

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)

АГЛЯДЫ REVIEWS

УДК 576.3.08
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-229-242>

Поступила в редакцию 16.12.2021
Received 16.12.2021

И. Д. Вологовский, С. В. Пинчук

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ. ОСНОВЫ ТЕХНОЛОГИИ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В БИОЛОГИИ

Аннотация. В данном обзоре предпринята попытка изложить основы технологии проточной цитометрии – фундаментального метода исследования, широко применяемого в различных областях биологической науки – клеточной биологии, биофизики, биохимии, молекулярной биологии, а также в прикладной и диагностической медицине. Приведены данные о принципе работы метода, устройстве проточных цитометров и их возможностях (получение информации о структурно-функциональном состоянии клеточных популяций и сортировка клеток) и использовании в проточной цитометрии лазерных источников излучения и систем регистрации рассеянного света и флуоресценции. Кроме того, представлен широкий ассортимент различных флуорофоров и моноклональных антител. Приводятся конкретные примеры использования метода проточной цитометрии в различных экспериментах. Рассматриваются перспективы дальнейшего развития технологии.

Ключевые слова: проточная цитометрия, клеточная популяция, сортировка, многопараметровый анализ, кластеры дифференцировки, моноклональные антитела, флуорохромы

Для цитирования: Вологовский, И. Д. Проточная цитометрия. Основы технологии и ее применение в биологии / И. Д. Вологовский, С. В. Пинчук // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 229–242. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-229-242>

Igor D. Volotovskii, Sergei V. Pinchuk

*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus*

FLOW CYTOMETRY. BASICS OF TECHNOLOGY AND ITS APPLICATION IN BIOLOGY

Abstract. The given review is an attempt of concentrated consideration of flow cytometry problem which is widely used as a fundamental research approach in various fields of biology like cell biology, biophysics, biochemistry and molecular biology and also in applied and diagnostic medicine. The method principle, construction of flow cytometers and their possibilities (study of structure and function state of cell populations and cell sorting), usage of lasers in flow cytometers, wide assortment of fluorophores and monoclonal antibodies. The concrete examples of flow cytometer methods in different experiments are given. The trends in development of flow cytometry are considered.

Keywords: flow cytometry, cell population, sorting, multiparametric analysis, clusters of differentiation, monoclonal antibodies, fluorochromes

For citation: Volotovskii I. D., Pinchuk S. V. Flow cytometry. Basics of technology and its application in biology. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 67, no. 2, pp. 229–242 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-229-242>

Проточная цитометрия – быстро прогрессирующий метод биофизического анализа живых клеток и частиц неорганической и органической природы, основанный на их спектральном сканировании в потоке с использованием одиночных или множественных тестирующих источников лазерного излучения в видимой спектральной области [1–4]. Проточная цитометрия базируется на обширном арсенале достижений цитохимии и флуоресцентного анализа структурных

компонентов клеток, но от классической цитохимии ее отличает высокая производительность. Так, исследуются выборки от нескольких тысяч до нескольких миллионов клеток, что гарантирует экспериментальную достоверность результатов [3, 5].

От классических методов клеточной биологии проточную цитометрию отличает возможность анализа не усредненных молекулярных характеристик клеточной популяции, а индивидуальных параметров ее отдельных клеток [6].

Два существенных обстоятельства делают проточную цитометрию незаменимым методом анализа клеток. Во-первых, этот метод позволяет охарактеризовать гетерогенные клеточные популяции по фенотипу, а при использовании ДНК-цитометрии – и по генотипу входящих в них клеток. Во-вторых, это высокая производительность метода – способность обнаружить и охарактеризовать маловероятные события, встречающиеся с частотой порядка 10^{-5} – 10^{-7} . Современные цитометры могут регистрировать несколько параметров каждой отдельной клетки со скоростью до 30 000 клеток в секунду [1, 4].

Принцип функционирования проточного цитометра состоит в следующем: через тонкую ячейку под определенным давлением прокачивается «обжимающий» буферный раствор с исследуемыми клетками (рис. 1). Условия подобраны таким образом, что в ячейке создается так называемое гидродинамическое фокусирование струи, вследствие чего клетки выстраиваются друг за другом. В определенном месте поток одиночных клеток попадает под зондирующий лазерный луч, что позволяет считывать с них разнообразную информацию [1].

Исследуемые частицы и клетки перед измерением суспендируются в буферном растворе. Анализ осуществляется в двух режимах: режиме рассеяния и режиме флуоресценции. Рассеяние регистрируется по двум взаимно перпендикулярным векторам: прямом (forward scatter) и боковом (side scatter). Регистрируя сигнал рассеяния света, получают информацию о концентрации клеток в образце, их размерах и сложности внутреннего устройства. Флуоресцентный анализ базируется на собственной флуоресценции клеток или флуоресценции связанных с клеткой или введенных в клетку флуоресцентных зондов. В их роли используются флуоресцентные белки, например зеленый флуоресцирующий белок (green fluorescent protein), флуоресцентные зонды (красители), например бромид пропидия или меченные флуоресцентными зондами моноклональные антитела.

Проточная цитометрия используется в таких областях научных исследований, как молекулярная биология, клеточная биология, биофизика и биохимия, онкобиология, микробиология, иммунология и вирусология. Метод позволяет одновременно анализировать такие гетерогенные

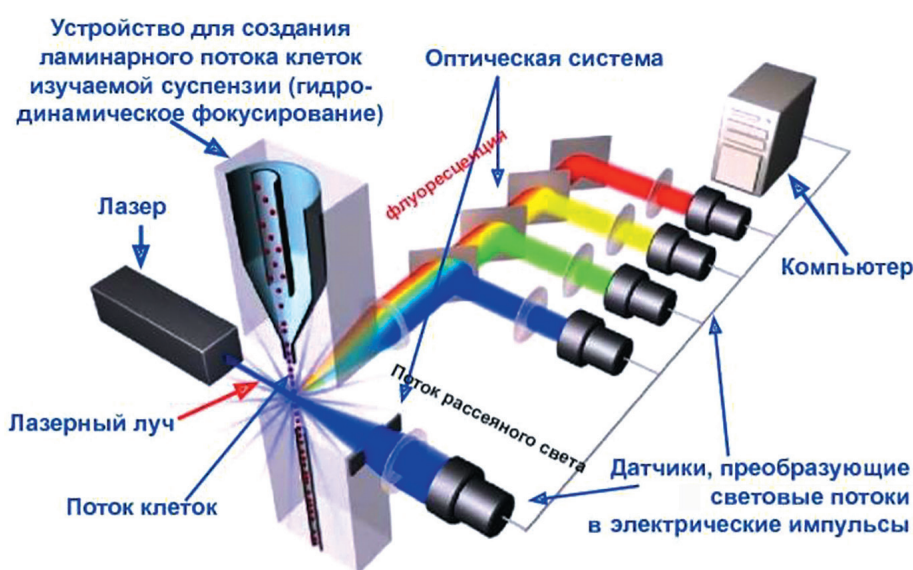


Рис. 1. Принципиальная схема проточного цитометра [1]

Fig. 1. Schematic diagram of a flow cytometer [1]

системы, как клеточные популяции крови, костного мозга, а также тканей, которые можно дезагрегировать до отдельных клеток (лимфоузлы, почка, слизистые, опухоли и др.). Кроме изучения клеточных популяций проточная цитометрия используется также с целью сортировки – выделения из гетерогенной популяции отдельных клеток для дальнейших исследований. Более детальное рассмотрение применения проточных цитометров в биологии приведено ниже.

В последние десятилетия лазерные источники света получили широкое распространение в науке и технике. Они часто используются как в проточных цитометрах, так и в комбинации с проточной цитометрией в специализированных приборах другого назначения – микроскопах и масс-спектрометрах.

Большое значение для развития проточной цитометрии, сопровождающегося взрывным ростом возможностей метода, имело увеличение доступных на рынке реактивов (флуорохромов, конъюгированных с моноклональными антителами, тандемных и полимерных красителей) и, как следствие, рост информативности проточной цитометрии. Кроме того, появились флуоресцирующие белки (например, mCherry, mBanana, mOrange, mNeptun и др.), что дало возможность вводить в клетку необходимую метку.

Прорывную роль в проточной цитометрии сыграли моноклональные антитела, используемые в первую очередь для типирования клеток. Меченные флуорохромами моноклональные антитела позволяют проводить как качественный, так и количественный анализ поверхностных и внутриклеточных антигенов. На сегодняшний день ряд фирм предлагают широкий спектр моноклональных антител, с помощью которых можно идентифицировать клеточные поверхностные антигены, получившие название кластеров дифференцировки (cluster of differentiation, CD). По сути дела, CD – это набор моноклональных антител, которые распознают одну и ту же структуру на клеточной поверхности независимо от эпитопной специфичности. В настоящее время описано порядка 350 кластеров дифференцировки клеток человека. Расширился и спектр флуоресцентных красителей. Так, например, пометив несколько моноклональных антител различными флуоресцентными красителями, можно в одном эксперименте получить информацию сразу о нескольких антигенах на поверхности клеток, а следовательно, и о составе клеток в популяции.

Разнообразие флуорохромов сделало возможным количественное исследование ряда таких физиологических параметров, как внутриклеточный pH (флуоресцеин и 7-гидроксикумарин), концентрация свободных ионов кальция (Fura red, Indo-1, Fluo-3), уровень окислительных процессов в клетке, активация митохондрий, потенциал наружной клеточной мембраны, механизмы гибели клеток (апоптоз, некроз) [1, 7]. Кроме того, разработаны методики, позволяющие при помощи проточной цитометрии исследовать фагоцитоз, экспрессию цитокинов и др. Все это создает предпосылки для современных исследований всего комплекса внутриклеточных процессов на уровне отдельных клеток.

Финальным этапом эксперимента с использованием проточной цитометрии является анализ полученных результатов, наиболее часто – выдаваемых прибором гистограмм с отображением одного или двух (dot plot) измеряемых параметров (рис. 2). Однако увеличение объема данных и повышение сложности экспериментов вызвало необходимость разработки более новых методов кластерного анализа (в частности, PCA, SPADE и tSNE) с целью извлечения из многомерного массива данных больше полезной информации.

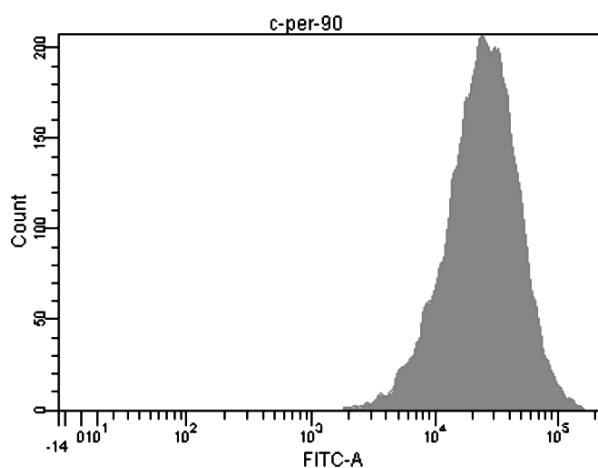


Рис. 2. Гистограмма флуоресценции зонда CM-H₂DCF-DA в МСК костного мозга после воздействия на клетки трет-бутилгидропероксида [7]

Fig. 2. Histogram of CM-H₂DCF-DA fluorescence in bone marrow MSCs after treatment of cells with tret-butylhydroperoxide [7]

Оборудование. Традиционные проточные цитометры. Традиционный проточный цитометр состоит из трех функциональных систем: гидравлической, оптической и электронной (см. рис. 1). Гидравлическая система содержит так называемую обжимающую жидкость (обычный солевой буферный раствор, находящийся под давлением) для беспрепятственной доставки и фокусирования лазерного луча. Оптическая система состоит из двух частей: оптики возбуждения (лазер) и оптики регистрации (фотоумножитель или фотодиод), с помощью которых возникший световой сигнал генерируется и затем подвергается анализу. Набор дихроичных светофильтров выделяет флуоресцентное излучение для его последующего улавливания специализированным детектором. Более специфическими являются светофильтры, отсекающие коротко- и длинноволновые участки спектра, оставляя излучение в максимуме флуоресцентного сигнала. Они как бы создают узкое спектральное окно, пропускающее информационно ценное излучение для его последующей детекции и конверсии электронной системой цитометра в цифровой сигнал [8].

Наиболее часто в проточных цитометрах используются лазеры с испусканием излучения следующих длин волн: 488 нм (синий), 405 нм (фиолетовый), 532 и 553 нм (зеленый), 561 нм (зелено-желтый), 640 нм (красный) и 355 нм (ультрафиолетовый) (см. таблицу). Поскольку современные цитометры, как правило, оборудованы более чем тремя фотоэлектронными умножителями (от 3 до 18), на одном образце периферической крови можно проанализировать практически все основные субпопуляции клеток [9]. Наличие на рынке большого выбора моноклональных антител, меченных различными флуорохромами, дает возможность исследователю подобрать такой их набор, чтобы на меньшем количестве образцов получить максимальную информацию. Все это привело к формированию многопараметрового анализа в цитометрии.

Во многих проточных цитометрах вместо фотоумножителей используются фотодиоды, позволяющие увеличить чувствительность приборов.

Флуорохромы, используемые для конъюгации с моноклональными антителами [2]

Fluorochromes used for conjugation with monoclonal antibodies [2]

Флуорохром	Длина волны возбуждения, нм	Максимум эмиссии, нм
Флуоресцеинизотиоцианат (FITC)	488	525
Алекса Флуор 488 (Alexa Fluor 488)	488	525
Фикоэритрин (PE, R-PE, RD1)	488	575
ECD (PE-Texas Red)*	488	610
PC5 (PE/CY5)*	488	675
PC5.5 (PE/CY5.5)*	488	700
PE Alexa Fluor 700*	488	725
PC7 (PE/CY7)	488	790
Алофикоцианин (APC)	633/635	680
Alexa Fluor 647	633/635	680
Alexa Fluor 700	633/635	725
APC Alexa Fluor 700*	633/635	725
APC7 (APC/CY7)*	633/635	790

Примечание. CY – цианин; * – tandemные флуоресцентные красители.

Ультразвук-фокусирующие цитометры. В этих цитометрах для увеличения фокусирования используется ультразвуковая обработка. Она позволяет уменьшить в проточном цитометре риск засорения системы прокачки образцов.

Клеточные сортеры. Особым типом проточных цитометров являются клеточные сортеры, с помощью которых можно очистить клетки в образце и собрать их в коллекторе для дальнейшего анализа. Использование клеточного сортера позволяет проводить селекцию в популяции клеток, характеризующихся выраженностью позитивных или негативных параметров, и собирать их в специальном коллекторе (рис. 3). Сортеры разделяют клетки благодаря осцилляции



Рис. 3. Упрощенная схема проточного цитометра с функцией сортировки клеток [4]

Fig. 3. Schematic diagram of a flow cytometer with cell sorting function [4]

потока жидкости в приборе при высоких частотах и образованию капель. Капли обладают позитивным или негативным зарядом. Они пропускаются через так называемую отклоняющую металлическую пластинку и в зависимости от их заряда направляются в специальный коллектор. В качестве коллекторов используют трубочки, предметные стекла или пластинки (чаще всего имеющие 96 или 384 лунок). Имеются два типа сортеров: сортеры с кварцевой кюветой и сортеры с воздушной струей. Они отличаются точкой расположения тестирующего лазера. Сортеры с кварцевой кюветой характеризуются фиксированным лазерным источником света, а у сортеров с воздушной струей приходится перед каждой процедурой настраивать систему. Это создает определенные неудобства, но эти сортеры адаптированы к детекции малых клеток.

Проточные цитометры с визуализацией. Данные цитометры, представляющие собой комбинацию традиционного проточного цитометра с флуоресцентным микроскопом, позволяют быстро анализировать как отдельные клетки, так и популяции в целом по их морфологии и флуоресцентным параметрам [5]. Кроме того, они могут оценивать распределение белков внутри отдельной клетки подобно конфокальному или флуоресцентному микроскопам и осуществлять функции проточного цитометра. Особенно востребованы эти цитометры при исследовании в популяции процессов клеточной сигнализации и образования межклеточных контактов, повреждения и репарации ДНК, а также в опытах по определению локализации клеток в популяции в соответствии с флуоресцентными данными.

Масс-цитометры. Масс-цитометры представляют собой комбинацию времяпролетного масс-спектрометра с проточным цитометром [10]. При этом для детекции клеток вместо антител, меченных флуоресцентными зондами, используются антитела, меченные ионами тяжелых металлов (обычно лантанидами). Однако в этом случае в ходе анализа клетки могут разрушаться, поэтому клеточный сортинг невозможен. В масс-цитометрах скорость прокачки составляет только 1000 клеток/с вместо 10 000 клеток/с у традиционных проточных цитометров. Появились и новые металлические зонды для мечения антител, например платиновые [11].

Цитометры с биочипами. Данная разновидность проточной цитометрии приобрела популярность при анализе большого количества образцов при их малых объемах. Другими словами, в этом случае используются биочипы с известным флуоресцентным сигналом в канале регистрации и репортерными молекулами, которые детектируются с помощью отдельного лазера, что позволяет увеличить количество захваченного биочипами анализируемого вещества. При этом один такой анализ заменяет 100 определений с помощью метода ELISA. Для проведения большого

количества измерений были сконструированы небольшие проточные цитометры с двумя лазерами и 96-луночными кассетами. Прибор в состоянии регистрировать и дискриминировать в двух каналах 100–500 различных образцов, характеризующихся чипами с различными флуоресцентными свойствами.

Спектральные анализаторы. Одним из вызовов многопараметровой проточной цитометрии является перекрытие спектров между различными флуорохромами. Для решения этой проблемы в современных проточных цитометрах используются специальные спектральные анализаторы. Они регистрируют в образце спектры эмиссии каждого флуорохрома, которые служат потом отпечатком, а в ходе анализа выделяют для каждого флуорохрома чистый сигнал. Использование спектрального анализа стало стартовым событием по замене в проточных цитометрах фотоумножителей как детекторов сигналов на фотодиоды.

Новые технологии детекции. Благодаря высокой чувствительности и низкому шумовому току фотоумножители до сих пор остаются в проточных цитометрах стандартными детекторами. Тем не менее в проточных цитометрах начинают применять твердотельные детекторы. Лавинные фотодиоды дешевы, характеризуются линейностью усиления сигнала и фоточувствительностью в красной спектральной области, появились также и силиконовые детекторы.

Реактивы. Малые органические молекулы. На практике для мечения антител используются такие малые органические красители, как флуоресцеин (молекулярная масса (ММ) – 389 дальтон (D)), Алекса Флуор 488 – аналог флуоресцеина (ММ = 643 D), техасский красный (ММ = 625 D), пацифик голубой (ММ = 262 D). Они характеризуются небольшими (порядка 50–100 нм) стоксовскими сдвигами, стабильны и легко конъюгируют с антителами. Красителю Алекса Флуор (Thermo Fisher), специально синтезированному для повышения резистентности метки к фотообесцвечиванию, отдается предпочтение и при получении имиджевых изображений образцов.

Фикобилины. Фикобилины – класс крупных белков, входящих в состав цианобактерий и водорослей. Примерами фикобилинов служат фикоэритрин (PE), аллофиоксианин (APC) и перидиновый хлорофилловый белок (PErCP). Например, молекулярная масса фикоэритрина составляет 240 000 D. Фикобилины характеризуются большим стоксовским сдвигом (75–200 нм), они очень стабильны, а спектры их излучения хорошо воспроизводимы и не подвержены изменениям. Благодаря своим размерам фикобилины превосходно подходят для количественной проточной цитометрии, так как при образовании их конъюгатов с антителами сохраняется соотношение 1:1. Однако фикобилины под действием лазерного излучения быстро выцветают, поэтому их не рекомендуется использовать в опытах с продолжительным или повторным облучением.

Квантовые точки. Квантовые точки (Qdots) – полупроводниковые нанокристаллы, которые характеризуются узким спектром флуоресценции, зависящим от их размера. Их свечение возбуждается ультрафиолетовым или фиолетовым лазером. Возбуждение квантовых точек осложняется компенсаторным эффектом флуоресценции в случае, когда проводятся многопараметровые эксперименты. Из-за компенсаторного эффекта и связанными с ним трудностями конъюгации Qdots с антителами в многопараметровых экспериментах квантовые точки все чаще заменяются полимерными красителями.

Полимерные красители. Полимерные красители представляют собой полимерную цепь, способную поглощать и испускать свет при фиксированных длинах волн, что определяется длиной полимерной цепи и природой присоединенных к ней молекулярных субъединиц – красителей. Эти красители очень стабильны, обладают близким к фикобилинам квантовым выходом флуоресценции, но более значительной фотостабильностью. Так как полимерные красители поглощают свет только при определенных длинах волн, при их использовании удастся избежать множественного возбуждения. Примером данных красителей являются бриллиантовый фиолетовый (BV), бриллиантовый ультрафиолетовый (BUV) и бриллиантовый голубой (BB).

Тандемные красители. Тандемные красители представляют собой химическую пару, включающую фикобилин (PE, APC, PErCP) и полимерный краситель (BV421, BUV395) с небольшим органическим флуорохромом (Cu3, Cu5, Cu7), между которыми происходит миграция энергии (FRET), что увеличивает доступность флуорохрома к лазерному излучению. Так, например, у красителя техасский красный максимум возбуждения наблюдается при длине волны 589 нм,

а у РЕ максимум флуоресценции – при 595 нм, поэтому в составе тандема флуоресценция РЕ будет возбуждать молекулу тexasского красного, что позволяет возбуждать комплекс РЕ–тexasский красный излучением лазера при 488 или 532 нм. В комплексе с антителом тандемные красители характеризуются большей доступностью к свету возбуждения, так как они могут возбуждаться одним лазером. Тандемные красители имеют яркую окраску, величина их стоксовского сдвига составляет 150–300 нм, что очень удобно при изучении антител с низкой концентрацией. Однако тандемные красители менее стабильны, чем донорные флуорохромы, и могут значительно отличаться по эффективности миграции энергии. Большинство из более длинных бриллиант-полимерных красителей также являются тандемными и обладают теми же свойствами.

Металлические конъюгаты в масс-цитометрии. Масс-спектрометрия предполагает использование антител, конъюгированных с изотопами металлов группы тяжелых лантанидов. На рынке присутствуют 35 изотопов лантанидов, пригодных для конъюгации с антителами. Они не флуоресцируют и используются исключительно в масс-цитометрии. Появилась информация о применении в проточной цитометрии платины [11].

Флуоресцентные белки. Флуоресцентные белки используются в качестве репортерных систем при экспрессии генов. Чаще всего применяется зеленый флуоресцирующий белок (GFP), выделяемый из медузы *Aequorea victoria* [12]. Из GFP получают циановое производное белка (CFP) и желтый флуоресцирующий белок (YFP). Красный флуоресцирующий белок (DsRed) был выделен из грибовидного анемона (*Discosoma*) [13] и затем клонирован в системе белковой экспрессии. Флуоресцирующие белки mCherry и mBanana следующего поколения, клонированные из красного флуоресцирующего белка, характеризуются широкими спектрами возбуждения и эмиссии. Кроме того, исключительно в проточной цитометрии используются фиолетовый и зелено-желтый белки. К настоящему времени открыты также сотни новых флуоресцирующих белков со спектрами возбуждения и эмиссии в интервале длин волн от ультрафиолетовой до инфракрасной области [14].

Красители ДНК. Данные красители комплексируют с ДНК и РНК. Их используют при исследовании клеточного цикла (йодид пропидия, 7-AAD, DyeCycle Violet, DAPI), сортинге хромосом (Hoescht 33342, хромомиицин А3), сортинге стволовых клеток (Hoescht 33342) и для оценки их жизнеспособности. Их применяют также при сортинге бактерий и при изучении процессов пролиферации клеток.

Красители для изучения пролиферации. Пролиферацию клеток можно оценивать, подвергая их воздействию бромдезоксипуридина (BrdU), а затем обрабатывая антителами против BrdU и красителем ДНК. Однако этот подход не позволяет проводить длительные опыты по пролиферации. Эфир янтарной кислоты и карбоксифлуоресцеина (CFSE) и другие сходные по структуре красители используются для мониторинга пролиферирующих клеток. В последнее время на рынке появились их красный и фиолетовый варианты. Эти красители не оказывают влияния на рост или морфологию клеток, поэтому пригодны для длительных экспериментов.

Красители для оценки жизнеспособности. Жизнеспособность клеток можно оценивать по эксклюзии красителя жизнеспособными клетками, что является отражением интактности клеточной мембраны. Для этих целей используют связывающиеся с ДНК красители (йодид пропидия, DAPI, 7AAD) или красители, реагирующие внутри клетки со свободными аминами. На рынке представлены целые линейки красителей, реагирующих с аминами, – LIVE/DEAD (ThermoFisher), Zombie dyes (Biolegend), Fixable Viability Stain (BD Biosciences). Особенностью данных красителей является необратимость их реакции с аминами, что позволяет определять пул мертвых клеток в исходном образце даже после проведения процедур фиксации и пермеабиллизации клеток при внутриклеточном окрашивании антителами [15]. Связывающиеся с ДНК красители образуют менее устойчивые комплексы и выходят из клеток при проведении внутриклеточного окрашивания или при длительном хранении. Анализ жизнеспособности клеток необходимо проводить в относительно короткий период времени после их нагрузки красителями ДНК.

Красители – кальциевые индикаторы. Эти красители меняют окраску или квантовый выход флуоресценции после связывания с ионами кальция. Они используются в опытах по активации клеток и сигнализации. Данные выражаются как отношение сигналов, соответствующих

свободному красителю и связанному с ионизированными ионами кальция. Чаще всего в качестве кальциевых зондов используются красители Indo-1 и Fluo-3.

Применение. Применение проточной цитометрии стало обычным в самых различных областях современной биологии.

Иммунология. Иммунофенотипирование. Наиболее широко распространенное практическое использование проточной цитометрии – иммунофенотипирование. Оно базируется на уникальной способности проточной цитометрии анализировать смешанные клеточные популяции по многим параметрам одновременно. В простейшей форме эксперимент по фенотипированию проводится на клетках, меченных конъюгированными флуорохромами антителами, мишенью которых являются антигены на клеточной поверхности. Большинство этих антигенов обозначаются как «кластеры дифференцировки» (CD) с определенным номером, присвоенным на рабочем совещании по дифференцировке лейкоцитов человека (Human Leukocyte Differentiation Workshops). Поэтому для обозначения моноклональных антител используется общая номенклатура. Например, CD3 – это кластер дифференцировки под номером 3. Он используется для определения ко-рецепторов, которые присутствуют во всех Т-клетках. Большинство иммунных клеток характеризуется специфическими CD-маркерами. Эти клеточные маркеры, называемые родословными (lineage), характеризуют специфические клеточные популяции, что является необходимым условием для проведения любого иммунофенотипического эксперимента. Так, Т-клетки характеризуются маркерами CD3, CD4, CD8; В-клетки – CD19 и CD20; моноциты – CD14 и CD11b; натуральные киллеры – CD56 и CD161. Дополнительно к родословным маркерам для характеристики популяции клеток используются и другие маркеры. Среди них нужно отметить маркеры активации CD69, CD25, CD62L, маркеры памяти CD45RO, CD27, маркеры клеточного хоуминга $\alpha 4/\beta 7$, маркеры хемокиновых рецепторов CCR7, CCR5, CXCR4, CCR6. Часто при иммунофенотипировании используются внутриклеточные маркеры. Маркер FoxP3 свойственен регуляторным Т-клеткам (T_{reg}), цитокины IFN- γ , TNF- α и IL-2 характерны для Т-хелперов первого типа (T_H1). Объектами изучения часто являются маркер пролиферации Ki67, а также антиген-специфические маркеры (технология тетрамеров главного комплекса гистосовместимости, МНС Tetramers) [16].

Последние проточные цитометры и имеющиеся в распоряжении исследователей необходимые для них реактивы дают возможность подбирать панели антител, позволяющие определять одновременно до 15 и более клеточных маркеров.

Большой массив данных по CD-маркированию накоплен в области изучения мезенхимальных стволовых клеток (МСК). На их поверхности зафиксированы CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 маркеры [17, 18]. Как правило, в противовес определяют содержание CD19, CD34, CD45 маркеров, которые характерны для гемопоэтических стволовых клеток, присутствующих в костном мозге и с позиции МСК являющихся примесными (рис. 4).

Антиген-специфические ответы. Антиген-специфические ответы наблюдаются при стимулировании клеток специфическими антигенами. Они проявляются благодаря образованию цитокинов, пролиферации, памяти или узнаванию антигенов МНС-мультимерами. Последние являются, по сути, смесью МНС-мономеров главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex), которые обычно биотилируются, а затем связываются с опорной структурой флуоресцирующего стрептовида на уровне групп антигена: 4 (тетрамер), 5 (пентамер), 10 (декстрамер). Эти МНС-мультимеры нагружаются антигенами выбора и затем связываются с Т-клетками, которые и узнают антиген, в результате чего определяется уровень ответа на специфический антиген [19]. Этот подход используется при разработке вакцин.

Анализ внутриклеточных цитокинов. Данный анализ включает в себя обработку клеток ингибиторами белкового транспорта (Brefeldin A или Monensin) в течение 2–12 ч. При этом цитокины, продуцируемые клетками, могут накапливаться внутри клеток, что способствует их лучшей детекции. Клетки можно стимулировать различными антигенами так же, как это делают пептиды вакцин. Вслед за ингибированием белкового транспорта клетки метят маркерами жизнеспособности и поверхностными маркерами, затем фиксируют и обрабатывают проникающими в клетки антителами против цитокинов.

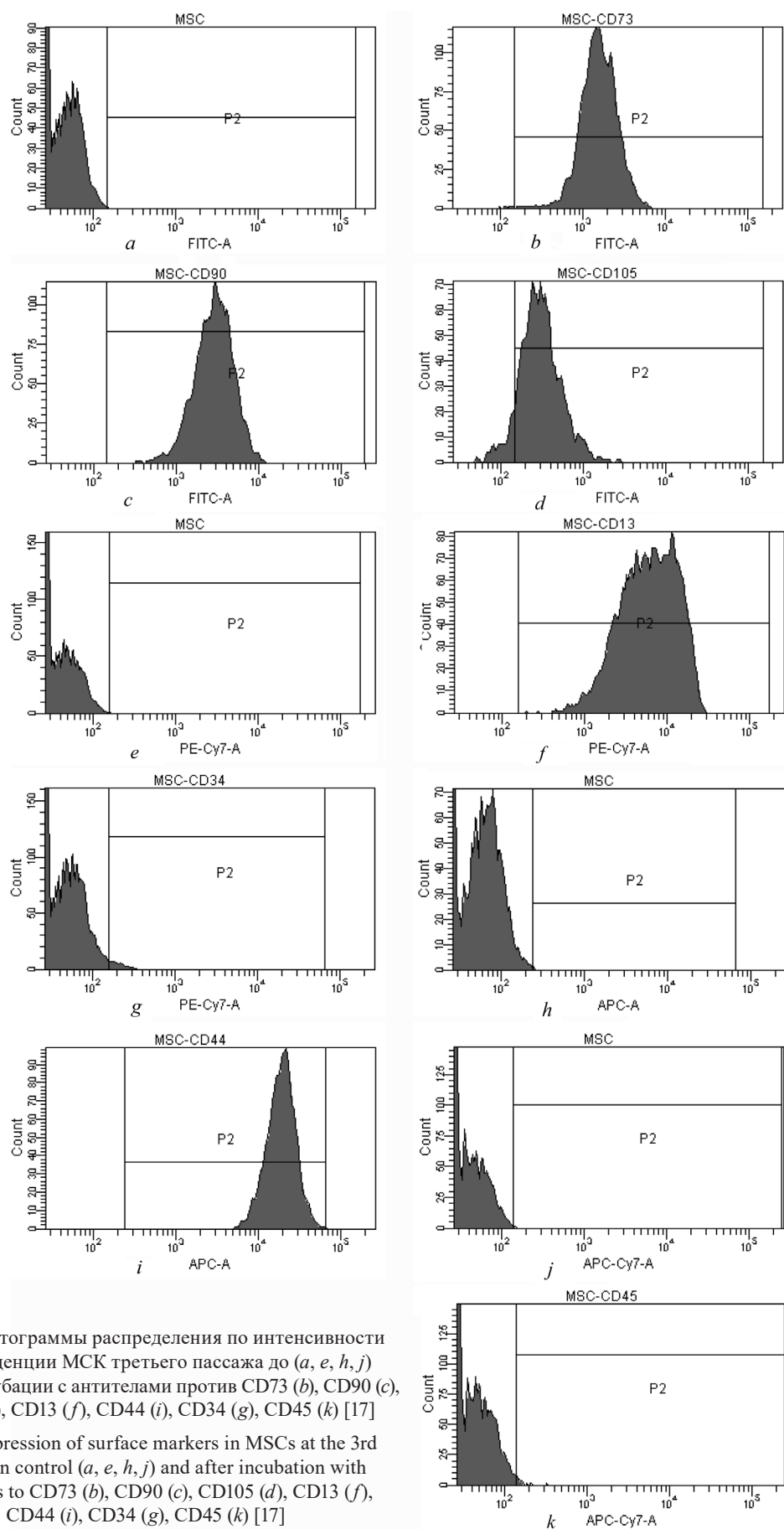


Рис. 4. Гистограммы распределения по интенсивности флуоресценции МСК третьего пассажа до (*a, e, h, j*) и после инкубации с антителами против CD73 (*b*), CD90 (*c*), CD105 (*d*), CD13 (*f*), CD44 (*i*), CD34 (*g*), CD45 (*k*) [17]

Fig. 4. Expression of surface markers in MSCs at the 3rd passage in control (*a, e, h, j*) and after incubation with antibodies to CD73 (*b*), CD90 (*c*), CD105 (*d*), CD13 (*f*), CD44 (*i*), CD34 (*g*), CD45 (*k*) [17]

Анализ пролиферации. Пролиферация клеток оценивается проточной цитометрией с помощью различных маркеров и методов. О пролиферативной активности клеток судят по включению в ДНК аналогов тимидина (BrdU), экспрессии связанных с пролиферацией антигенов (Ki67, PCNA), а для мониторинга поколений клеточного деления вводится перманентный краситель (CFSE). Для проведения проточной цитометрии применяют эквиваленты 3Н-тимидина – BrdU или EdU (этинилдезоксисуридин). Клеточные культуры инкубируются с данными соединениями в течение 2–6 ч, после чего клетки фиксируют и пермеабилзируют для определения инкорпорированного BrdU или EdU с использованием соответствующих антител. Определению BrdU предшествует обработка клеток ДНКазой (в случае EdU – ионами меди) с целью увеличения доступности антигенов для антител. В обоих методах применяется связывающийся с ДНК краситель иодид пропидия. Возможно также внутриклеточное окрашивание антителами других антигенов.

Экспрессия связанных с пролиферацией антигенов также может служить маркером пролиферации. Так, Ki67 экспрессируется в процессе пролиферации, но не на стадии покоя клеток. PCNA (ядерный антиген клеточной пролиферации) необходим для репликации ДНК. Наличие в системе Ki67 или PCNA является индикатором пролиферации [20]. CFSE и такие красители, как CellTrace Violet, Far Red, проникают через мембрану интактной клетки и ковалентно связываются с внутриклеточными соединениями, например аминами лизина. Дочерние клетки каждого последующего поколения «наследуют» краситель, но в меньшем количестве, что позволяет разделять поколения клеток по интенсивности флуоресценции зонда и в течение продолжительного времени отслеживать их пролиферацию [21, 22].

Анализ апоптоза. Апоптоз, или программируемая клеточная гибель, часто привлекает внимание исследователей, работающих в области клеточной биологии, биофизики и молекулярной биологии. Апоптоз поддерживает гомеостаз многих систем организма посредством направленного удаления из него клеток и контролирует воспалительные процессы в организме (некроз). Вслед за иммунным ответом по механизму апоптоза в организме погибают клонированные Т-клетки, автореактивированные В-клетки, а кроме того, имеют место и другие события в иммунной системе.

Многие из этих процессов можно детектировать с помощью проточной цитометрии. Для определения в культуре МСК доли апоптозных и некротических клеток широко используются ДНК-связывающиеся красители в сочетании с флуоресцентными зондами (флуоресцеин диацетат, кальцеин ацетоксиметил), способными накапливаться в клетках вследствие их гидролиза внутриклеточными эстеразами [7, 17]. Данный подход отличается простотой выполнения и хорошей воспроизводимостью результата.

Повреждение плазматической мембраны клетки опосредуется аннексином V, представляющим собой белок, который связывает фосфолипид фосфатидилсерин. При апоптозе происходит его транслокация на наружный слой бислойной фосфолипидной мембраны. Для определения наружного аннексина V окрашивание антителами против этого белка осуществляют в сочетании с окрашиванием проидиум иодидом. Разрушение ДНК эндонуклеазами в процессе апоптоза детектируется с помощью так называемого метода TUNEL (TdT, dUTP Nick End Labeling), который основан на способности терминальной дезоксиуклеотидтрансферазы (TdT) метить концевые участки разрывов ДНК дезоксиуридином (dUTP) или BrdU. В свою очередь dUTP или BrdU перед считыванием данных с проточного цитометра окрашиваются меченными флуорохромами антителами. Конденсация хроматина в ядре исследуется с помощью красителя Hoechst 33342. Сигнальный путь каспаз в большинстве случаев активируется путем апоптоза. Этот процесс можно регистрировать с помощью внутриклеточного прокрашивания антителами, специфичными к активным формам каспазы-3. Кроме того, активность каспаз можно оценивать с использованием флуорогенного субстрата фермента, после деградации которого появляется флуоресценция. Многие методы проточной цитометрии направлены на регистрацию митохондриального апоптоза. Большинство таких методов связано с измерением мембранного потенциала митохондрий с помощью красителя JC-1. Также можно использовать антитело против белка APO2.7, который локализован на митохондриальной мембране и экспрессируется в ходе апоптоза [23].

Молекулярная биология. *Анализ флуоресцентных белков.* Флуоресцентные белки (GFP, mCherry, YFP, mRuby) используются как маркеры белковой экспрессии. Обычно наряду с флуоресцентным

белком при трансфекции в клетку вводится генетическая конструкция, содержащая промотор и нуклеотидную последовательность интересующего гена. При этом экспрессия флуоресцентного белка рассматривается в качестве индикатора экспрессии этого гена.

Недавно в проточной цитометрии стали использовать методы, основанные на экспрессии в клетках нефлуоресцирующих фрагментов флуоресцентных белков, присоединенных к другим белкам (bimolecular fluorescence complementation (BiFC), trimolecular fluorescence complementation (TriFC)). Фрагменты комплементарны, и при их объединении восстанавливается интактная структура флуоресцентного белка. Данный подход позволяет изучать РНК-белок и белок-белковые взаимодействия непосредственно в живых клетках [24]. Эта технология нашла применение при решении разных задач, например, таких, как передвижение трансплантируемых клеток *in vivo*, механизмы бактериальной или вирусной инфекции и нокаут генов.

Анализ клеточного цикла. Анализ клеточного цикла включает окрашивание ДНК насыщенными концентрациями красителей, связываемых ДНК. В большинстве случаев клетки фиксируются 70 %-ным этанолом, который увеличивает проницаемость плазматической мембраны, и окрашиваются красителем (иодид пропидия, 7-AAD, DAPI). Однако имеются красители (Hoescht 33342), которые входят в живую клетку, окрашивая ДНК, но не причиняя ей вреда. В ходе этого анализа образцы пропускают через проточный цитометр при низкой скорости потока при условии линейной амплификации сигнала, после чего данные анализируют с помощью вычислительной техники.

Проточная цитометрия и сигнальная трансдукция. Данное применение проточной цитометрии предполагает использование антител против фосфорилированных сигнальных молекул. Такой подход при окрашивании панели участников процесса трансдукции позволяет исследовать эти процессы в смешанных популяциях клеток.

Проточная цитометрия РНК. Проточная цитометрия РНК основывается на комбинации проточной цитометрии с флуоресцентной гибридизацией (FISH) с целью оценки экспрессии РНК и белков. Следует отметить, что при использовании этого метода большую роль играет оптимизация температурного режима прокрашивания, так как структура не всех красителей способна выдерживать инкубацию в течение 1 ч при температуре 40 °С. Этот метод может применяться, когда нет антител, необходимых для проведения экспериментов.

Сортинг клеток. Для сортировки клеток используются специально приспособленные проточные цитометры, способные разделять и очищать клетки или частицы (см. рис. 3). Важно отметить, что отсепарированы могут быть любые клетки или частицы, обладающие флуоресценцией. Современные сортеры позволяют разделять клетки непосредственно в 96- или 384-луночные планшеты. Особым видом объекта сортировки являются трансфицированные клетки, экспрессирующие флуоресцентные белки, стволовые клетки, опухолевые клетки и форменные элементы белой крови. Следует отметить также важность оптимизации концентрации антител в образце для избирательного окрашивания целевых клеток в большом клеточном массиве.

Другие области применения. Абсолютный подсчет клеток. При любом иммунофенотипическом эксперименте можно подсчитать количество исследуемых клеток. Для этого в ходе измерения используется шаблон – суспензия микросфер известной концентрации, близкой к концентрации клеток в образце. В конечном счете, сравнивая полученные результаты, можно определить точное количество клеток в 1 мл образца.

Количественная проточная цитометрия. В количественной проточной цитометрии также используются шаблоны с известным количеством флуоресцирующего объекта для построения кривой прокрашивания образца. Клетки исследуются в том же режиме, что и шаблон. В зависимости от системы шаблона полученные результаты могут быть представлены как количество связанных клетками антител на единицу объема образца (Antibody Binding Capacity, ABC), активность связанного антитела (Antibodies Bound per Cell, ABC) или количества молекул растворимого флуорохрома (Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome, MESF). Наилучшим образом для этого подходит флуорохром PE, который из-за своего размера всегда связан с антителом в соотношении 1:1. Параметр MESF служит для конверсии относительной интенсивности флуоресценции в число флуоресцирующих молекул.

Исследование фагоцитоза. Используя маркированные флуорохромами биологические частицы, например бактерии, с помощью проточного цитометра можно зарегистрировать их фагоцитоз.

Бактерии метят чувствительным к изменению pH красителем, который флуоресцирует при низких значениях pH фагосом, свидетельствуя о том, что фагоцитоз произошел.

Анализ малых частиц. С помощью высокочувствительных проточных цитометров можно детектировать и сортировать экзосомы и другие субмикронные частицы клетки. Анализ экзосом, вирусов и других субклеточных частиц открывает новые перспективы в различных направлениях биологической науки, включая клеточную биологию, терапию опухолей и вирусологию. В настоящее время эти подходы бурно развиваются [25].

Анализ результатов. Стандарт проточной цитометрии 3:1 FCS. Данный стандарт был разработан в 1984 г. для того, чтобы привести в соответствие друг с другом самые различные результаты измерений, проведенных с помощью проточной цитометрии. Все файлы, содержащие результаты этих измерений, имеют расширение “.fcs”, что позволяет анализировать их на любом проточном цитометре.

Общепринятый анализ результатов проточной цитометрии. Данный анализ заключается в получении рисунка, описывающего окружение популяции (gating) и параметры, вытекающие из этих измерений. Это позволяет выделить специфические параметры клеток, необходимые для привлечения к эксперименту других маркеров. Например, хелпер Т-клеток может определяться по экспрессии CD3⁺ и CD4⁺, затем анализируются так называемые маркеры активации CD25 (IL-2R α), а также образование IFN- γ цитокина. Многие коммерческие компании предлагают программное обеспечение для обработки данных проточной цитометрии. Наиболее популярными программами являются FlowJo, FCS Express, WinList, Kaluza и WinMDI.

Анализ клеточного цикла. Программное обеспечение цитометра позволяет моделировать процесс клеточного цикла, определять фазу цикла и представлять полученные данные в виде гистограмм. Этот вид анализа хорошо обеспечивается программой ModFit LT. Кроме того, анализ клеточного цикла возможен и программой FlowJo.

Анализ многомерных данных. Данный анализ, использующий 14 и более параметров на базе традиционной канальной стратегии, является громоздким и занимает много времени. При этом могут потеряться интересные популяции клеток, так как необходимое соотношение маркеров в образце часто очень трудно определить. Для решения этой проблемы предлагаются новые инструменты, например метод SPADE (spanning-tree progress ion analysis).

Список использованных источников

1. Shapiro, H. M. Practical flow cytometry. 4th ed. / H. M. Shapiro. – New York : Wiley-Liss, 2003. – 681 p.
2. Хайдуков, С. В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине / С. В. Хайдуков, А. В. Зурочка // Мед. иммунология. – 2007. – Т. 9, № 4–5. – С. 373–378.
3. McKinnon, K. M. Flow cytometry : an overview / K. M. McKinnon // Curr. Prot. Immunol. – 2018. – Vol. 120. – P. 5.1.1–5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
4. Pranab, D. Diagnostic flow cytometry in cytology / D. Pranab. – New York : Springer, 2021. – 194 p.
5. Barteneva, N. S. Imaging flow cytometry: coping with heterogeneity in biological systems / N. S. Barteneva, E. Fasler-Kan, I. A. Vorobjev // J. Histochem. Cytochem. – 2012. – Vol. 60, N 10. – P. 723–733. <https://doi.org/10.1369/0022155412453052>
6. Multiplex analysis of cytokines in exhaled breath condensate / U. Sack [et al.] // Cytometry. – 2006. – Vol. 69, N 3. – P. 169–172. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20231>
7. Пинчук, С. В. Влияние ростовых факторов на некроз и апоптоз мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при окислительном воздействии трет-бутилгидропероксида *in vitro* / С. В. Пинчук, Е. С. Лобанок, И. Д. Волотовский // Докл. НАН Беларуси. – 2013. – Т. 57, № 2. – С. 79–83.
8. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service / J. Luider [et al.] // Lab. Hematol. – 2004. – Vol. 10. – P. 102–108. <https://doi.org/10.1532/LH96.04121>
9. Claude, L. Enumeration of peripheral lymphocyte subsets using 6 vs. 4 color staining: a clinical evaluation of new flow cytometer / L. Claude, C. Lobagiu, C. Genin // Cytometry, Part B. – 2005. – Vol. 70, N 1. – P. 29–38. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20072>
10. Leipold, M. D. Multiparameter phenotyping of human PBMCs using mass cytometry / M. D. Leipold, E. W. Newell, H. T. Maecker // Meth. Mol. Biol. – 2015. – Vol. 1343. – P. 81–95. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2963-4_7
11. Mei, H. E. Platinum-conjugated antibodies for application in mass cytometry / H. E. Mei, M. D. Leipold, H. T. Maecker // Cytometry, Part A. – 2016. – Vol. 89, N 3. – P. 292–300. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22778>
12. Tsien, R. Y. Green fluorescent protein / R. Y. Tsien // Ann. Rev. Biochem. – 1998. – Vol. 67. – P. 509–544. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>
13. Matz, M. V. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species / M. V. Matz [et al.] // Nat. Biotechnol. – 1999. – Vol. 17, N 10. – P. 969–973. <https://doi.org/10.1038/13657>

14. Day, R. N. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging / R. N. Day, M. W. Davidson // *Chem. Soc. Rev.* – 2009. – Vol. 38, N 10. – P. 2887–2921. <https://doi.org/10.1039/b901966a>
15. Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry / S. P. Perfetto [et al.] // *J. Immunol. Meth.* – 2006. – Vol. 313, N 1–2. – P. 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.04.007>
16. He, X. H. Procedure for preparing peptide-major histocompatibility complex tetramers for direct quantification of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes / X. H. He, L. H. Xu, Y. Liu // *World J. Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11. – P. 4180–4187. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i27.4180>
17. The effect of quercetin on hepatic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells / S. V. Pinchuk [et al.] // *Cell Tiss. Biol.* – 2016. – Vol. 10. – P. 357–364. <https://doi.org/10.1134/S1990519X16050102>
18. Immunophenotyping and transcriptional profiling of *in vitro* cultured human adipose tissue derived stem cells / A. Mieczkowska [et al.] // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, N 1. – P. 11339. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29477-5>
19. Dolton, G. More tricks with tetramers: a practical guide to staining T cells with peptide-MHC multimers / G. Dolton // *Immunology.* – 2015. – Vol. 146, N 1. – P. 11–22. <https://doi.org/10.1111/imm.12499>
20. Landberg, G. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation / G. Landberg, G. Roos // *Cell Prolif.* – 1993. – Vol. 26, N 5. – P. 427–431. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1993.tb00130.x>
21. Use of CFDA-SE for evaluating the *in vitro* proliferation pattern of human mesenchymal stem cells / S. Urbani [et al.] // *Cytotherapy.* – 2006. – Vol. 8, N 3. – P. 243–253. <https://doi.org/10.1080/14653240600735834>
22. Monitoring cell proliferation by dye dilution: considerations for probe selection / J. D. Tario [et al.] // *Meth. Mol. Biol.* – 2018. – Vol. 1678. – P. 249–299. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7346-0_12
23. Monitoring early cellular responses in apoptosis is aided by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO2.7 / S. K. Koester [et al.] // *Cytometry.* – 1997. – Vol. 29, N 4. – P. 306–312. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19971201\)29:4<306::AID-CYTO7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19971201)29:4<306::AID-CYTO7>3.0.CO;2-7)
24. *In vivo* imaging of protein-protein and RNA-protein interactions using novel far-red fluorescence complementation systems / Y. Han [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2014. – Vol. 42, N 13. – P. e103. <https://doi.org/10.1093/nar/gku408>
25. Employing flow cytometry to extracellular vesicles sample microvolume analysis and quality control / J. Maia [et al.] // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2020. – Vol. 8. – Art. 593750. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593750>

References

1. Shapiro H. M. *Practical flow cytometry*. 4th ed. New York, Wiley-Liss, 2003. 681 p.
2. Khaidukov S. V., Zurochka A. V. Flow cytometry as a modern analytical tool in biology and medicine. *Meditsinskaya immunologiya* [Medical immunology], 2007, vol. 9, no. 4–5, pp. 373–378 (in Russian).
3. McKinnon K. M. Flow cytometry : an overview. *Current Protocols in Immunology*, 2018, vol. 120, no. 5.1.1–5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
4. Pranab D. *Diagnostic flow cytometry in cytology*. New York, Springer Publ., 2021. 194 p.
5. Barteneva N. S., Fasler-Kan E., Vorobjev I. A. Imaging flow cytometry: coping with heterogeneity in biological systems. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2012, vol. 60, no. 10, pp. 723–733. <https://doi.org/10.1369/0022155412453052>
6. Sack U., Scheibe R., Wotzel M., Hammerschmidt S., Kuhn H., Emmrich F., Hoheisel G., Wirtz H., Gessner C. Multiplex analysis of cytokines in exhaled breath condensate. *Cytometry*, 2006, vol. 69, no. 3, pp. 169–172. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20231>
7. Pinchuk S. V., Lobanok E. S., Volotovskii I. D. Influence of growth factors on the necrosis and apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells under the oxidative action of tert-butyl-hydroperoxide *in vitro*. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus], 2013, vol. 57, no. 2, pp. 79–83 (in Russian).
8. Luider J., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service. *Laboratory Hematology*, 2004, vol. 10, pp. 102–108. <https://doi.org/10.1532/LH96.04121>
9. Claude L., Lobagiu C., Genin C. Enumeration of peripheral lymphocyte subsets using 6 vs. 4 color staining: a clinical evaluation of new flow cytometer. *Cytometry, Part B*, 2005, vol. 70, no. 1, pp. 29–38. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20072>
10. Leipold M. D., Newell E. W., Maecker H. T. Multiparameter phenotyping of human PBMCs using mass cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 2015, vol. 1343, pp. 81–95. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2963-4_7
11. Mei H. E., Leipold M. D., Maecker H. T. Platinum-conjugated antibodies for application in mass cytometry. *Cytometry, Part A*, 2016, vol. 89, no. 3, pp. 292–300. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22778>
12. Tsien R. Y. Green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 1998, vol. 67, pp. 509–544. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>
13. Matz M. V., Fradkov A. F., Labas Y. A., Savitsky A. P., Zaraisky A. G., Markelov M. L., Lukyanov S. A. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology*, 1999, vol. 17, no. 10, pp. 969–973. <https://doi.org/10.1038/13657>
14. Day R. N., Davidson M. W. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society Reviews*, 2009, vol. 38, no. 10, pp. 2887–2921. <https://doi.org/10.1039/b901966a>
15. Perfetto S. P., Chattopadhyay P. K., Lamoreaux L., Nguyen R., Ambrozak D., Koup R. A., Roederer M. Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 2006, vol. 313, no. 1–2, pp. 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.04.007>

16. He X. H., Xu L. H., Liu Y. Procedure for preparing peptide-major histocompatibility complex tetramers for direct quantification of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *World Journal of Gastroenterology*, 2005, vol. 11, pp. 4180–4187. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i27.4180>
17. Pinchuk S. V., Vasilevich I. B., Kvacheva Z. B., Volotovskii I. D. The effect of quercetin on hepatic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cell and Tissue Biology*, 2016, vol. 10, pp. 357–364. <https://doi.org/10.1134/S1990519X16050102>
18. Mieczkowska A., Schumacher A., Filipowicz N., Wardowska A., Zieliński M., Madanecki P. [et al.]. Immunophenotyping and transcriptional profiling of *in vitro* cultured human adipose tissue derived stem cells. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, no. 1, p. 11339. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29477-5>
19. Dolton G., Tungatt K., Lloyd A., Bianchi V., Theaker S. M., Trimby A. [et al.]. More tricks with tetramers: a practical guide to staining T cells with peptide-MHC multimers. *Immunology*, 2015, vol. 146, no. 1, pp. 11–22.
20. Landberg G., Roos G. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation. *Cell Proliferation*, 1993, vol. 26, no. 5, pp. 427–431. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1993.tb00130.x>
21. Urbani S., Caporale R., Lombardini L., Bosi A., Saccardi R. Use of CFDA-SE for evaluating the *in vitro* proliferation pattern of human mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 2006, vol. 8, no. 3, pp. 243–253. <https://doi.org/10.1080/14653240600735834>
22. Tario J. D., Conway A. N., Muirhead K. A., Wallace P. K. Monitoring cell proliferation by dye dilution: considerations for probe selection. *Methods in Molecular Biology*, 2018, vol. 1678, pp. 249–299. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7346-0_12
23. Koester S. K., Roth P., Mikulka W. R., Schlossman S. F., Zhang C., Bolton W. E. Monitoring early cellular responses in apoptosis is aided by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO2.7. *Cytometry*, 1997, vol. 29, no. 4, pp. 306–312. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19971201\)29:4<306::AID-CYTO7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19971201)29:4<306::AID-CYTO7>3.0.CO;2-7)
24. Han Y., Wang S., Zhang Z., Ma X., Li W., Zhang X., Deng J., Wei H., Li Z., Zhang X-E., Cui Z. *In vivo* imaging of protein-protein and RNA-protein interactions using novel far-red fluorescence complementation systems. *Nucleic Acids Research*, 2014, vol. 42, no. 13, p. e103. <https://doi.org/10.1093/nar/gku408>
25. Maia J., Batista S., Couto N., Gregório A. C., Bodo C., Elzanowska J., Moraes M. C. S., Costa-Silva B. Employing flow cytometry to extracellular vesicles sample microvolume analysis and quality control. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, vol. 8, art. 593750. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593750>

Информация об авторах

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: volotovskii@yahoo.com

Пинчук Сергей Владимирович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: pinchuksv@mail.ru

Information about the authors

Igor D. Volotovskii – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volotovskii@yahoo.com

Sergei V. Pinchuk – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pinchuksv@mail.ru