

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

**Мониторинг циркуляции раковых клеток с использованием
двухканального проточного цитометра in vivo**

название темы выпускной квалификационной работы полужирным шрифтом

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента(ки) 2 курса 253 группы
направления (специальности) «Физика»

код и наименование направления (специальности)

физического факультета

наименование факультета, института, колледжа

Иноземцевой Елены Евгеньевны

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель

Зав. кафедры оптики и биофотоники,

Профессор, д. ф.-м. наук

должность, уч. степень, уч. звание



дата, подпись

Тучин В.В.

инициалы, фамилия

Заведующий кафедрой

Зав. кафедры оптики и биофотоники,

Профессор, д. ф.-м. наук

должность, уч. степень, уч. звание



дата, подпись

Тучин В.В.

инициалы, фамилия

Саратов 2016 год

Введение. В последние десятилетия, в связи с развитием вычислительной техники, появилась возможность изучать малые частицы (клетки крови, вирусы и т. п.) по данным светорассеяния. Такой подход предполагает математическое моделирование процесса, а затем решение обратной задачи рассеяния.

В случае отдельной малой частицы к известным трудностям, связанным с решением обратной задачи, добавляются еще технические сложности измерения данных рассеяния, вызванные малостью частицы: сложность локализации и низкая интенсивность рассеянного света.

Проточная цитометрия – это современная технология быстрого измерения характеристик клеток, их органелл и происходящих в них процессов. Она представляет собой эффективный подход к решению многих важных задач биологии клетки, иммунологии и клеточной инженерии. Использование современных достижений в области флуоресцентных красителей, развитие лазерных и компьютерных технологий, а также эффективное программное обеспечение привели к широкому использованию данной технологии в медицинской практике. Проточный цитометр позволяет получать достаточно богатую информацию о свете, рассеянном частицей, со скоростью до 1000 частиц в секунду. Однако схема измерения предполагает интегрирование индикатрисы рассеяния по азимутальному углу, что приводит к потере информации в случае несферических частиц.

Данная квалификационная работа посвящена изучению *in vivo* мониторингу циркуляции клеток с использованием двухканального проточного цитометра. Основной задачей данной выпускной квалификационной работы является определение и нахождение двойного позитивного сигнала. При обнаружении двойного позитивного сигнала можно сделать выводы об эффективности применения метода проточной цитометрии *in vivo* при мониторинге клеток и фиксирования определенной популяции клеток.

Актуальностью предложенной работы является использование двух

каналов проточного цитометра для достоверного обнаружения интересующих раковых клеток молочной железы, применение GFP и DID маркировки клеток. Использование достаточно простой методики для сложного процесса обнаружения определенной клеточной популяции, обработка полученных результатов, обнаружение двойных позитивных сигналов.

Работа состоит из двух основных разделов:

1) Теоретическая часть. Данный раздел состоит из литературного обзора по описанию методики, процесса выполнения и получения данных. Рассматриваются ключевые особенности данного метода.

2) Практическая часть. Включает в себя подробное описание процесса подготовки и проведения экспериментов, обработку сигналов и получение наглядных результатов. Второй этап работы состоит из четырех основных разделов, каждому из которых предпослан краткий обзор литературы:

- Подготовка клеток. Данный раздел включает выращивание, получение и маркировку клеток.

- Подготовка животного для эксперимента. В данном разделе описываются используемые вещества для анестезии крысы, методика инъекции ранее приготовленных клеток.

- Мониторинг циркуляции клеток с использованием двухканального проточного цитометра. Данный раздел посвящен описанию процесса выбора подходящего для эксперимента сосуда, получения позитивного сигнала, регистрации сигнала.

Обработка сигналов. Раздел включает себя алгоритм обработки полученных в результате эксперимента сигналов в среде MATLAB. Изображение графиков.

Основное содержание работы. Проточная цитометрия (flow cytometry) [греч. *kytos* — сосуд, здесь — клетка и *metreo* — измеряю] — метод, используемый для автоматизированного измерения величины микроскопических частиц и их сортировки по интенсивности флуоресценции, который заключается в суспензировании тестируемых частиц (напр., клеток или хромосом), окраске их флуоресцентным красителем с последующим облучением лазерным лучом. Проточная цитометрия — это современная технология быстрого измерения характеристик клеток, их органелл и происходящих в них процессов.

In vivo проточная цитометрия позволяет исследователям получить информацию о клетках у живых животных без извлечения образцов крови (Рис. 1). С помощью этой методики количество флуоресцентно меченных циркулирующих клеток может быть определено в режиме реального времени и воспроизводимым образом в живых животных.

Образец устанавливается таким образом, что щель пересекает всю ширину кровеносного сосуда и покрывает весь интерфейс. Все клетки, проходящие через фокус, возбуждаются и обнаруживаются в то же время. Флуоресценция детектируется с помощью фотоэлектронного умножителя, который находится непосредственно за механической щелью.

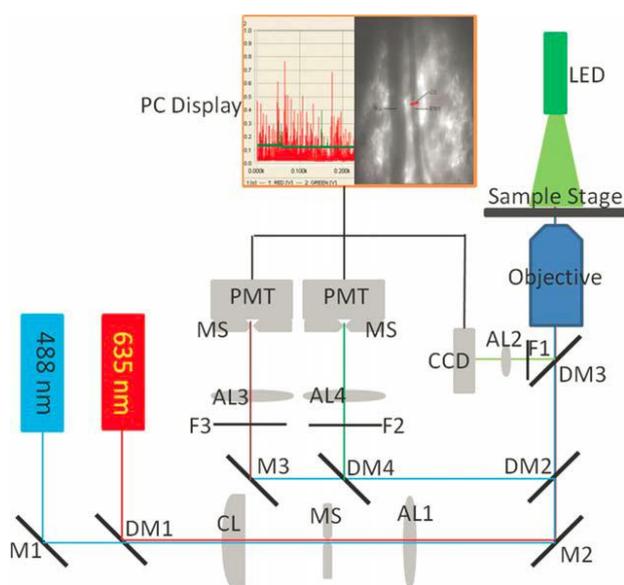


Рис. 1. Схема двухканального in vivo проточного цитометра экспериментальная установка.

Основной принцип работы *in vivo* проточного цитометра является конфокальное возбуждение и детекция флуоресцентно меченых клеток в циркуляции сосуда. Схема экспериментальной установки показана на *рис.1*. При проведении экспериментов, животное находится под наркозом, его помещают на предметный столик, ухо располагается на предметное стекло с нанесением глицерина. Для оценки кинетики истощения циркулирующих клеток рака водили 10^6 флуоресцентно меченых клеток на 20 г массы тела, вводились клетки через хвостовую вену, далее животное помещали непосредственно на прозрачную плоскость для проведения мониторинга. Первые IVFC измерения были получены в течение 5-15 мин с момента инъекции. Дополнительные измерения были проведены в том же месте сосуда через 5 дней после измерения. Кровеносный сосуд соответствующего диаметра идентифицируется. Свет от лазера фокусируется на щели цилиндрической линзы и отображается через выбранный кровеносный сосуд с помощью микроскопа (числовая апертура объектива $40\times, 0.6$). Красные и зеленые источники света идеально подходят для этой цели, так как они обеспечивают хорошее проникновение в ткани и кровь. Размер щели в фокальной плоскости образца составляет примерно $5\mu\text{m}\times 72\mu\text{m}$. Глубина фокуса (т.е. полуширина света щели на образце в осевом направлении) составляет приблизительно $50\mu\text{m}$, значение выбрано для судов, представляющих интерес. Образец устанавливается таким образом, что длина щели пересекает ширину кровеносного сосуда; таким образом, флуоресценция возбужденных меченых клеток, находящихся в обращении проходят через щель. Излучаемая флуоресценция собирается объективом микроскопа, направляется через дихроичный светоделитель (BS1), отражается зеркалом и попадает на второй разделитель луча (BS2), отображается на механической щели размером $200\mu\text{m}\times 300\mu\text{m}$, которая является конфокально возбуждающей щелью. Это конфокальное расположение, исключает свет вне фокуса флуоресценции и источников рассеяния. Флуоресценция детектируется с помощью фотоумножительной

трубки, которая находится непосредственно за механической щелью, с частотой 100 кГц, собранные данные отображаются и сохраняются на компьютере. Полосовой фильтр, 675 nm(\pm 25 nm) размещен в передней части конфокальной щели и предотвращает попадание обратно рассеянного возбужденного света в детектор. Мощность лазера в кровеносном сосуде составляет примерно 600 мВт.

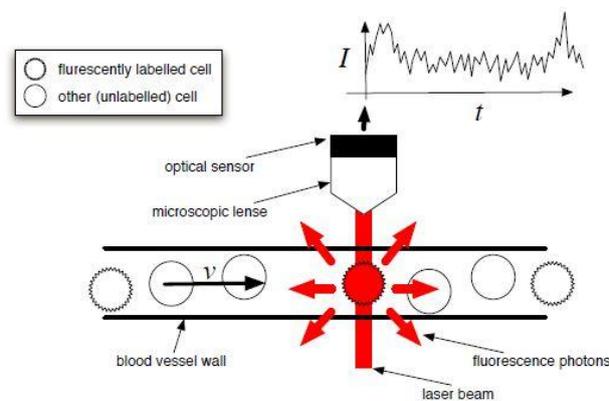
Эксперименты проводились на крысах с использованием модели 4T1 - клеточная линия карциномы молочной железы и проводился мониторинг на длинах 488nm, 635nm. Обработка полученных сигналов реализуется в автономном режиме с использованием программного обеспечения разработанного на платформе Matlab. Временная последовательность фильтруется с помощью скользящего среднего окна для того, чтобы удалить высокочастотный шум. Контрольные измерения, выполняются в месте сбора данных перед тем, как флуоресцентные метки вводятся в поток крови, для определения статистики шума, учитываются только те пики, которые превышают уровень шума. Количество пиков флуоресценции, наряду с высотой и длительностью каждого пика, определяются с помощью алгоритмов, реализованных и описанных в данной работе.

Как показано на *рис.2*, *in vivo* проточная цитометрия (IVFC) регистрирует интенсивность света в фиксированном положении внутри кровеносного сосуда, таким образом, что флуоресцентно меченые клетки будут продуцировать пики интенсивности во время возбуждения при прохождении через луч лазера. IVFC сигналы по своей природе содержат много шумов и требуют значительного количества обработки, прежде чем они могут быть оценены количественно. Данный метод имеет ряд преимуществ:

- Во-первых, метод полностью автоматизирован.

• Во-вторых, подход не требует контрольных экспериментов, следовательно, имеет значительный потенциал для упрощения лабораторного протокола.

Пики, т.е. локальные максимумы сигнала, указывают на локальное положение максимального увеличения интенсивности света в течение времени. Такие пики являются хорошими кандидатами для обнаружения соответствующих флуоресцентных клеток. В работе представлен полностью автоматизированный метод для определения количества клеток в сигналах в *in vivo* проточной цитометрии.



*Рис.2. Принципиальная установка *in vivo* проточного цитометра: кровь проходит через сосуд с примерно постоянной скоростью V . Конкретные типы клеток (например, раковые клетки) являются флуоресцентно мечеными, так что они выпускают фотоны флуоресценции при возбуждении при прохождении через лазерный луч. Это приводит к пику при регистрации интенсивности.*

Перед тем, как начать мониторинг циркуляции клеток, необходимо иметь готовые клетки, подготовить крысу к эксперименту, верно расположить подготовленную крысу и найти подходящий для мониторинга кровеносный сосуд, который не должен превышать длину щели. Пики, т.е. локальные максимумы сигнала, указывают на локальное положение максимального увеличения интенсивности света в течение времени. Такие

пики являются хорошими кандидатами для обнаружения соответствующих флуоресцентных клеток. На *рис.3* – рабочее окно для изображения полученных результатов.

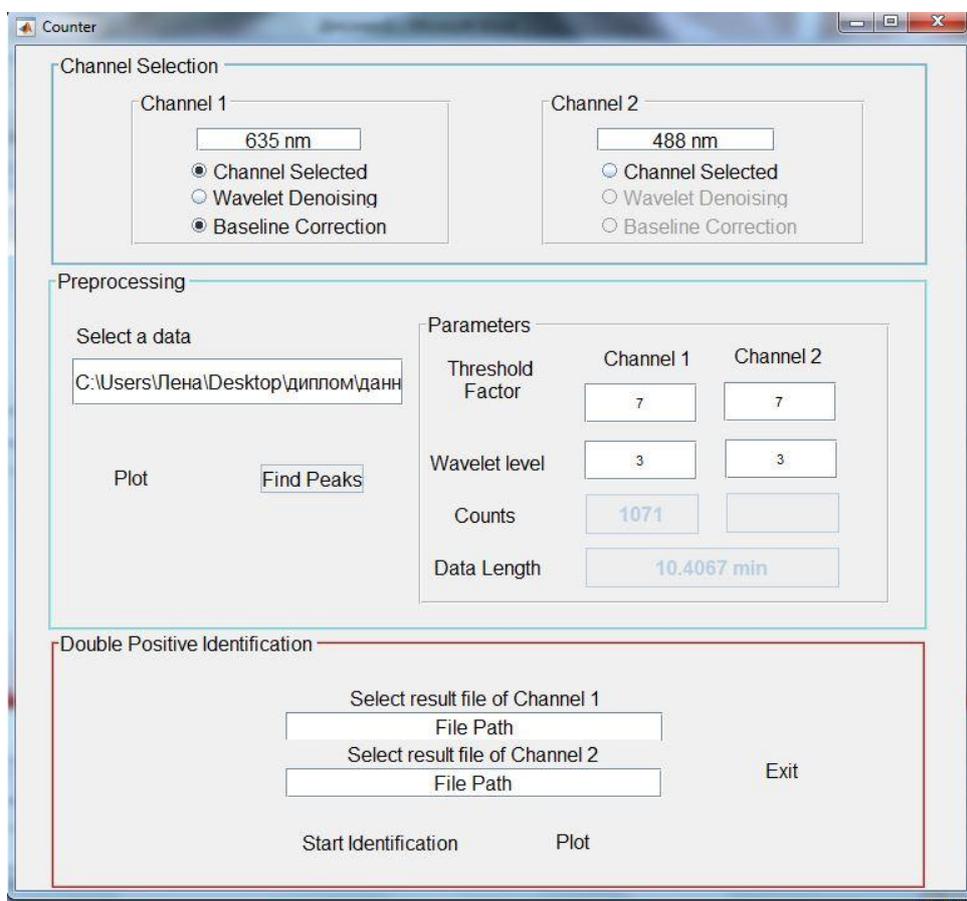
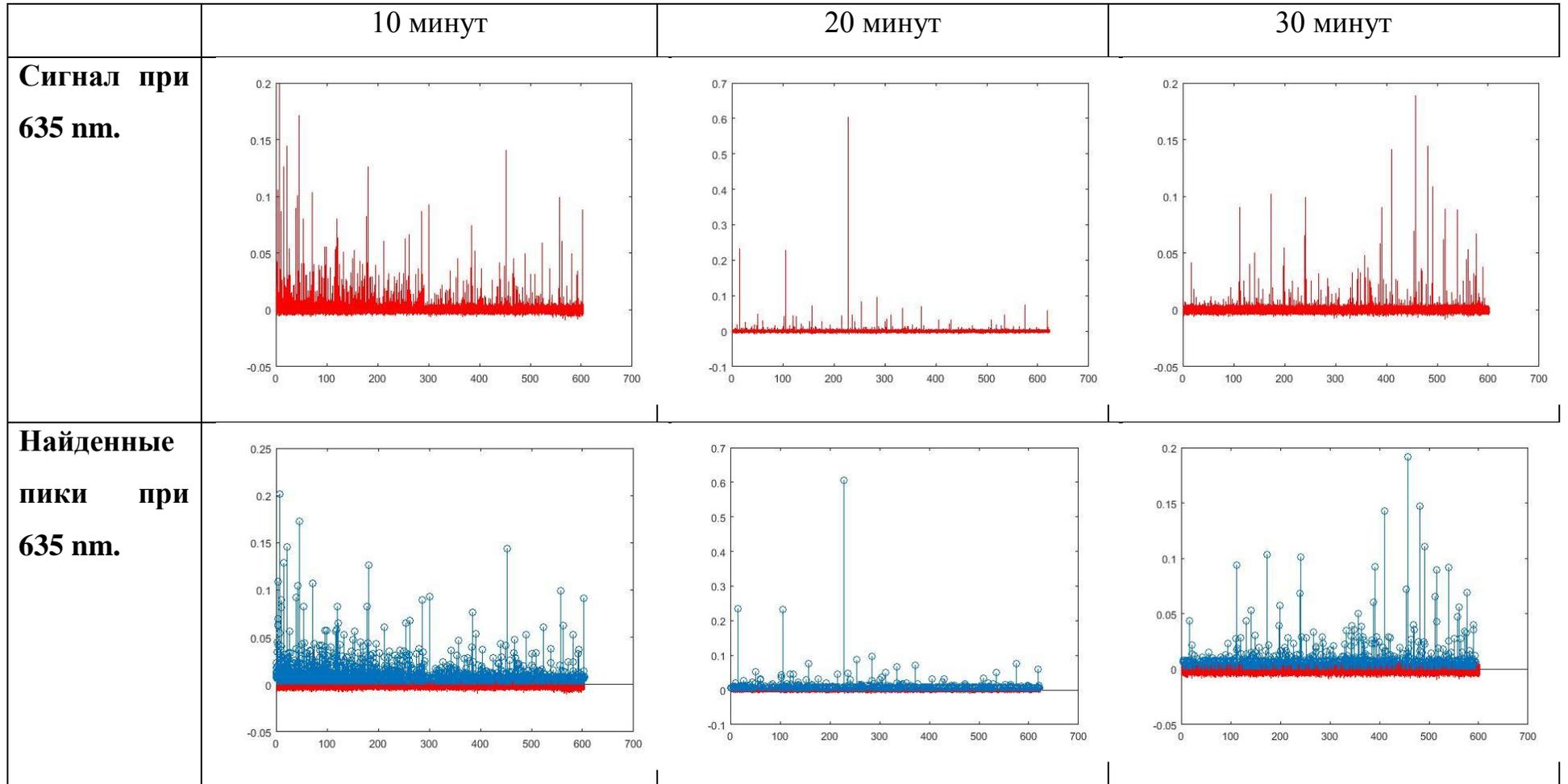
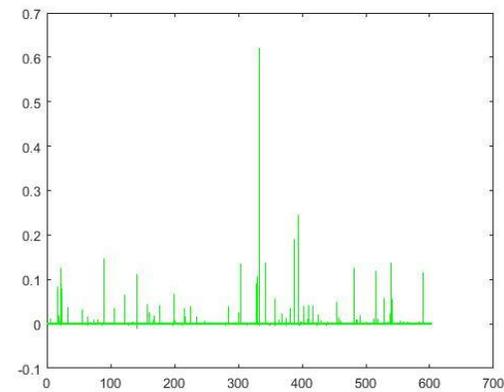
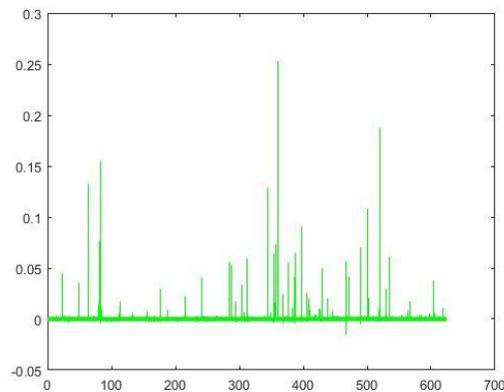
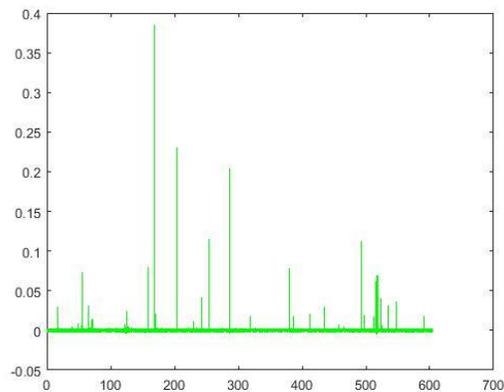


Рис. 3. Рабочее окно для изображения графиков полученных сигналов.

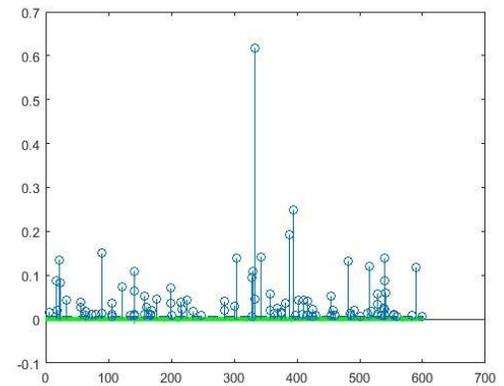
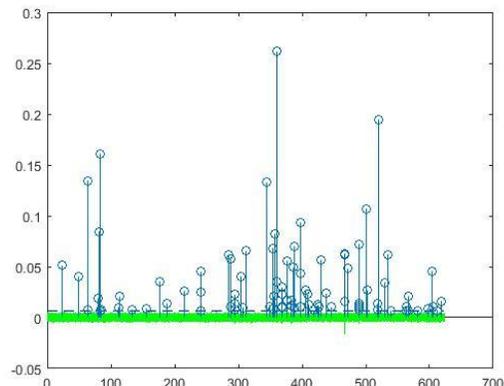
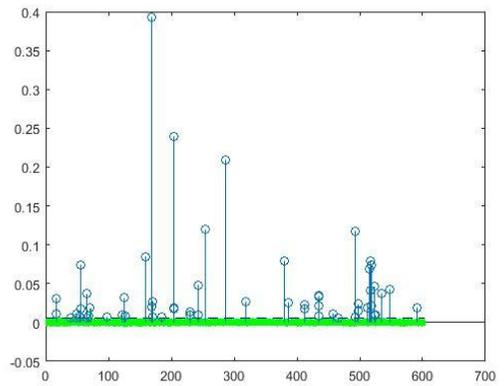
Используя данную программу можно увидеть отдельно каждый сигнал на разных длинах волн, найти пики каждого сигнала, зафиксировать двойной позитивный сигнал и его пики, записать в отдельный файл результаты двойных позитивных сигналов и посчитать их количество (Таблица 1).



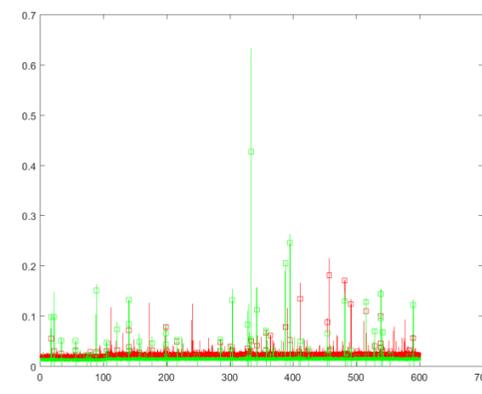
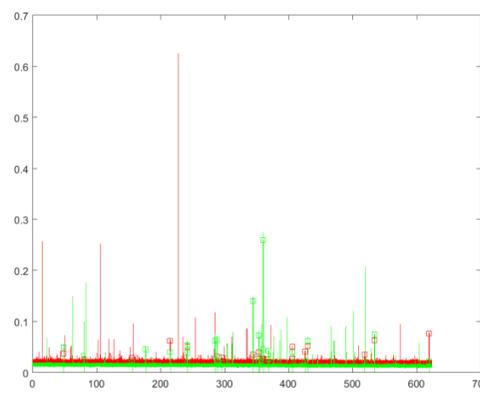
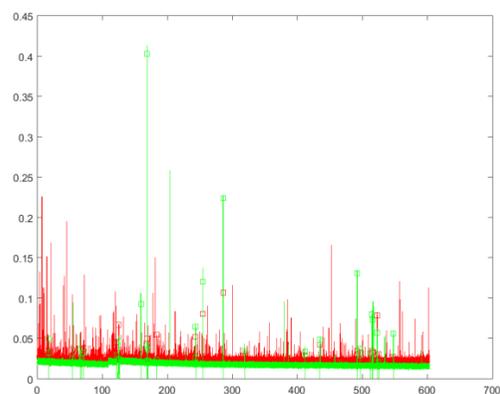
**Сигнал при
488 nm.**



**Найденные
пики при
488 nm.**



**Двойные
позитивные
сигналы и
их пики.**



**Сохранен
ные в файл
двойные
позитивные
пики**

Num of DP Peaks:		35
Channel 1 index	Channel 2 index	
110	1	
110	2	
279	6	
314	10	
328	11	
341	12	
509	14	
519	15	
523	16	
607	17	
633	18	
633	19	
636	20	
638	21	
679	22	
818	28	
818	29	
835	30	
889	31	
925	32	
1065	35	
1065	36	
1066	35	
1066	36	
1089	37	
1168	43	
1169	43	
1174	45	
1174	46	
1193	47	
1198	48	
1202	49	
1208	53	
1211	55	
1233	57	

Num of DP Peaks:		27
Channel 1 index	Channel 2 index	
55	2	
72	5	
145	13	
158	14	
189	16	
213	17	
213	18	
213	19	
245	20	
247	21	
247	22	
251	25	
302	29	
306	31	
307	32	
310	35	
310	36	
318	37	
318	38	
318	39	
347	51	
348	51	
359	56	
366	57	
430	74	
444	77	
493	88	

Num of DP Peaks:		80
Channel 1 index	Channel 2 index	
12	2	
19	4	
24	6	
38	7	
38	8	
51	13	
54	14	
59	15	
59	16	
65	17	
65	18	
65	19	
81	20	
102	22	
102	23	
102	24	
103	22	
103	23	
103	24	
104	22	
104	23	
104	24	
104	25	
126	28	
142	33	
158	34	
158	35	
159	34	
159	35	
162	36	
174	37	
214	41	
255	42	
255	43	
267	44	
270	45	
288	46	
290	47	
296	49	
300	50	
308	51	
329	52	
329	53	
330	52	
330	53	
337	54	
364	59	
372	60	
387	63	

Заключение. Описанная в данной работе технология, которая позволяет осуществлять мониторинг циркуляции клеток опухоли без необходимости извлечения пробы крови. В данной работе демонстрируется, что с этой техникой, мы можем определить число флуоресцентно меченых циркулирующих клеток *in vivo* в режиме реального времени. Кроме того, мы можем охарактеризовать особенности течения этих циркулирующих клеток путем определения высоты обнаруженных пиков флуоресценции. Возможность мониторинга циркулирующих клеток в живом организме в количественном выражении имеет ряд преимуществ. Например, мы можем наблюдать популяцию клеток, представляющих интерес в своей родной среде, свободной от артефактов потенциально введенных процедур выделения и обработки клеток, необходимых для выполнения и характеристики обычной проточной цитометрии. Кроме того, мы можем исследовать одну и ту же популяцию клеток непрерывно и в течение длительного времени, чтобы замечать динамические изменения в циркуляции различных типов клеток. В предложенной работе эта методика применяется для мониторинга циркуляции опухолевых клеток, так же данная методика применяется и для изучения взаимосвязи между метастатическим потенциалом во времени. В конечном счете, метод проточной цитометрии необходимо исследовать для мониторинга циркулирующего количества клеток опухоли для противоопухолевого лечения.

Развитые здесь методы должны быть применимы к различным потенциальным биомаркерам в обращении для обнаружения рака, характеризующих патологические злокачественные опухоли, оценки прогноза заболевания, а также для прогнозирования и измерения ответа на лечение, тем самым обеспечивая ценную информацию о выявлении и лечении рака. Кроме того, описанные здесь методы будут полезны для мониторинга циркулирующие клетки в целом.

Таким образом, мы показали, что IVFC является перспективным новым инструментом для перечисления клеток, находящихся в обращении, которые

могут помочь нам решить некоторые важные вопросы, касающиеся взаимосвязи циркулирующих раковых клеток, метастазирования, долгосрочном выживании рака и контролировать реакцию на конкретные методы лечения.

В данной выпускной квалификационной работе проведен мониторинг циркуляции клеток с использованием двухканального проточного цитометра *in vivo*. Также были получены навыки работы с клетками, крысами, инъекции различных веществ. Я научилась работать с проточным цитометром, получать качественные данные, обрабатывать полученные сигналы. В заключении, можно подтвердить эффективность применения *in vivo* проточной цитометрии на примере мониторинга циркуляции клеток рака молочной железы, что подтверждает актуальность данной методики в предложенной работе. В работе были продемонстрированы и осуществлены основные цели и задачи предложенной методики, что также подтверждает ее работоспособность, эффективность и преимущества относительно других методов.