропорциональна количеству ФИТЦ-меченых МКА, связавшихся с клеткой

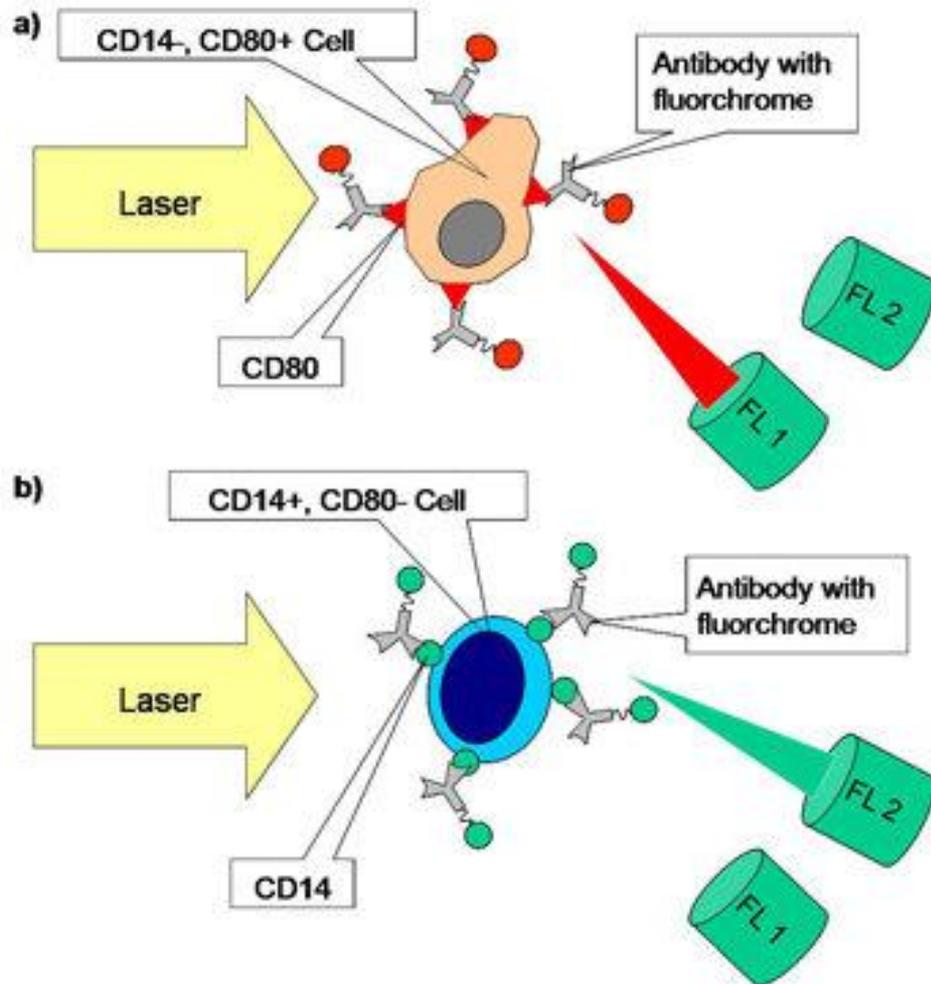
Brighter 



Информация, получаемая на основе анализа флуоресценции клеток

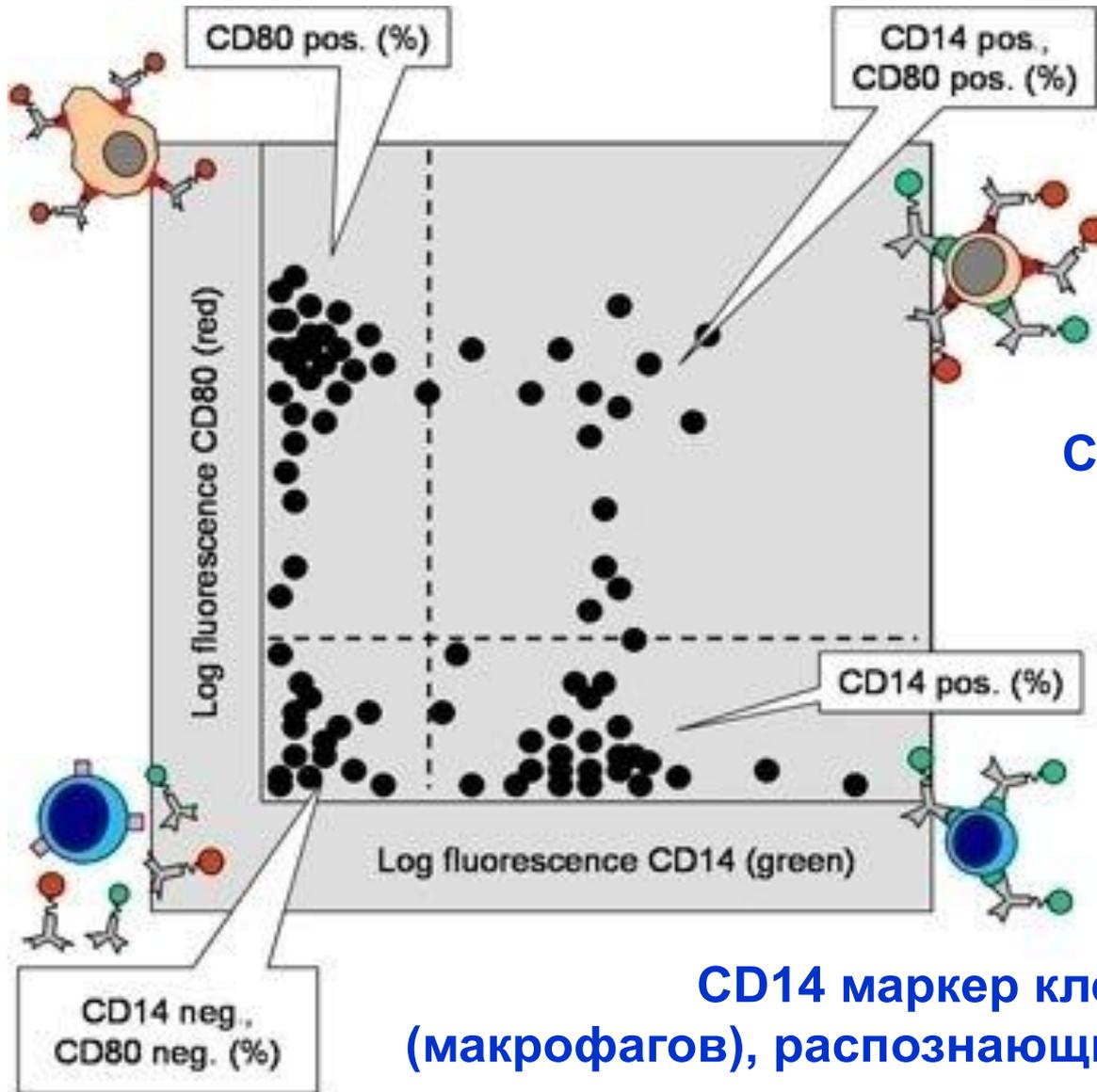
1. Измерение содержания различных пигментов (хлорофилл);
2. Сортировка клеток по содержанию ДНК и РНК, в том числе изучение фаз клеточного цикла;
3. Определение количества копий ДНК в клетке;
4. Сортировка клеток по содержанию РНК;
5. Изучение структуры хромосом;
6. Изучение экспрессии белков и их локализацию;
7. Сортировка клеток по содержанию в них трансгенных продуктов (белок зеленой флуоресценции – **green fluorescence protein**) и др.);
8. Изучение внутриклеточного содержания цитокинов или вторичных мессенджеров;
9. Выявление клеток, имеющих поверхностные антигены;
10. Измерение ферментативной активности;
11. Определение жизнеспособности клеток;
12. Оценка «дыхательного взрыва» макрофагов;
13. Оценка устойчивости опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам и др.

Метод сортировки клеток суспензии на основе регистрации их флуоресценции после окрашивания флуоресцентными красителями – получил название **FACS analysis (fluorescence activated cell sorting)**.



Меченые различными флуорохромами МАК связываются со «своими» поверхностными антигенами. В итоге:
CD80+ клетки дают красную флуоресценцию;
CD14+ клетки – зелёную флуоресценцию.

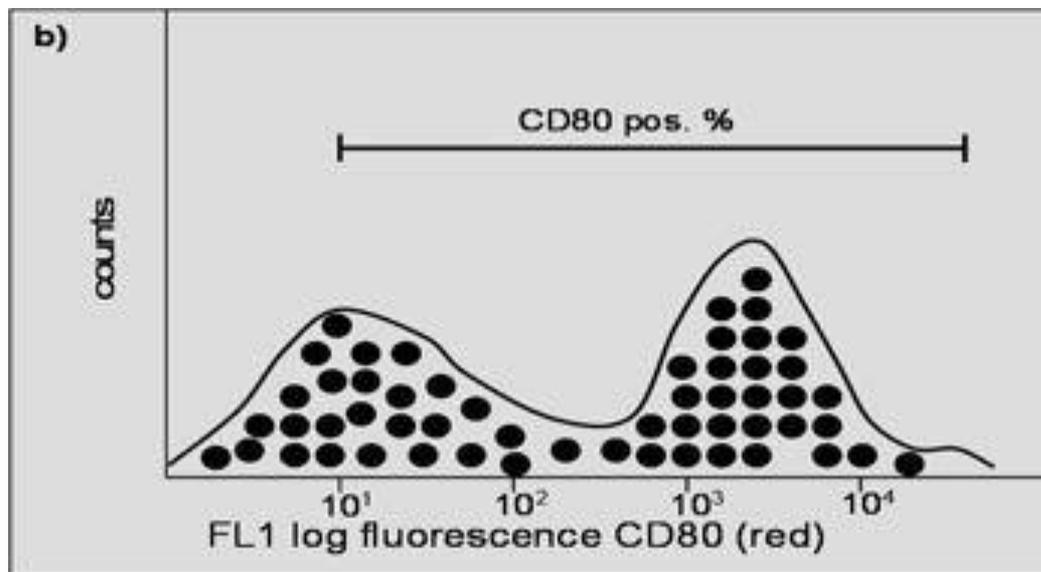
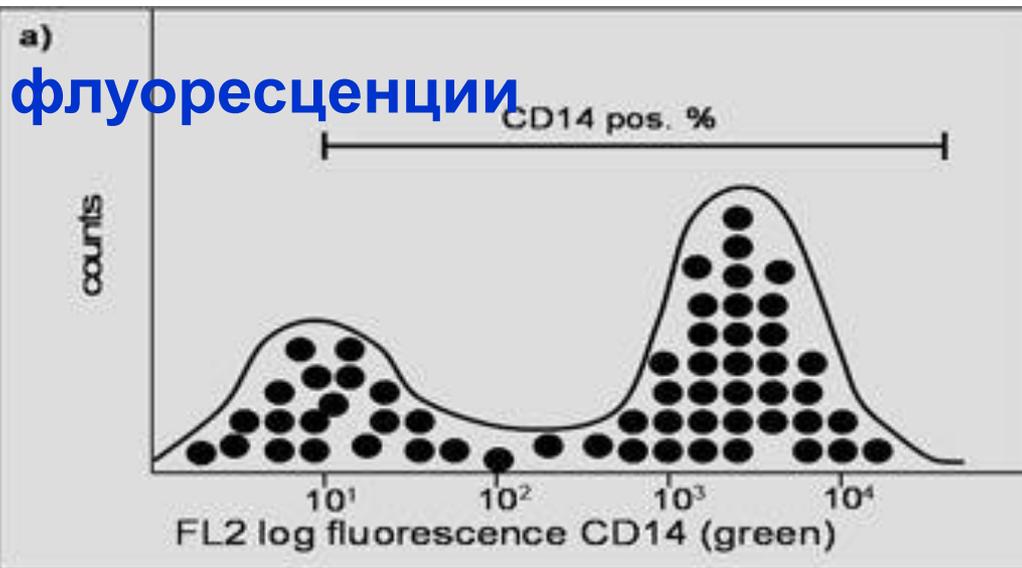
Результирующий график сортировки клеток по экспрессии поверхностных антигенов CD14 и CD80



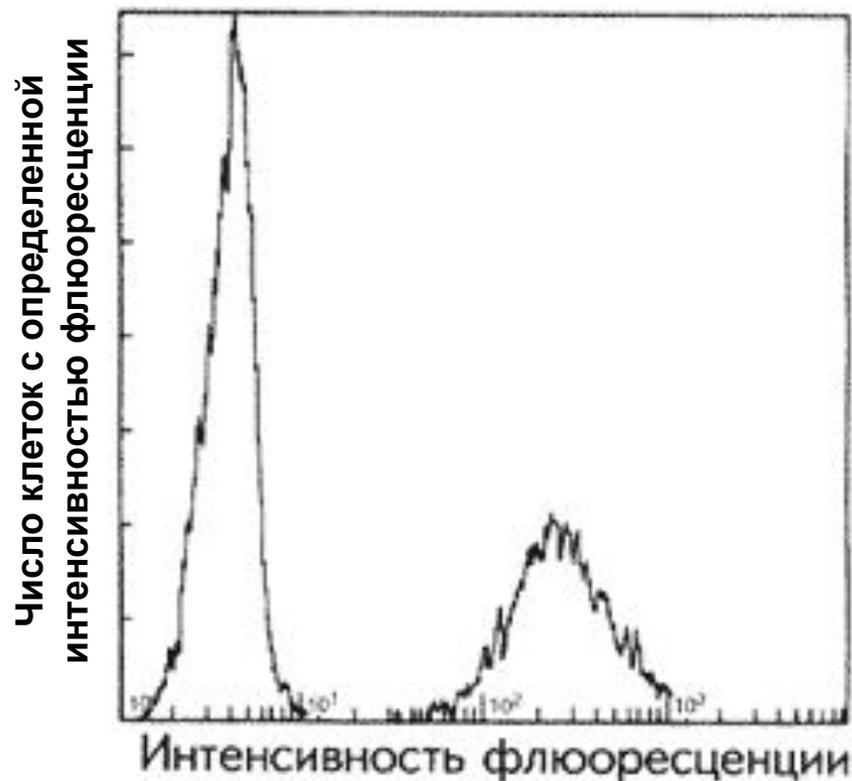
CD80 – маркер активированных В-клеток

CD14 маркер клеток миелоидного ряда (макрофагов), распознающих бактериальный ЛПС

Результирующая гистограмма количественного распределения CD80 и CD14 клеток по интенсивности флуоресценции



Пример иммуно-фенотипического анализа клеток с использованием проточной цитометрии

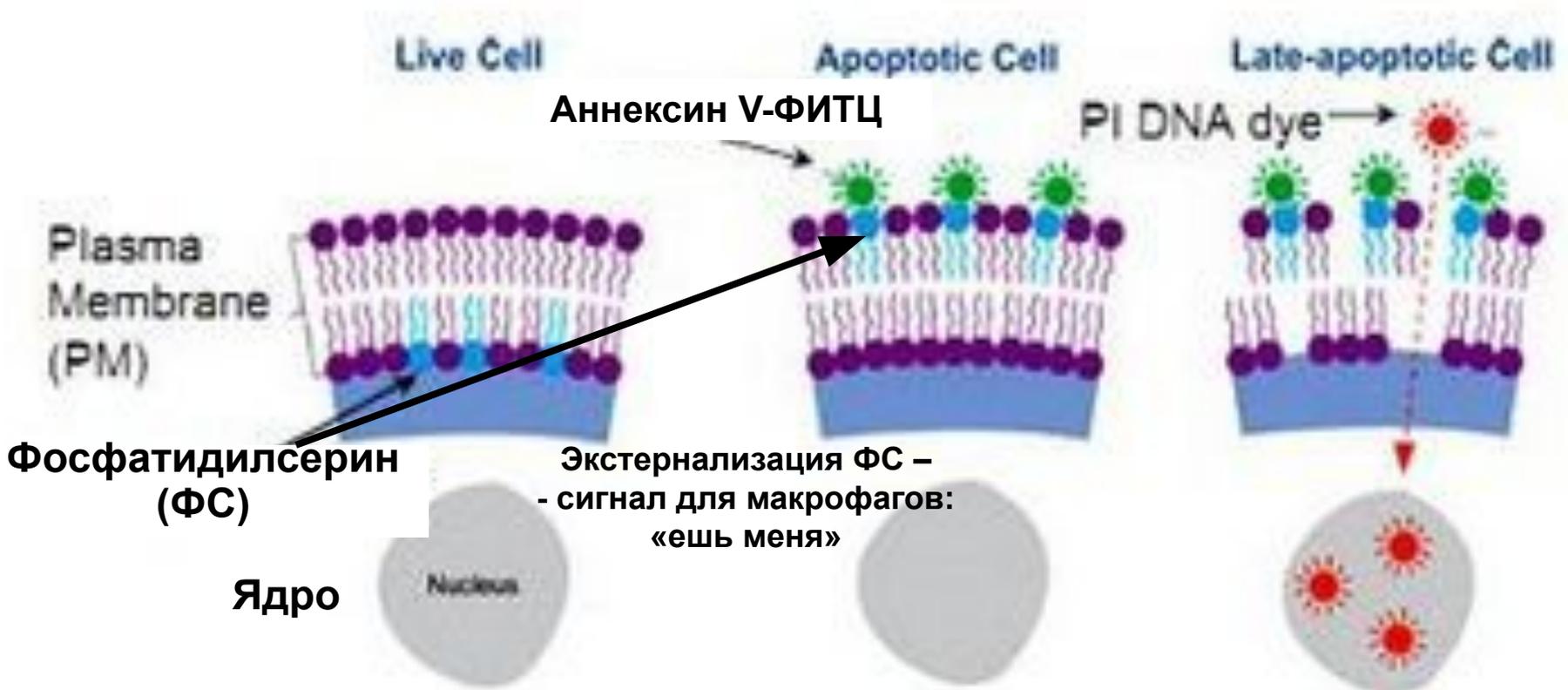


Одномерная гистограмма распределения клеток: слева — неокрашенные клетки (собственная флюоресценция, или аутофлюоресценция клеток), справа — клетки, окрашенные МКА к миелопероксидазе (Anti-MPO/FITC).

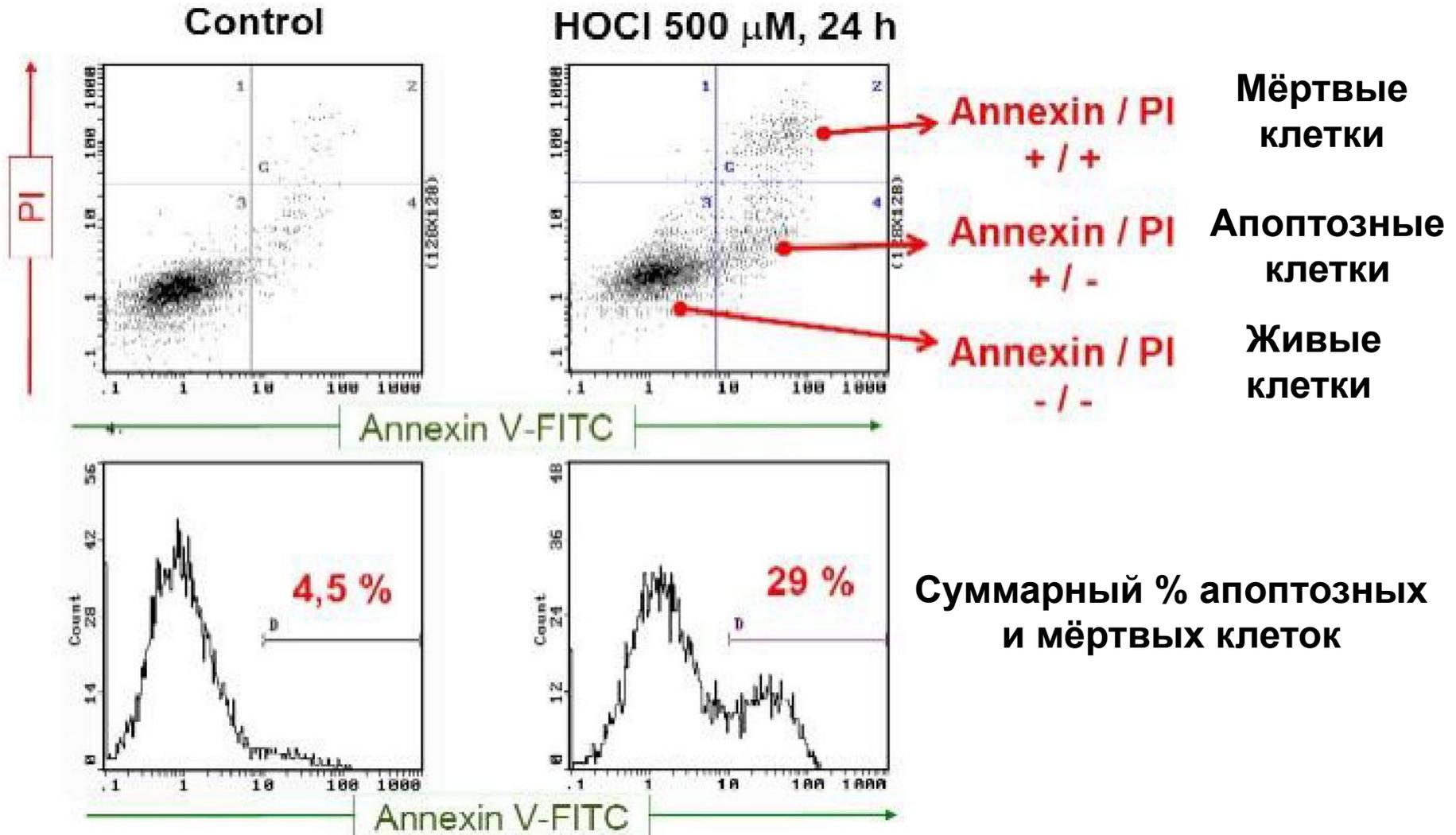
Выявление апоптоза клеток по изменениям структуры плазматической мембраны методом проточной цитометрии с применением ФИТЦ и PI

Аннексин V – белок с высоким сродством к фосфатидилсерину. Используют конъюгат Аннексин V-ФИТЦ.

Propidium Iodide (PI) – флуоресцентный краситель, связывающийся с ДНК или её фрагментами.



Результат выявления проточной цитометрией апоптозных клеток с использованием двух флуорфоров



Проточная цитометрия - ведущий метод в клинической иммунологии и гематологии. Метод используют для решения следующих задач:

- иммунофенотипирования лимфоцитов, включая определение количества CD4, CD8 клеток и даже TH1 и TH2 (по продукции специфических цитокинов);
- анализа процессов клеточной активации на основе определения маркеров ранней активации: CD25 (рецептор интерлейкина-2), CD38, CD69, CD71 (трансферриновый рецептор), CD95 (антиген апоптоза), CD122, анти-HLA-DR;
- определения маркеров пролиферативной активности клеток иммунной системы (Ki-67, PCNA, Cyclin D3);
- оценки внутриклеточной продукции цитокинов различными клеточными популяциями;
- иммунофенотипирования острых лейкозов и лимфом;
- анализа клеточного цикла с определением распределения клеточной популяции по фазам цикла (ДНК-цитометрия);
- анализа маркеров апоптоза (аннексина V, CD95 Fas/APO-1, CD95L, Bcl-2, P53).

Области применения проточной цитометрии

Иммунология

- Иммунофенотипирование клеток крови;
- Определение фагоцитарной активности;
- Определение внутриклеточных цитокинов и различных внутриклеточных белков (например транскрипционных факторов);
- Определение пролиферативной активности ;
- Исследование клеточного цикла;
- Оценка клеточной цитотоксичности;
- Трансплантационный мониторинг.

Онкология

- Количественный анализ внутриклеточных компонентов (ДНК);
- Анализ стадий клеточного цикла;
- Определение специфических маркеров;
- Наблюдать пациентов, входящих в группу риска;

- **Оценка состояния иммунной системы;**
- **Оценка клеточного звена иммунитета (определение субпопуляций лимфоцитов);**
- **Оценка функциональной состоятельности иммунокомпетентных клеток (NK тест, фагоцитарный тест и т. п.).**

Цитология

- **Определение цитоморфологических характеристик клетки: размер, соотношение ядро/цитоплазма, степень асимметричности и гранулярности клеток;**
- **Оценка активности внутриклеточных ферментов с помощью флуорогенных субстратов;**
- **Определение экспрессии поверхностных антигенов;**
- **Анализ стадий клеточного цикла;**

- Измерение физиологических параметров клетки (внутриклеточный рН, концентрация ионов Ca^{2+} , потенциал клеточной мембраны).

Гематология

- Анализ субпопуляционного состава клеток крови;
- Подсчет ретикулоцитов, анализ тромбоцитов по специфическим маркерам;
- Диагностика и дифференциальная диагностика лимфопролиферативных заболеваний;
- Диагностика острых лейкозов.

Клеточная биология, биохимия

- Измерение экспрессии маркеров;
- Измерение активности внутриклеточных ферментов;
- Определений стадий клеточного цикла при изучении механизмов действия БАВ на клеточном уровне.

Разнообразиие вариантов использования
проточной цитометрии на сегодняшний день
может быть ограничено только фантазией
исследователя, а в диагностической службе –
аналитическими потребностями клиники.