

Исследование микрочастиц крови и их димеров в богатой тромбоцитами плазме с помощью сканирующей проточной цитометрии

*Чернова Дарья Николаевна, студент 2-го курса магистратуры ФФ НГУ
Конохова Анастасия Игоревна, аспирант 3-го года обучения
Москаленский Александр Ефимович, младший научный сотрудник
Лаборатория цитометрии и биокинетики, науч. рук.: д.ф.-м.н. В.П. Мальцев*

1. Общая формулировка научной проблемы и ее актуальность

Исследования последних лет показали, что в крови человека помимо клеток крови также циркулируют клеточные микрочастицы, представляющие собой отделившиеся от клеток мембранные везикулы, размеры которых варьируют в пределах от 100 нм до 1 мкм. Микрочастицы крови высвобождаются всеми типами клеток крови и эндотелиальными клетками в результате процессов, приводящих к клеточной активации или апоптозу, и в зависимости от природы своего происхождения могут переносить в своем составе и на поверхности различные сигнальные белки и молекулы. Широко распространено мнение, что микрочастицы выступают в роли универсального переносчика информации между клетками в организме и играют важную роль в развитии и поддержании множества физиологических и патофизиологических процессов. Более того, считается, что характеристики микрочастиц, могут служить в качестве новых маркеров для различных заболеваний. Но не смотря на неуклонно растущий интерес к исследованию микрочастиц как со стороны фундаментальной науки, так и со стороны клинико-диагностических приложений, множество вопросов до сих пор остаются открытыми, а диагностический и прогностический потенциал микрочастиц - нереализованным. Это связано, главным образом, с отсутствием методов, пригодных для проведения клинико-диагностических исследований микрочастиц. Поскольку микрочастицы циркулируют в крови наряду с другими клетками, и при том не обладают никакими специфическими рецепторами, которые бы отличали их от родительских клеток с помощью флуоресцентных меток, микрочастицы являются трудно идентифицируемым и к тому же трудно-детектируемым объектом для стандартных методов анализа, поскольку в силу своих небольших размеров лежат на границе их разрешающей способности. Возможности методов так же ограничивает высокая гетерогенность микрочастиц, требующая чувствительности не только к вариациям размера, но и различиям микрочастиц крови по форме и составу. И наконец, процесс выделения микрочастиц в исследуемых образцах требует максимального исключения факторов, способных повлиять на нативные характеристики микрочастиц, поскольку даже стандартно проводимое центрифугирование плазмы крови для удаления клеток крови и тромбоцитов, не только приводит к удалению более крупных микрочастиц, но также может приводить к активации клеток и высвобождению новых субпопуляций микрочастиц и влиять на результаты анализа. В силу этого, среди задач, касающихся изучения микрочастиц крови, в настоящее время на первом месте стоит развитие новых высокочувствительных и точных методов детекции, идентификации и характеристики микрочастиц крови, пригодных для проведения рутинных биологических и клинических исследований. И развитию именно такого метода и посвящена представляемая на конкурс работа.

2. Конкретная решаемая в работе задача и ее значение

Конкретная задача данной работы состояла в разработке нового метода идентификации микрочастиц крови в плазме и их характеристики по сигналам светорассеяния, измеренным с помощью сканирующего проточного цитометра (СПЦ). Для решения задачи идентификации авторы поставили целью исключить применение сильного центрифугирования для удаления клеток крови, включая тромбоциты, из плазмы и использование флуоресцентных меток, что значительно упрощает подготовку пробы и максимально исключает неконтролируемые

факторы, способные повлиять на результаты анализа микрочастиц. В отличие от других существующих методов анализа, предлагаемый авторами подход позволяет не только выделить среди детектируемых событий тромбоциты и микрочастицы, основываясь только на измеряемых сигналах светорассеяния, но и (1) является единственным методом, который позволяет анализировать форму микрочастиц (идентифицировать фракции одиночных сферических микрочастиц, их димеров и более крупных агрегатов) в клинических образцах без сложной пробоподготовки, и (2) одновременно с высокой точностью измерять размер и показатель преломления микрочастиц в составе как мономеров, так и димеров.

3. Используемый подход, его новизна и оригинальность

Индикатрисы светорассеяния отдельных частиц плазмы измерялись с помощью сканирующего проточного цитометра. В теоретической основе метода заложено (1) решение прямой задачи светорассеяния с использованием теории Ми для моделирования светорассеяния сферическими объектами и использованием метода дискретных диполей (МДД) для объектов несферической формы (тромбоциты, димеры микрочастиц), (2) решение обратной задачи светорассеяния с помощью метода глобальной оптимизации DiRect для сферических объектов и с использованием баз данных для несферических частиц, (3) строгий статистический анализ результатов решения обратной задачи светорассеяния, позволяющий выбирать оптимальную оптическую модель для измеряемого объекта, определять форму и тип измеряемых частиц, а так же производить оценку заложенных в модели параметров и характеристик частиц с контролируемой точностью.

4. Полученные результаты, их уровень и значимость

С помощью разработанного метода, авторами был проведен детальный анализ частиц плазмы, прошедшей различную степень обработки (естественное осаждение, центрифугирование, фильтрация). Метод позволил не только детектировать наличие димеров микрочастиц в плазме крови – факт, который наблюдался ранее только методами микроскопии высокого разрешения – что отражает способность микрочастиц к агрегации, и потенциально может использоваться как характеристика отражающая их прокоагулянтную активность. Более того, благодаря возможности одновременного точного определения характеристик частиц, включая их размер и показатель преломления, метод позволил отследить влияние пробоподготовки на результаты характеристики тромбоцитов и микрочастиц плазмы по формированию фракций микрочастиц крови, различающихся по форме и плотности.

5. Вклад молодого ученого в выставляемые на конкурс работы

Участниками конкурса была самостоятельно проведена экспериментальная часть работы, включающая измерения плазмы крови, проведенные на сканирующем проточном цитометре, и последующий анализ полученных данных. Они внесли определяющий вклад в разработку предложенного метода идентификации и характеристики микрочастиц крови и их димеров в богатой тромбоцитами плазме по светорассеянию, а также непосредственно участвовали в подготовке статьи к публикации.

6. Список статей, опубликованных в рецензируемых журналах, индексируемых ISI

1. Konokhova, A. I., Chernova, D. N., Moskalensky, A. E., Strokotov, D. I., Yurkin, M. A., Chernyshev, A. V. and Maltsev, V. P. (2015), Super-resolved calibration-free flow cytometric characterization of platelets and cell-derived microparticles in platelet-rich plasma. *Cytometry*. [doi: 10.1002/cyto.a.22621]