

## ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПО СВЕТОРАССЕЙНИЮ МЕТОДОМ ГЛОБАЛЬНОЙ ОПТИМИЗАЦИИ

К.В.Гилев<sup>1,2</sup>, Д.И.Строкотов<sup>1,2</sup>, М.А.Юркин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт Химической Кинетики и Горения СО РАН, <sup>2</sup>Новосибирский Государственный Университет  
gil@ngs.ru

Представлен метод характеристики мононуклеарных клеток по светорассейнию. Метод верифицирован на лимфоцитах крови человека, индикатрисы светорассейния которых были измерены на сканирующем проточном цитометре. Метод глобальной оптимизации использовался для определения диаметров и показателей преломления ядра и цитоплазмы. Определение данных параметров актуально для диагностики патологических состояний лимфоцитов.

Характеризация лимфоцитов человека имеет большое значение для диагностики различных патологий. Современные методики фенотипирования лимфоцитов требуют дорогостоящих моноклональных антител и значительного времени для проведения анализа [0]. Поэтому актуальна задача развития быстрых и точных методов определения истинных параметров лимфоцитов, не искаженных в процессе подготовки пробы.

Существующие проточные цитометры позволяют измерять интенсивность светорассейния одиночными частицами в два телесных угла: вдоль и перпендикулярно падающему излучению. Сканирующий проточный цитометр (СПЦ) позволяет измерять индикатрисы светорассейния одиночных частиц:  $I(\theta) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} d\varphi [S_{11}(\theta, \varphi) + S_{14}(\theta, \varphi)]$  в

диапазоне полярных углов  $\theta$  от  $5^\circ$  до  $120^\circ$  со скоростью до 500 частиц в секунду [2] ( $S_{11}$ ,  $S_{14}$  - элементы матрицы Мюллера, усреднение проводится по всему азимутальному углу рассеяния).

В качестве оптической модели лимфоцита используется концентрический двухслойный шар, каждый слой которого имеет различные показатели преломления. Для поиска решения используется метод глобальной оптимизации DiRect. Используются следующие диапазоны параметров в методе глобальной оптимизации: внешний диаметр цитоплазмы 4.5–10 мкм, показатель преломления цитоплазмы 1.34–1.41, отношение диаметра ядра к диаметру цитоплазмы 0.7–0.95, показатель преломления ядра 1.41–1.58 (показатель преломления среды равен 1.337).

Для подготовки образцов лимфоцитов использовалась цельная периферическая венозная кровь из локтевой вены здорового донора с ЭДТА в качестве антикоагулянта; проводилось центрифугирование с ускорением 450 g в течение 20 минут в фосфатно-солевом буфере с плотностью 1.077 г/мл. Затем из обогащенного лейкоцитами осадка выделялись лимфоциты с помощью иммунофлуоресцентных маркеров CD3-FITC и CD19-PE для T- и B-клеток соответственно. После окрашивания в течение 20 минут проба была снова отмыта и разбавлена для получения концентрации около  $10^6$  клеток/мл. Полученную пробу анализировали на СПЦ, измеряя одновременно два сигнала: интенсивность флуоресценции от специфически связанных с лимфоцитом маркеров и индикатрисы светорассейния.

Для 7 доноров были проведены исследования морфологических особенностей лимфоцитов. Результаты характеристики Т- и В-лимфоцитов, представлены с помощью следующих параметров: диаметр клетки  $D_c$ , отношение диаметра ядра к диаметру клетки  $D_n/D_c$ , показатель преломления цитоплазмы  $m_c$ , показатель преломления ядра  $m_n$  (*Mean* – среднее значение для данного донора, *SD* – стандартное отклонение для данного донора). Для Донора 1 и Донора 6 представлено сравнение параметров Т- и В-лимфоцитов, для остальных доноров представлены значения только для Т-лимфоцитов.

Таблица 1. Результаты характеристики Т- и В-лимфоцитов 7 доноров.

		Донор								
		1		2	3	4	5	6		7
		Т	В	Т	Т	Т	Т	Т	В	Т
$D_c$ , мкм	<i>Mean</i>	6.31	6.63	6.36	6.35	6.48	6.34	6.38	6.63	6.45
	<i>SD</i>	0.50	0.65	0.55	0.63	0.60	0.67	0.57	0.73	0.71
$D_n/D_c$	<i>Mean</i>	0.901	0.904	0.901	0.903	0.906	0.903	0.903	0.905	0.905
	<i>SD</i>	0.005	0.007	0.006	0.007	0.005	0.006	0.005	0.008	0.007
$m_c$	<i>Mean</i>	1.3759	1.3766	1.3755	1.3764	1.3756	1.3774	1.3765	1.3766	1.3768
	<i>SD</i>	0.0026	0.0024	0.0020	0.0027	0.0030	0.0030	0.0026	0.0027	0.0030
$m_n$	<i>Mean</i>	1.4479	1.4502	1.4436	1.4464	1.4411	1.4515	1.4476	1.4490	1.4486
	<i>SD</i>	0.0080	0.0086	0.0084	0.0086	0.0088	0.0091	0.0080	0.0094	0.0091

1. Flow Cytometry and Sorting, 2<sup>nd</sup> ed. / Eds. M. R. Melamed, T. Lindmo, M. L. Mendelson. N. Y.: Wiley-Liss, 1990. 824 p.

2. Maltsev V. P., Scanning Flow Cytometry for Individual Particle Analysis // Review of Scientific Instruments. 2000. Vol. 71. P. 243–255.

## CHARACTERIZATION OF MONONUCLEAR CELLS FROM LIGHT SCATTERING USING GLOBAL OPTIMIZATION

Gilev K.V.<sup>1,2</sup>, Strokotov D.I.<sup>1,2</sup>, Yurkin M.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS, <sup>2</sup>Novosibirsk State University  
gil@ngs.ru

Method of mononuclear cells characterization from light scattering is presented. This method is verified on human blood lymphocytes, which light scattering patterns were measured by the scanning flow cytometer. Global optimization method is used to determine diameters and refractive indices of nucleus and cytoplasm. Determination of such parameters is important for diagnostics of lymphocytes pathologies.