

# ВИЗУАЛИЗИРУЮЩАЯ ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ ДЛЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК: 576.08:57.083

**Аннотация.** Представлены основные сведения о визуализирующей проточной цитометрии (ВПЦ), ее отличия от традиционной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии. Изложены принципы данного метода, его возможности в анализе клеток, микроорганизмов и микрочастиц, области применения, описано устройство приборов, процессы учета и анализа данных.

**Ключевые слова:** визуализирующая проточная цитометрия, проточная цитометрия, иммунология, клеточная биология, флуоресценция.

**Для цитирования:** Гончаров. А. Визуализирующая проточная цитометрия для медико-биологических исследований // Наука и инновации. 2022. №4. С. 71-78. <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2022-4-71-78>



**Андрей Гончаров,**  
директор Института биофизики  
и клеточной инженерии  
НАН Беларуси, кандидат  
медицинских наук, доцент;  
[andrei.hancharou@gmail.com](mailto:andrei.hancharou@gmail.com)

Типичные проточные цитометры включают несколько подсистем: жидкостную, оптическую, электронную. Задача первой – обеспечение постоянного стабильного потока исследуемых клеток или частиц через проточную ячейку (кювету, камеру). Проточная ячейка – «сердце» цитометра – представляет собой устройство с ключевым элементом – тонким капилляром из оптически прозрачного материала. Через него непрерывным потоком подаются исследуемые клетки, на которых фокусируются лучи лазеров. Стабильность потока достигается за счет принципа гидродинамического фокусирования, суть которого состоит во впрыскивании клеточной суспензии в быстрый поток «обжимающей» проточной жидкости. Оптическая подсистема состоит из лазеров и таких их элементов, как фокусирующие линзы, призмы, интерференционные фильтры. Рассеянный клетками свет лазеров разделяется на спектральные составляющие. Электронная подсистема включает датчики светорассеяния и флуоресценции (в качестве которых выступают фотоумножители или фотодиоды), усилители и преобразователи сигнала, передающие информацию о характеристиках клетки в рабочую станцию и программное обеспечение [3].

Анализируемые параметры в рутинной ПЦ – это прямое (отражающее размеры клетки) и боковое

**П**роточная цитометрия (ПЦ) уверенно заняла одну из лидирующих позиций в арсенале специалистов в области клеточной биологии и иммунологии [1–2]. ПЦ позволяет анализировать суспензии клеток и различных частиц в потоке, при этом скорость учета современных приборов достигает 100 тыс. событий в секунду в идеальных условиях. Метод обеспечивает регистрацию сигналов светорассеяния и флуоресценции от каждой клетки. С помощью современных цитометров можно эффективно фиксировать свечение до 30–40 флуорохромов одновременно [1].

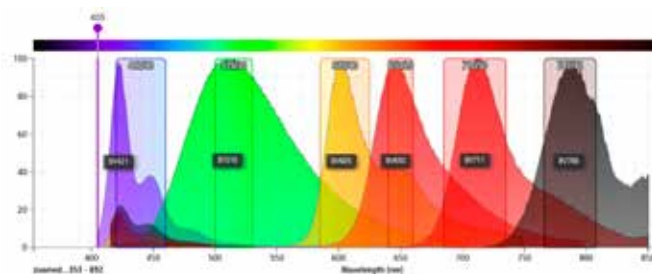


Рис. 1. Спектры флуоресценции синтетических красителей линейки BD Horizon Brilliant™ Violet, возбуждаемых фиолетовым (405 нм) лазером. Показаны 6 каналов флуоресценции

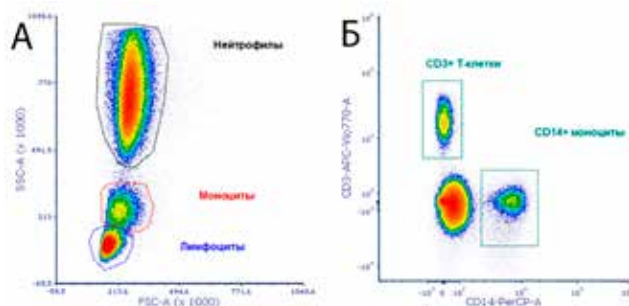


Рис. 2. Представление данных в классической ПЦ

светорассеяние (неоднородность структуры), а также интенсивность флуоресценции.

За счет разделения спектра излучения от каждой клетки на спектральные диапазоны (каналы флуоресценции) возможен одновременный учет свечения множества красителей, возбуждаемых одним лазером (рис. 1) [4].

Представление данных в ПЦ, как правило, осуществляется в виде двухмерной цитограммы (рис. 2). График в координатах прямого (FCS) и бокового (SSC) светорассеяния (рис. 2А) отражает сразу 2 характеристики клеток – размер и гранулярность. На данном примере цитограммы светорассеяния клеток крови видно, что лимфоциты (небольшие клетки с крупным округлым ядром) демонстрируют наименьшие значения как бокового, так и прямого светорассеяния. Моноциты – более крупные клетки, имеющие ядро бобовидной формы, характеризуются возросшими значениями данных показателей. Наконец, нейтрофилы, имеющие сегментированное ядро и многочисленные цитоплазматические гранулы, по боковому светорассеянию значительно отличаются в большую сторону от других клеток крови. Предварительная инкубация клеток с антителами к специфическим маркерам дает возможность их точной дифференцировки на субпопуляции, например, моноцитов, экспрессирующих молекулу CD14, или CD3+ Т-лимфоцитов (рис. 2Б).

Таким образом, ПЦ позволяет получить значительное количество информации с сотен тысяч и миллионов клеток, но не дает возможности их визуализировать. В то же время традиционная микроскопия, флуоресцентная или даже конфокальная, несмотря на высокую разрешающую способность, имеет ряд существенных ограничений, которые заключаются прежде всего в невозможности анализа большого количества событий, отсутствии спектральной компенсации между каналами. В свою очередь, небольшое число анализируемых объектов не позволяет фиксировать редкие явления и минорные субпопуляции клеток.

Регистрация параметров светорассеяния и флуоресценции достигается в обычных ПЦ при помощи фотоумножителей или фотодиодов, в визуализирующих проточных цитофлуориметрах (ВПЦ) учет событий происходит при помощи высокочувствительной камеры (рис. 3).

Соответственно, помимо параметров светорассеяния и интенсивности флуоресценции, визуализирующая проточная цитометрия позволяет получать высококачественные изображения клеток. В этом и состоит ключевое ее отличие от традиционной ПЦ, при этом разрешение изображений достигает такого уровня (0,33 мкм/пиксель), что данный метод можно с полным правом называть микроскопией клеток в потоке. Кроме того, ВПЦ характеризуется более высокой чувствительностью, чем у традиционных проточных систем [5–6].

Таким образом, ВПЦ – это высокоэффективная комбинация флуоресцентного микроскопа и проточного цитометра, позволяющая исследовать события и явления, которые невозможно изучить только при помощи проточной цитометрии или микроскопии, и представляет собой фактически идеальный инструмент для исследований в области клеточной биологии, иммунологии, онкогематологии, вирусологии и смежных дисциплин.

Рассмотрим технические особенности визуализирующих проточных систем, представленных на мировом рынке. В настоящее время лидирующие позиции занимает компания Luminex (США) с приборами Amnis® ImageStream® X Mk II и Amnis® FlowSight®. Первые ВПЦ компании представлены в 2005 г. и постоянно совершенствуются.

Объем образца с исследуемыми объектами – клетками или частицами – от 20 до 200 мкл. При этом сам образец должен быть достаточно сконцентрирован, рекомендуемое содержание – от 10 млн клеток на мл, минимальный объем – 20 мкл при нулевом «мертвом» объеме, что выгодно отли-

чает ВПЦ от обычных цитометров. Из внутреннего резервуара образец перемещается в проточную ячейку, и при необходимости его можно вернуть в пробирку – функция, которая реализована в небольшом числе приборов для ПЦ. Диапазон регистрируемых размеров частиц и клеток весьма широк – от 0,05 до 120 мкм [5].

Скорость учета событий составляет от 200 до 4000 событий/сек и варьирует в зависимости от выбранной скорости и увеличения. Тем не менее даже при максимальном увеличении 60× и низкой скорости система может зарегистрировать более 500–1000 тыс. событий в течение часа, чего достаточно для большинства применений.

Оптическая схема включает источники излучения, проточную ячейку, систему фокусирующих линз и оптических фильтров (рис. 3).

В приборах имеется классическая для проточных цитометров проточная ячейка. Поступающие в нее анализируемые клетки за счет принципа гидродинамического фокусирования выстраиваются в непрерывном потоке в ряд, одна клетка за другой. Они подсвечиваются светодиодами – источниками светопольного изображения и лазерами – источниками флуоресценции.

ВПЦ могут комплектоваться широким спектром лазеров – от ультрафиолетовых до дальне-красных. Стандартный набор включает фиолетовый (405 нм), синий (488 нм) и красный (642 нм) лазеры. Для возбуждения фикоэритрина и его тандемов в ВПЦ могут использоваться лазеры с длиной волны 561 нм и 592 нм. Система может быть укомплектована УФ-лазером с длиной волны 375 нм. Последний в подавляющем большинстве случаев можно с успехом заменить фиолетовым с длиной волны 405 нм. Как исключение – такие зонды, как филипин, красители линейки BD Horizon Brilliant™ UltraViolet. Важно отметить, что каналы Ch11 и Ch12 «делят» между собой излучение от флуорохромов, возбужденных при помощи красного и фиолетового лазеров. Соответственно, одновременный учет таких красителей, как APC–Cy7 и, к примеру, BV750, невозможен.

Обязательный компонент визуализирующего цитометра – инфракрасный лазер (ИК) (стандарт-

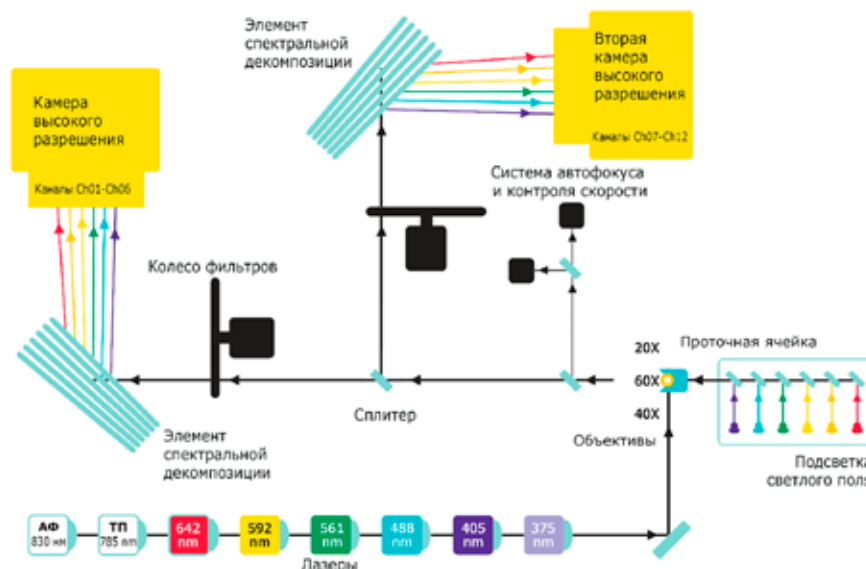


Рис. 3. Оптическая схема визуализирующих проточного цитометра Amnis® ImageStream®X Mk II

ная комплектация 785 нм) [5, 7]. Его использование позволяет получить информацию о неоднородности структуры клеток за счет свечения внутриклеточных органелл в ИК-диапазоне. Параметр интенсивности флуоресценции по данному каналу как аналог темнопольной (ТП) микроскопии во многом аналогичен параметру бокового светорассеяния традиционных проточных цитометров и используется с этой же целью. При этом обилие морфологических параметров позволяет в большинстве экспериментов обходиться без данного показателя, а с помощью освободившегося канала регистрировать флуоресценцию красителей, имеющих спектры излучения в ИК-диапазоне. Несмотря на техническую возможность применять ИК-лазер для возбуждения флуорохромов со спектром поглощения в ИК-диапазоне (например, Alexa 790), спектральные особенности фильтра на канале Ch12 не позволяют осуществлять детекцию флуоресценции эффективно.

В некоторых визуализирующих цитометрах также установлен лазер с длиной волны 830 нм, который служит для детекции частиц, добавляемых в образец с целью постоянной коррекции скорости потока анализируемых объектов и автофокусировки.

Пройдя проточную ячейку, свет направляется в объектив. Его наличие – особенность ВПЦ, связанная с необходимостью регистрации высококачественных изображений клеток. В ВПЦ может быть установлено от 1 до 3 объективов с разными увеличениями: 20×, 40× и 60×. С учетом размеров

клеток и сложностью обеспечения их фиксированного потока имеется возможность перемещения объективов в автоматическом или ручном режимах по двум осям: X – центровка на середине потока клеток и Z – фокусировка на объектах [5].

После объектива свет поступает через серию фокусирующих линз и оптических фильтров на так называемый элемент спектрального разложения (декомпозиции). Сигналы разных спектральных диапазонов выходят из элемента спектрального разложения под разными углами таким образом, что каждый сигнал физически направляется на одну из 6–12 позиций на матрице камеры (в зависимости от модели прибора).

**Система детекции визуализирующих цитометров производства компании LumineX**, в отличие от стандартных цитометров, – высокочувствительная ПЗС-матрица. Ее минимальное разрешение составляет 0,3 мкм/пиксель. Системы ВПЦ оснащены одной или двумя ПЗС-камерами на 256 рядов пикселей. Каждый из них регистрирует интенсивность флуоресценции в 12-битном режиме, что составляет 4096 градаций яркости [5].

В результате каждый снимок клетки разбивается на 6–12 отдельных спектральных изображений, записываемых ПЗС-детектором параллельно, – так называемых каналов матрицы.

Следует отметить, что скорость и чувствительность анализа обратно зависимы. При переключении фиксированной скорости учета с низкой на среднюю и высокую выполняется так называемая бинари-

зация рядов пикселей матрицы камеры (2 и 4 ряда пикселей соответственно) с последующей деконволюцией изображения, что приводит к снижению его качества. Таким образом, наиболее качественные снимки получаются на низкой скорости учета.

Технические особенности учета событий в ВПЦ также проявляются в отсутствии важной функции всех проточных цитометров – порога учета событий по каналам. В результате любой «мусор» – клеточный детрит, везикулы, микроорганизмы (если их учет не является целью эксперимента) и прочее – учитываются и отображаются как событие. В этой связи к пробоподготовке клеток для учета на визуализирующих цитометрах предъявляются высокие требования, касающиеся чистоты образца.

Поскольку в ВПЦ отсутствуют в качестве детектирующих элементов фотоумножители и фотодиоды, нет также и настроек напряжения или усиления на каналах флуоресценции. Коррекция интенсивности флуоресценции осуществляется лишь посредством изменения мощности лазеров с точностью до одной сотой ватта. Соответственно, изменение мощности лазера, например синего, изменит интенсивность свечения всех флуорохромов, возбуждаемых синим лазером – FITC на 2-м канале, PE на 3-м, PE-TexasRed на 4-м, PE-Cy5 на 5-м и PE-Cy7 на 6-м. Отсутствие в данном случае возможности регулировки свечения на отдельных каналах накладывает определенные ограничения в выборе флуорохромов и создает сложности при настройке компенсации.

В табл. 1 показана типичная схема визуализирующего цитометра с 3 лазерами и 12 каналами регистрации событий, представлены каналы детекции и наиболее часто используемые флуоресцентные красители.

Как и во всех современных проточных цитометрах, ВПЦ имеет возможность автоматизированной настройки спектральной компенсации. Визуализация ее результатов представлена в виде стандартной схемы с компенсационной матрицей. При учете компенсационных контролей отключаются каналы светлого и темного поля и учитывается флуоресценция по всем имеющимся каналам. Важно подчеркнуть, что ручная настройка или

| Канал            | 405 нм лазер           | 488 нм лазер              | 642 нм лазер               |
|------------------|------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Ch01 (457/45 нм) |                        |                           | светлое поле               |
| Ch02 (528/65 нм) | –                      | FITC/Alexa 488            | –                          |
| Ch03 (577/35 нм) | –                      | PE                        | –                          |
| Ch04 (610/30 нм) | –                      | PE-TexasRed               | –                          |
| Ch05 (702/85 нм) | –                      | PE-Cy5 / PerCP            | –                          |
| Ch06 (762/35 нм) | темное поле            | PE-Cy7<br>или темное поле | темное поле                |
| Ch07 (457/45 нм) | BV421 / Pacific Blue   | –                         | –                          |
| Ch08 (537/65 нм) | BV510 / AmCyan         | –                         | –                          |
| Ch09 (582/25 нм) | BV570 или светлое поле | светлое поле              | светлое поле               |
| Ch10 (610/30 нм) | BV605                  | –                         | –                          |
| Ch11 (702/85 нм) | BV711                  | –                         | APC                        |
| Ch12 (762/35 нм) | BV786                  | –                         | APC-Cy7<br>или темное поле |

Таблица 1. Каналы регистрации событий визуализирующего проточного цитометра с 3 лазерами

коррекция требует наличия исходного gif-файла, реализована достаточно неудобно и занимает много времени. Намного проще экспортировать данные в файл с расширением «fcs» и настраивать компенсацию в других программах для ПЦ, копируя полученные значения матрицы.

**Анализ данных.** Первичные «сырые» данные, полученные с прибора, записываются в файл с расширением «gif». С учетом того, что такой файл содержит изображения клеток по всем учитываемым каналам, его размеры достаточно велики: например, информация о 300 тыс. событий по 12 каналам занимает 7,5 Гб.

В процессе анализа данных выполняется попиксельное сканирование изображений, зафиксированных камерой. Параметры вычисляются на основе сведений об интенсивности сигнала и расположении пикселей в пределах матрицы.

Всего образуется до 86 параметров с 12 каналов [5]. Те из них, которые формируются в результате обработки изображений исследуемых объектов, могут быть разделены на следующие группы:

- *размер (в мкм): Area, Diameter, Major Axis, Minor Axis, Major Axis Intensity, Minor Axis Intensity, Perimeter, Thickness Max and Min, Spot Area Min, Width, Height, Length;*
- *форма: Aspect Ratio, Aspect Ratio Intensity, Circularity, Compactness, Elongatedness, Lobe Count, Shape Ratio, Symmetry 2, 3, 4;*
- *локализация (указываются координаты объекта по X- и Y-осям): Angle, Angle Intensity, CentroidX, CentroidY, CentroidX Intensity, CentroidY Intensity, Delta CentroidX, Delta CentroidY, Delta CentroidXY, Max Contour position, Spot Distance Min, Valley X, Valley Y;*
- *текстура (определяют локальные изменения интенсивности сигнала): Bright Detail Intensity R3, Bright Detail Intensity R7, Contrast, Gradient Max, Gradient RMS, Modulation, Spot Count, Std Dev, H-Contrast, H-Correlation, H-Energy, H-Entropy, H-Homogeneity, H-Variance;*
- *интенсивность сигнала (динамический диапазон анализа данных составляет 6 декад): BkgdMean, BkgdStdDev, Intensity, Raw Intensity, Raw Max Pixel, Raw Min Pixel, Raw Mean Pixel, Raw Median Pixel, Max Pixel, Min Pixel, Mean Pixel, Median Pixel, Saturation Count, Saturation Percent, Spot Intensity Min;*
- *параметры сравнения (определяют различия в интенсивности сигнала): Intensity Concentration Ratio, Internalization, Similarity, Bright Detail Similarity R3;*
- *системные параметры: Camera Line Number, Camera Timer, Flow Speed, Object Number, Objects per second, Objects per ml, Time.*

Применение параметров, характеризующих морфологию клетки, позволяет выявить самые редкие популяции последних по их размеру, форме, паттерну флуоресцентного сигнала. Но, пожалуй, самым важным является возможность визуализировать любую клетку или их группу. Это действенный способ для того, чтобы уточнить характер экспрессии любого антигена, определить даже в отсутствие специфических зондов мертвые и апоптотичные клетки, конгломераты клеток, что особенно важно при анализе и поиске редких популяций.

Применение морфологических параметров можно проиллюстрировать следующим примером анализа клеточных культур, который позволяет быстро идентифицировать одиночные клетки, их конгломераты и дебрис. Для этого события визуализируются на двухмерной цитограмме в координатах Area и Aspect ratio по светлосильному каналу. Первый параметр – Area – отражает площадь исследуемого объекта и является, пожалуй, самым информативным среди всех показателей, характеризующих размеры клетки. Второй – Aspect ratio – представляет собой соотношение большой и малой осей клетки. Таким образом, данный показатель будет стремиться к единице, если две оси объекта не имеют существенных различий, что справедливо для клеток округлой формы. Снижение значения до ~0,8 говорит о том, что исследуемый объект имеет вытянутую форму. События с данными ниже 0,6–0,7 почти всегда представляют собой конгломераты клеток.

На *рис. 4А* представлена цитограмма в координатах Area BF/Aspect ratio BF. Анализируется образец моноцитарных дендритных клеток, инкубированных с зондом 7-AAD и антителами к молекулам CD83 (PE) и CD209 (APC). Визуализируются единичные клетки (*рис. 4Г*), мелкие и очень крупные конгломераты (*рис. 4Б, 4Д*) и дебрис (*рис. 4В*).

Другим примером применения морфологических показателей может служить использование параметров Circularity (округлость) и Diameter (диаметр). Построение двухмерной цитограммы в этих координатах позволяет выделить клетки большого и малого диаметра и отдифференцировать их по форме (*рис. 5*).

**Применение ВПЦ.** ВПЦ – это исключительно информативный инструмент, применимый в следующих медико-биологических дисциплинах:

- *клеточной биологии в целом;*
- *иммунологии (экспрессия поверхностных, внутриклеточных и внутриядерных молекул, фагоцитоз, пиноцитоз, изменение формы клеток, формирование иммунных синапсов, аутофагия и др.);*

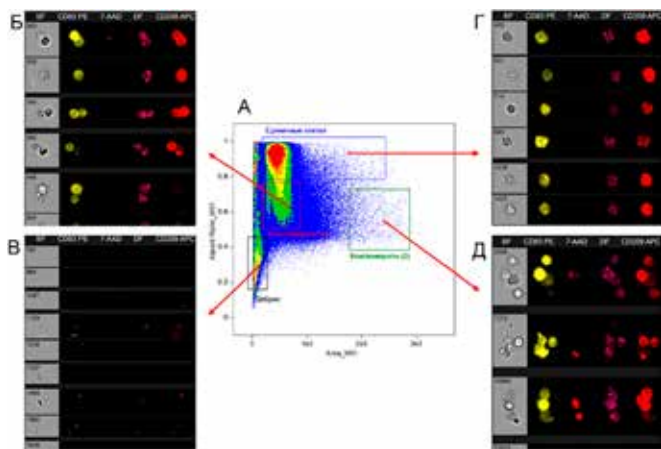


Рис. 4. Дискриминация единичных клеток, конгломератов и дебриса в ВПЦ. А – цитограмма в координатах Area и Aspect Ratio, Б – конгломераты клеток, В – дебрис, Г – единичные клетки, Д – конгломераты клеток

- аллергологии (исследования базофилов, тучных клеток, эозинофилов, врожденных лимфоидных клеток);
- онкологии (иммунофенотипирование злокачественных клеток, изучение их морфофункциональных свойств, апоптоз и некробиоз, вызванный лекарственными средствами, интернализация терапевтических антител, детекция циркулирующих опухолевых клеток);
- гематологии и онкогематологии (дифференциальный диагноз гемобластозов и лимфом, морфологический и иммунофенотипический анализ эритроцитов и тромбоцитов);
- микробиологии, паразитологии (визуализация микроорганизмов, в том числе внутриклеточных, исследование функционального состояния бактерий и дрожжей, экспрессии ими различных молекул);
- вирусологии (визуализация вирусов в клетках при помощи специфических антител или зондов, выявление жизненного цикла вируса: адгезия, проникновение в клетку, формирование и высвобождение вирусных частиц);
- альгологии (определение видовой принадлежности одноклеточных водорослей, исследование их морфофункционального состояния, качественный и количественный анализ флуоресцентных пигментов);
- нанотехнологиях и наномедицине (анализ микрочастиц и их взаимодействия с клетками);
- биохимии, токсикологии.

Методы исследования, реализуемые с применением ВПЦ, можно разделить следующим образом:

- определение экспрессии молекул, их локализации [10];

- визуализация внутриклеточных структур: эндосомы, лизосомы, митохондрии и др. [37];
- клеточная гибель: некробиоз, апоптоз [19], активация каспаз, ядерная фрагментация [36];
- нетоз – образование нейтрофильных внеклеточных ловушек [43];
- аутофагия [34];
- поглотительная способность: пиноцитоз, фагоцитоз (бактерии, дрожжи, зимоzan, иные частицы) (рис. 6А) [32, 41–42];
- межклеточные взаимодействия, иммунные синапсы (Т-клетки и АПК) (рис. 6Б) [29], трогоцитоз: активный мембранный обмен между клетками [27, 40];
- функциональное состояние клетки: продукция радикалов кислорода [32, 42], оксида азота, мембранный потенциал;
- пролиферация [11] и клеточный цикл, митоз [17];
- флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) – метод, позволяющий выявлять специфические последовательности ДНК на метафазных хромосомах [25–26], повреждение [15, 28] и репарацию ДНК [18];
- изменения формы эритроцитов в процессе дифференцировки при различных заболеваниях, включая малярию [16, 38];

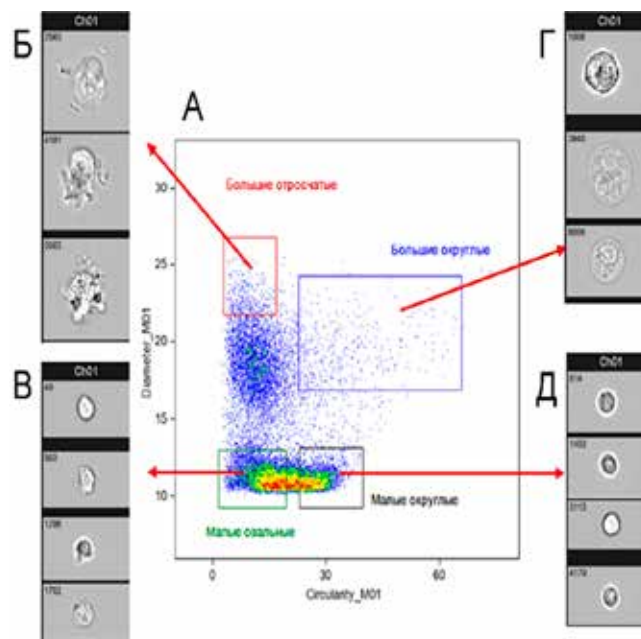


Рис. 5. Дискриминация клеток по размеру и форме. А – цитограмма в координатах Circularity и Diameter, Б – большие отросчатые клетки, В – клетки небольшого размера овальной формы, Г – большие клетки округлой формы, Д – клетки малого диаметра округлой формы

- изменения формы клеток (моноцитов под влиянием хемоаттрактантов, формирование псевдоподий цитокин-зависимыми клеточными линиями под влиянием цитокинов) [39];
- клеточный сигналинг, транслокация ядерного фактора NFkB под действием лиганд паттерн-ассоциированных рецепторов – LPS, R848 (резихимод) [19, 35], ВИЧ-специфическая транслокация ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT) [21], транслокация IRF-7 [12];
- визуализация микроорганизмов, паразитов [8] и вирусов, в том числе в связи в адъювантами (рис. 7) [14, 30], интернализация и адгезия бактерий [19, 31];
- визуализация наночастиц и их интернализация [31];

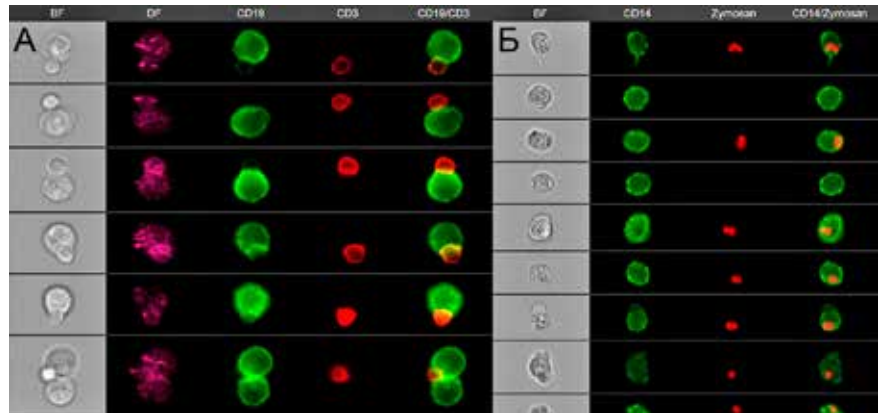


Рис. 6. Примеры использования ВПЦ в иммунологических исследованиях. А – формирование иммунных синапсов между В- и Т-лимфоцитами (увеличение 60х), Б – фагоцитоз частиц зимозана моноцитами (увеличение 40х)

- интернализация терапевтических антител [20];
- визуализация циркулирующих микрочастиц, экзосом, эктосом, апоптотических телец, поглощение экзосом клетками, пиноциоз [9];
- исследование адъювантов и вакцин на основе липидных наночастиц [13, 22–24];

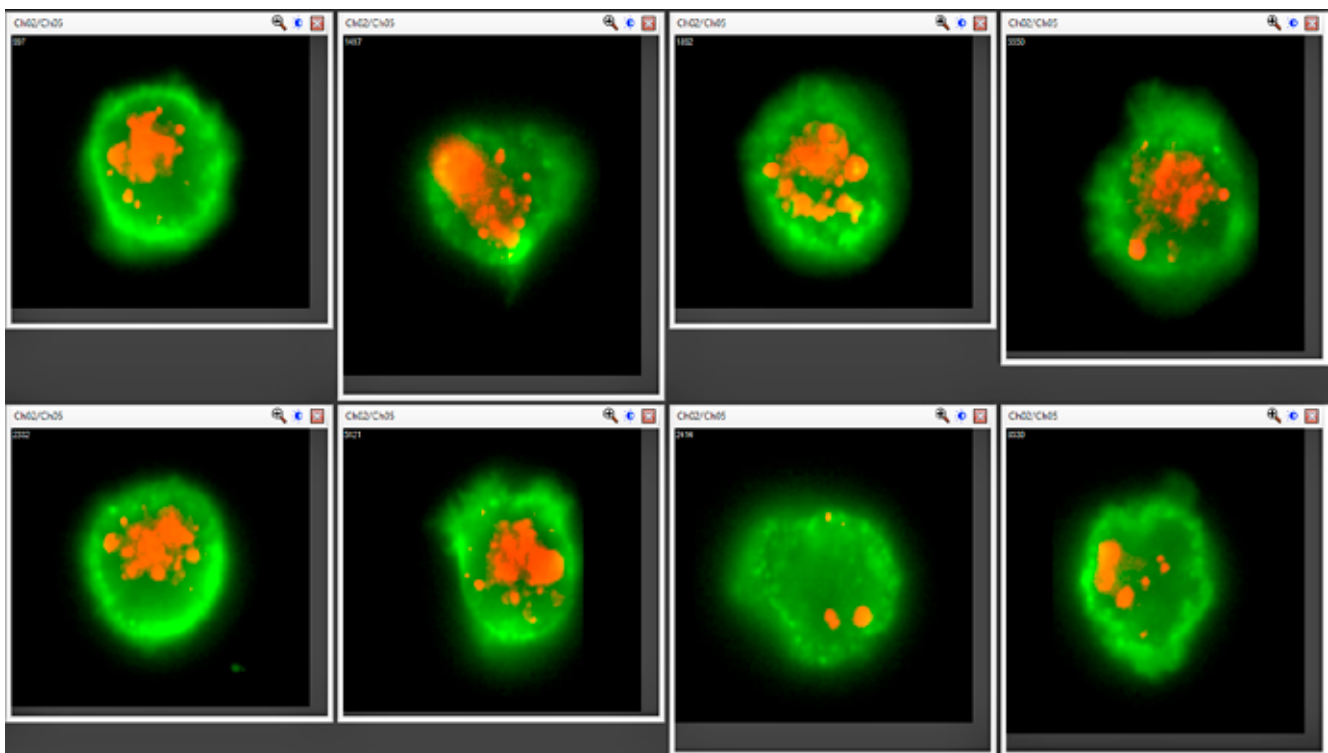


Рис. 7. CD209+ моноцитарные дендритные клетки (зеленое свечение), захватившие частицы адъюванта – гидроксида алюминия с адсорбированным инактивированным вирусом SARS-CoV-2. Визуализация вируса при помощи антитела к RBD-домену S-белка (красное свечение) (увеличение 60х)

- визуализация белковых агрегатов, микроорганизмов и микрокапель силиконового масла как контаминантов фармакопейных белковых растворов при помощи зондов Enzo ProteoStat, SYTO62 и Bodipy [33].

## Проточные цитометры и сортеры с функцией визуализации

В 2021 г. на рынок выпущен проточный цитометр с функцией визуализации клеток Attune™ CytPix™ компании Thermo Fisher Scientific (США). Прибор представляет собой развитие хорошо известного цитофлуориметра Attune™ NxT, к основному набору функций которого добавлена высокочувствительная камера. Она позволяет получать качественные светлопольные изображения клеток с максимальным разрешением 0,33 мкм/пиксель и скоростью записи до 6000 событий/мин. Несмотря на то, что камера лишена возможности получения флуоресцентных снимков, а программное обеспечение не обладает столь широкими возможностями анализа изображений клеток, как полноценные ВПЦ, прибор очевидно обладает важными преимуществами перед традиционными проточными системами.

В январе 2022 г. компания BD Biosciences (США) анонсировала новый сортер клеток BD Mosaic с функцией визуализации сортируемых событий. Представленная оригинальная технология BD CellView™ позволяет получать флуоресцентный сигнал от клеток в режиме реального времени со скоростью до 15000 событий/сек. В сортере отсутствует камера, а получение изображений клеток осуществляется при помощи акусто-оптического детектора. Сгенерированные снимки могут быть подвергнуты развернутому анализу с целью исследования размеров, формы, расположения и ко-локализации объектов в разных каналах, интенсивности сигнала и др.

Резюмируя вышесказанное, метод визуализирующей проточной цитометрии, позволяя исследовать морфологические и флуоресцентные параметры сотен тысяч клеток в потоке, является эффективной комбинацией традиционной ПЦ и флуоресцентной микроскопии, практически лишенной недостатков последних.

На современном этапе развития иммунологии, клеточной биологии, онкологии, микробиологии и иных медико-биологических дисциплин ВПЦ является важным инструментом исследователя, позволяющим в течение короткого времени получить практически исчерпывающую информацию о морфологии, иммунофенотипе и функциональных свойствах клеток. 

■ **Summary.** The review presents the basic information about the method of imaging flow cytometry and the main differences from traditional flow cytometry and fluorescence microscopy. The principles of the method, the design of instruments, the process of data collection and analysis are described in detail. The fields of application of the method and its possibilities in the analysis of cells, microorganisms and microparticles are described.

■ **Keywords:** flow cytometry, imaging flow cytometry, immunology, cell biology, fluorescence.

■ <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2022-4-71-78>

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Manohar S.M. Flow cytometry: principles, applications and recent advances / S.M. Manohar [et al.] // *Bioanalysis*. 2021. Vol. 13, №3. P. 181–198.
2. McKinnon K.M. Flow Cytometry: An Overview / K.M. McKinnon // *Curr Protoc Immunol*. 2018. Ch. 5.1.1–5.1.11.
3. Chelkar M. Flow cytometry: Principle and applications / M. Chelkar, S. Panda // *Pharma Innov. J.* 2020. Vol. 9, №10. P. 6–9.
4. BD Spectrum Viewer // BD Biosciences. <https://www.bdbiosciences.com/en-us/resources/bd-spectrum-viewer>.
5. Amnis® ImageStream®X Mk II // Luminex Corp. <https://www.luminexcorp.com/imagestream-x-mk-ii>.
6. Doan M. Diagnostic Potential of Imaging Flow Cytometry / M. Doan [et al.] // *Trends Biotechnol.* 2018. Vol. 36, №7. P. 649–652.
7. Lippeveld M. Classification of Human White Blood Cells Using Machine Learning for Stain-Free Imaging Flow Cytometry / Maxim Lippeveld [et al.] // *Cytometry Part A*. 2020. Vol. 97, №3. P. 308–319.
8. Bargieri D.Y. Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion / D.Y. Bargieri [et al.] // *Nature Communications*. 2013. Vol. 4. P. 2552.
9. Barteneva N.S. Circulating microparticles: Square the circle / N.S. Barteneva [et al.] // *BMC cell biology*. 2013. Vol. 14, №23. P. 21.
10. Baruch K. Cerebral nitric oxide represses choroid plexus NFκB-dependent gateway activity for leukocyte trafficking / K. Baruch [et al.] // *The EMBO Journal*. 2015. Vol. 34, №13. P. 1816–1828.
11. Begum J. A method for evaluating the use of fluorescent dyes to track proliferation in cell lines by dye dilution / J. Begum [et al.] // *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2013. Vol. 83, №12. P. 1085–1095.
12. Chang S. Impaired expression and function of toll-like receptor 7 in hepatitis C virus infection in human hepatoma cells / S. Chang, K. Kodys, G. Szabo // *Hepatology*. 2010. Vol. 51, №1. P. 35–42.
13. Choy C.H. Aggregation and size attributes analysis of unadsorbed and adjuvant-adsorbed antigens using a multispectral imaging flow cytometer platform / C.H. Choy [et al.] // *Journal of pharmaceutical sciences*. 2021.
14. Deng L. Contrasting life strategies of viruses that infect photo- and heterotrophic bacteria, as revealed by viral tagging / L. Deng [et al.] // *mBio* 2019. Vol. 3, №6.
15. Durdik M. Imaging flow cytometry as a sensitive tool to detect low-dose-induced DNA damage by analyzing 53BP1 and γH2AX foci in human lymphocytes / M. Durdik [et al.] // *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2013. Vol. 87, №12. P. 1070–1078.
16. Ferrin K.Y. Sickle cell imaging flow cytometry assay (SIFCA) / K.Y. Kleber [et al.] // *Methods in molecular biology*. 2016. Vol. 1389. P. 279–292.

Полный список использованных источников размещен

 [http://innosfera.by/2022/04/flo\\_cytometry](http://innosfera.by/2022/04/flo_cytometry)

Статья поступила в редакцию 15.01.2022 г.