

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ И КОНФОКАЛЬНОЙ ЛАЗЕРНОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА

Павлова Е.Н.¹, Шапошникова Д.А.¹, Радыгина Т.В.², Курынина А.В.¹, Петричук С.В.², Ерохина М.В.¹

¹ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ²ФГАУ МЗ РФ «НМИЦ здоровья детей», Москва

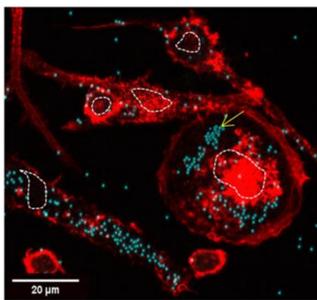
Актуальность

Количественная оценка фагоцитарной активности макрофагов является важной задачей как для экспериментальных, так и для клинических исследований.

Цель

Целью данной работы были разработка и апробация методики количественной оценки фагоцитарной активности макрофагов новым методом проточной цитометрии с визуализацией (IFC AMNIS) и сопоставление полученных результатов с широко используемым для данной задачи методом лазерной конфокальной сканирующей микроскопии. IFC AMNIS позволяет не только анализировать в индивидуальной клетки такие параметры как размер, гранулярность и интенсивность флуоресценции как в проточной цитометрии, но и получить изображения каждой из анализируемых клеток, что позволяет существенно расширить спектр анализируемых параметров и повысить точность и качество анализа.

Лазерная конфокальная сканирующая микроскопия

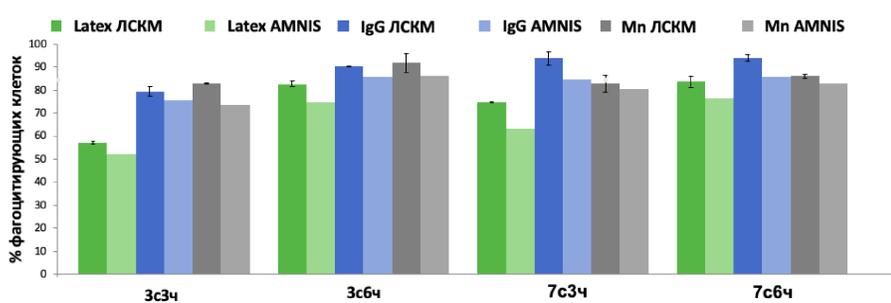


Пример изображения, полученного методом ЛКСМ: M1 макрофаги на 7-е сутки дифференцировки при инкубации в течение 6 часов с латексными частицами, опсонизированными IgG (BB latex bead 360/470 нм). Актин (красный) - Phalloidin-TRITC. Желтой стрелкой указаны кластеры частиц в цитоплазме. Масштабная линейка – 20 мкм.

ЛКСМ позволяет не только определить морфологию макрофагов, но и точное количество частиц в клетках, их локализацию и характер распределения - диффузно или в кластерах. При анализе методом ЛКСМ оценка ФЧ проводилась путем индивидуального подсчета частиц в клетке и на основании этого были выделены группы с низким (<10 частиц), средним и высоким (>20 частиц) значением ФЧ. Для каждой экспериментальной точки было проанализировано 200 клеток.

Результаты

Оценка фагоцитарного индекса



с – сутки дифференцировки; ч – часы инкубации с частицами
ЛКСМ: 200 анализируемых событий
IAMNIS: 3000 анализируемых событий

Значения ФИ, полученные двумя методами были сопоставимы. Выявлено, что опсонизация объектов фагоцитоза повышает ФИ на всех сроках дифференцировки M1 макрофагов, а при формировании зрелого фенотипа преобладает фагоцитоз через рецепторы к IgG.

Также оба метода продемонстрировали схожую динамику распределения макрофагов по группам с низким, средним и высоким значением ФЧ. Для нерецепторного фагоцитоза характерно преобладание клеток с низкими значениями ФЧ на всех сроках эксперимента, а для рецепторного фагоцитоза - возрастание доли клеток с высокими значениями ФЧ.

Выводы

Метод ЛКСМ позволяет оценить ФИ и ФЧ посредством визуализации каждой частицы в клетке, выявить зоны их локализации, кластеризацию частиц и проанализировать морфологию клеток. Однако при этом увеличиваются временные затраты на обработку получаемых изображений. Разработанная методика анализа фагоцитарной активности методом IFC AMNIS предполагает быстрый анализ ФИ, но для оценки ФЧ необходимо применение такого косвенного параметра, как интенсивность флуоресценции, но при этом полученные результаты по оценке групп макрофагов с разной интенсивностью фагоцитоза сопоставимы с методом ЛКСМ. Ключевым преимуществом IFC AMNIS является высокая производительность (большая выборка) и быстрота анализа, что особенно актуально в клинической практике при работе с большим количеством образцов.

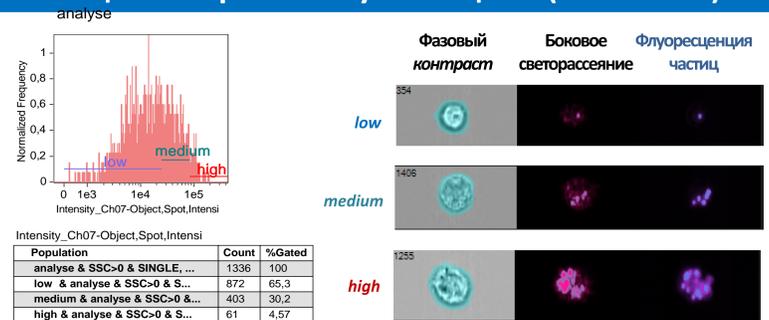
Сокращения

ЛКСМ – лазерная конфокальная сканирующая микроскопия
IFC AMNIS - проточная цитометрия с визуализацией
ФИ – фагоцитарный индекс
ФЧ – фагоцитарное число

Материалы и методы

Модель провоспалительных макрофагов (M1) получена путем индукции макрофагальной дифференцировки клеток человека линии THP-1 форболовым эфиром. Для реализации разных путей фагоцитоза в культуральную среду были добавлены неопсонизированные флуоресцентные латексные частицы (Latex, 1 мкм) и частицы, опсонизированные IgG или маннозой (Mn). Для оценки фагоцитарной активности (ФА) использовали показатели фагоцитарного индекса (ФИ) – процент клеток от общего числа анализируемых, фагоцитирующих частицы, и фагоцитарного числа – количество частиц в клетке (ФЧ). Оценка ФА проводилась на 3-и и 7-е сутки дифференцировки в течение 3 или 6 часов инкубации с частицами. Анализ методом проточной цитометрии с визуализацией (IFC AMNIS) был выполнен на приборе ImageStream[®] Mk II Imaging Flow Cytometer с помощью ПО IDEAS (Luminex Corporation), методом ЛКСМ – на лазерном сканирующем микроскопе Leica с помощью ПО LASAF и ImageJ Fiji.

Проточная цитометрия с визуализацией (IFC AMNIS)



В данном методе анализируется суспензия клеток, что исключает возможность анализа морфологии клеток. Так как частицы могут образовывать кластеры в клетках, что затрудняет их индивидуальный подсчет, если их количество превышает 20, то для оценки ФЧ был использован косвенный параметр интенсивности флуоресценции частиц (low, medium, high) с дополнительным контролем изображения частиц в клетках в соответствующем флуоресцентном канале. Для каждой экспериментальной точки было проанализировано 3000 клеток.

Оценка фагоцитарного числа

