



Оригинальная статья

Сравнение методов модуляционной интерференционной микроскопии, ДНК-спектрометрии, ДНК-цитометрии и проточной цитофлуориметрии при оценке индуцированной фитогемагглютинином активности лимфоцитов крови человека

Сустретов А.С.¹ • Богуш В.В.¹ • Гусева О.С.¹ • Ильясов П.В.¹ • Лимарева Л.В.¹

Актуальность. Исследование структурных особенностей и функционального состояния клеток иммунной системы и прежде всего лимфоцитов имеет большое значение как для фундаментальной, так и для клинической медицины. Необходима разработка простых и надежных методов анализа, позволяющих быстро и эффективно оценивать активность клеток в реальном времени.

Цель – оценить эффективность использования метода интерференционной микроскопии в сравнении с классическими методами (ДНК-спектрометрия, ДНК-цитометрия и проточная цитофлуориметрия с использованием интернализированной флуоресцентной метки CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester)) при оценке индуцированной фитогемагглютинином (ФГА) пролиферации лимфоцитов крови человека.

Материал и методы. ФГА-индуцированную пролиферативную активность лимфоцитов крови 10 здоровых добровольцев оценивали с использованием различных методических подходов. Бласт-трансформацию лимфоцитов вызывали их инкубацией в течение 5 суток в присутствии 5 мкг/мл ФГА. Пролиферативную активность клеток оценивали 1) методом ДНК-метрии – в специализированном планшете Tecan NanoQuant Plate™ путем измерения оптической плотности, на планшет-ридере Infinite 200 Pro; 2) методом цитофотометрии с последующим анализом распределения клеток по содержанию дезоксирибонуклеиновой кислоты

(ДНК) после окраски красителем Фельгена с помощью системы визуализации на базе светового микроскопа Olympus BX41, видеокамеры ProgRes CF; 3) методом проточной цитометрии с использованием интернализированной флуоресцентной метки CFSE, анализ проводили на проточном цитометре BD FACS Calibur; 4) измерением параметров интерференционного профиля лимфоцитов при помощи модуляционного интерференционного микроскопа МИМ-340 («Швабе», Россия). В качестве критерия оценки функционального состояния лимфоцитов определяли функциональную активность ядра (англ. functional activity of the nucleus, FAN).

Результаты. Инкубация лимфоцитов с ФГА приводила к увеличению линейного размера клеток на $22,2 \pm 2,8\%$ мкм, уменьшению фазовой высоты на $46,3 \pm 4,7\%$ нм ($p = 0,019$) и увеличению FAN на $75,9 \pm 9,4\%$ по сравнению с контролем ($p = 0,046$). По данным спектроскопии выделенной ДНК, стимуляция лимфоцитов ФГА сопровождалась увеличением количества ДНК на 55% по сравнению с исходным значением (до $409,8 \pm 22,3$ против $264,3 \pm 25,0$ нг/мкл, $p = 0,049$). Реакция Фельгена выявила, что в контрольной выборке ядра, содержащие ДНК в количестве, превышающем $2n$, составляют 2%, а в выборке активированных ФГА лимфоцитов – 14,8% с разницей между группами 12,8%. Окраска лимфоцитов CFSE с последующей инкубацией проточной цитофлуориметрией культивированных клеток показала повышение процента пролиферирующих клеток с $1,68 \pm 0,9\%$ в контроле до

$55,56 \pm 5,6\%$ ($p = 0,00068$) под влиянием митогена.

Заключение. По сравнению с классическими методами оценки активности лимфоцитов метод модуляционной интерференционной микроскопии не требует пробоподготовки, показывает сопоставимую и даже большую эффективность, при этом позволяет изучать функциональное состояние лимфоцитов в реальном времени в динамике культивирования. Это открывает широкие возможности для оценки клеток иммунной системы в исследовательских и диагностических целях.

Ключевые слова: лимфоциты, пролиферация, модуляционная интерференционная микроскопия, проточная цитофлуориметрия, ДНК-цитофотометрия, ДНК-спектрофотометрия

Для цитирования: Сустретов АС, Богуш ВВ, Гусева ОС, Ильясов ПВ, Лимарева ЛВ. Сравнение методов модуляционной интерференционной микроскопии, ДНК-спектрометрии, ДНК-цитометрии и проточной цитофлуориметрии при оценке индуцированной фитогемагглютинином активности лимфоцитов крови человека. Альманах клинической медицины. 2021;49(6):412–418. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-054.

Поступила 31.05.2021; доработана 19.11.2021; принята к публикации 22.11.2021; опубликована онлайн 06.12.2021



Исследование структурных особенностей и функционального состояния клеток иммунной системы имеет большое значение как для фундаментальной, так и для клинической медицины. В настоящее время разработан и клинически валидирован ряд методов оценки иммунного статуса, основанных на анализе популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациентов с помощью проточной цитофлуориметрии, а также на определении содержания различных молекул иммунной системы в биопробах методами иммуноферментного анализа. При этом методы оценки клеточных иммунных реакций *in vitro* применяют в рутинной диагностике гораздо реже прежде всего из-за технической сложности, длительной пробоподготовки, отсутствия стандартизации и, вследствие этого, довольно значительной вариабельности результатов.

В этой связи остается актуальным поиск быстрых, простых, поддающихся стандартизации инструментов анализа для практического использования в клеточной иммунологии [1–3]. Перспективными в этом плане представляются методы, базирующиеся на применении технологий лазерной интерференционной микроскопии, поскольку с их помощью можно за короткий промежуток времени оценивать фазовые характеристики лимфоцитов [4–7]. Данный вид лазерной микроскопии, совмещая возможности оптической и электронной микроскопии, позволяет работать с биологическими объектами в режиме реального времени. Применение модуляционной интерференционной микроскопии дает ряд преимуществ для медико-биологических исследований, обеспечивая возможность количественной и качественной оценки функциональной морфологии нативных клеток, неинвазивного исследования состояния биологических микрообъектов, мониторинга динамики внутриклеточных процессов, при этом не требует фиксации, окрашивания и других процедур пробоподготовки [8, 9].

Благодаря появлению отечественных лазерных интерференционных микроскопов количество научных публикаций с описанием изменения фазовых параметров клеток крови при различной патологии растет. Однако при анализе литературы нами не были найдены данные сравнения эффективности метода модуляционной интерференционной микроскопии и классических методов оценки пролиферативной активности лимфоцитов *in vitro*.

Цель работы – оценить эффективность использования метода интерференционной микроскопии в сравнении с классическими методами (ДНК-спектрометрия, ДНК-цитометрия и проточная цитофлуориметрия с использованием интернализированной флуоресцентной метки CFSE) при оценке индуцированной фитогеммагглютинином (ФГА) пролиферации лимфоцитов крови человека.

Материал и методы

Была проведена оценка ФГА-индуцированной пролиферативной активности лимфоцитов с использованием различных методических подходов.

Постановка реакции бласт-трансформации лимфоцитов. Лимфоциты (моноклеарные лейкоциты крови) выделяли из гепаринизированной венозной крови 10 взрослых здоровых добровольцев методом градиентного центрифугирования, используя раствор фиколла с плотностью 1,077 г/см³ («ПанЭко», Россия). Подсчет клеток и оценку жизнеспособности проводили в камере Горяева с окраской 0,1% трипановым синим, показатель жизнеспособности > 90% считали удовлетворительным. Затем лимфоциты инкубировали с ФГА производства «Sigma-Aldrich» (США) в концентрации 5 мкг/мл в течение 5 суток в полной питательной среде RPMI-1640 с L-глутамином, стрептомицином, herpes 20 мг/мл, 10% эмбриональной телячьей сывороткой («ПанЭко», Россия) при 37 °С и 5% CO₂. Посевная доза – 800 тыс./400 мкл. В качестве контроля использовали лимфоциты, инкубированные в полной питательной среде RPMI-1640 без добавления ФГА.

Измерение параметров интерференционного профиля лимфоцитов при помощи модуляционного интерференционного микроскопа МИМ-340 («Швабе», Россия). В основе метода лежит принцип измерения локальных фаз промодулированной объектом световой волны. Источник света – гелий-неоновый лазер с длиной волны 633 нм, увеличение в канале регистрации 500×. Суспензию лимфоцитов после активации помещали на зеркальное стекло, покрывали покровным стеклом, затем определяли параметры интерференционного профиля. Проводили измерение 50–100 исследуемых клеток. В качестве критерия оценки функционального состояния лимфоцитов определяли функциональную активность ядра (англ. functional activity of the nucleus, FAN) как величину, обратно пропорциональную фазовой высоте (англ. phase thickness, PT) каждой клетки в выборке, характеризующую конформационное

Сустретов Алексей Сергеевич – науч. сотр. лаборатории иммунологии и молекулярной генетики¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3021-2130>

Богущ Ванда Витальевна – науч. сотр. лаборатории иммунологии и молекулярной генетики¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7597-449X>

Гусева Ольга Сергеевна – канд. вет. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биохимии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0499-4631>

Ильясов Павел Владимирович – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории биохимии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1532-0272>

Лимарева Лариса Владимировна – д-р биол. наук, доцент, директор¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4529-5896>
✉ 443079, г. Самара, ул. Гагарина, 20, Российская Федерация. Тел.: +7 (846) 374 10 04 (доб. 42 07, 42 04). E-mail: l.v.limareva@samsmu.ru

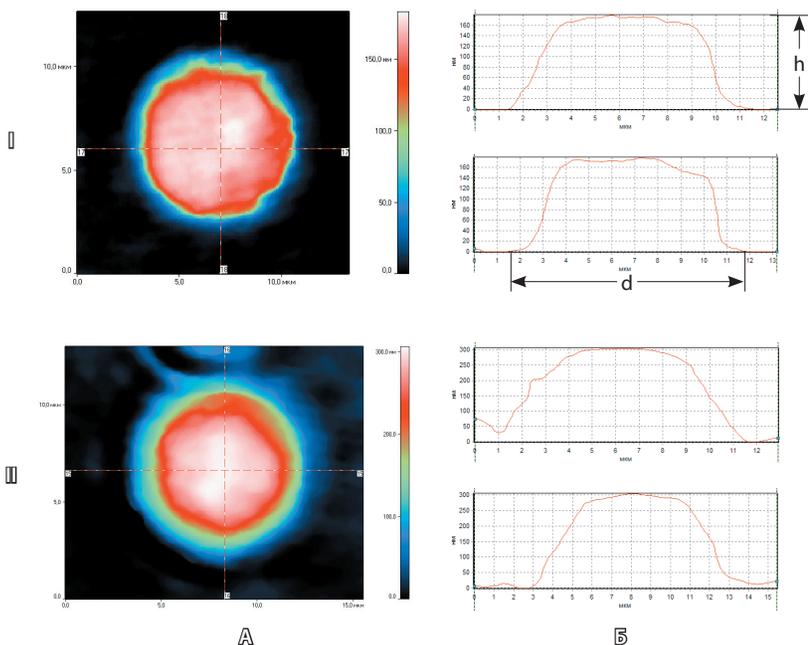


Рис. 1. Топограмма (А) и фазово-интерференционный профиль (Б) лимфоцита. I – индукция фитогемагглютинином в течение 5 суток, II – контроль; d – диаметр клетки, h – фазовая высота

состояние нуклеолярных белков и степень деконденсации хроматина по формуле: $FAN = (3 \times n_3 + 2 \times n_2 + n_1 + 0 \times n_0) / n$, где n_3 – количество клеток с $PT \leq 150$ нм; n_2 – с $PT > 150$, но ≤ 200 нм; n_1 – с $PT > 2$, но ≤ 250 нм; n_0 – с $PT > 250$ нм; n – число клеток в выборке [10].

Применяли следующие методы ДНК-метрии.

Спектрофотометрия ДНК. Выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из суспензии лимфоцитов после инкубации выполняли с использованием набора ДНК-Экспресс Кровь (ООО «Литех», Россия). Далее 2 мкл раствора выделенной ДНК переносили в лунки специализированного планшета Tecan NanoQuant Plate и измеряли

оптическую плотность при длине волны 260 нм на планшет-ридере Infinite 200 Pro с использованием программного обеспечения Tecan i-control, получая на выходе значение концентрации ДНК нг/мкл.

Реакция Фельгена – цитофотометрия с анализом распределения клеток по содержанию ДНК после окраски красителем Фельгена. Реакция основана на свойстве реактива Шиффа (фуксинсернистая кислота) взаимодействовать с альдегидными группами молекулы ДНК, предварительно подвергшейся гидролизу соляной кислотой [11]. Дальнейшую денситометрию ядер проводили при увеличении $\times 100$ с помощью системы визуализации на базе светового микроскопа Olympus BX41, видеокамеры ProgRes CF с использованием программы «Морфология 5.2» («ВидеоТест», Санкт-Петербург, Россия).

Метод проточной цитометрии с использованием интернализованной флуоресцентной метки CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester). Окрашивание лимфоцитов CFSE («Sigma», Германия) перед инкубацией проводили, используя концентрацию 2,5 мкг/мл в диметилсульфоксиде. Анализ выполняли на проточном цитометре BD FACS Calibur с помощью программы Cell Quest Pro.

Полученные данные статистически обрабатывали с использованием пакета Statistica 6.0 (StatSoft, США). Данные представляли как среднее и стандартное отклонение. Для оценки количественных переменных использовали расчет U-критерия Манна – Уитни. Различия при $p \leq 0,05$ считали статистически значимыми.

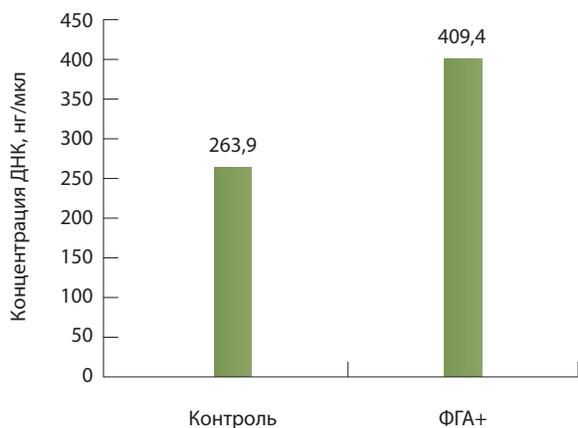
Результаты

Метод модуляционной интерференционной микроскопии

На топограммах контрольных лимфоцитов четко выявлялись ядро, ядрышко с однородной, близкой к кольцевой, структурой и цитоплазма (рис. 1, IА). Фазовая высота любой мононуклеарной клетки зависит в первую очередь от степени упаковки хроматина в ядре и активности процессов белкового синтеза. Таким образом, фазовая высота – объективный количественный параметр, отражающий степень активации лимфоцитов и позволяющий регистрировать процесс в самой ранней фазе. Максимальная фазовая высота у контрольных лимфоцитов достигала 242 нм при среднем диаметре $9 \pm 0,1$ мкм (рис. 1, IБ).

Активация ФГА приводила к изменениям интерференционного профиля лимфоцитов: фазовая высота снижалась минимально до 130–135 нм, а диаметр увеличивался до $11,0 \pm 0,5$ мкм

Рис. 2. Репрезентативная гистограмма содержания ДНК лимфоцитов в ответ на действие митогена фитогемагглютинина (ФГА) (5 мкг/мл); Контроль – полная культуральная среда без ФГА, ФГА+ – лимфоциты с добавлением митогена (коэффициент вариации $\leq 1,899\%$)



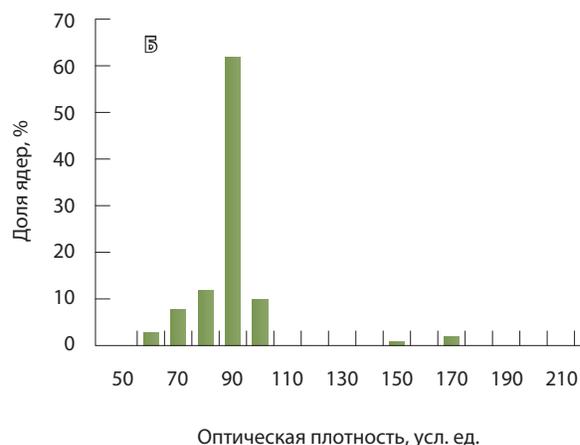
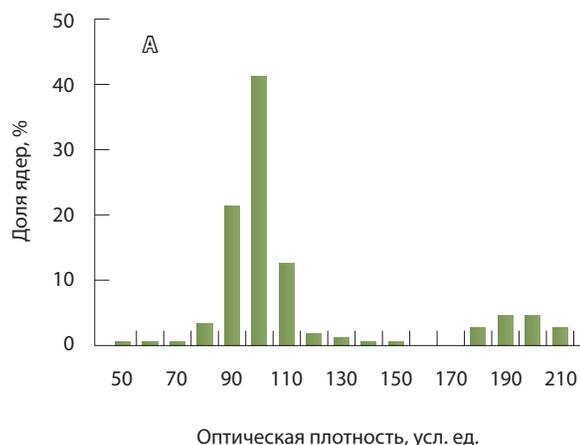


Рис. 3. Репрезентативная гистограмма распределения ядер лимфоцитов по оптической плотности. Окраска по Фельгену. **А** – реакция бласт-трансформации лимфоцитов с фитогемагглютинином (ФГА, 5 мкг/мл, 5 суток). 14,8% ядер с содержанием ДНК более 150 усл. ед.; **Б** – контроль: среда без ФГА. 2% ядер с содержанием ДНК более 150 усл. ед.

(рис. 1, Б). При этом для топограмм активированных лимфоцитов (рис. 1, А) было характерно увеличение диаметра ядрышек и изменение их структуры. Эти изменения можно объяснить данными по электронной микроскопии лимфоцитов, полученными в работе [7], которые указывают на то, что при активации клетки в ядре происходит перераспределение гетерохроматина к периферии, заметное снижение его электронной плотности, а в ядрышке идентифицируются множественные фибриллярные центры, окруженные плотным фибриллярным и гранулярным компонентом.

Показатель FAN в группе контроля составил $1,53 \pm 0,02$, в опытной группе – $2,05 \pm 0,05$. Инкубация лимфоцитов с ФГА приводила к увеличению линейного размера клеток на $22,2 \pm 2,8\%$ мкм, уменьшению фазовой высоты на $46,3 \pm 4,7\%$ нм ($p=0,019$) и увеличению FAN на $75,9 \pm 9,4\%$ по сравнению с контролем ($p=0,046$), что свидетельствует о более предпочтительном использовании показателя FAN для оценки ФГА-индуцированной пролиферации лимфоцитов.

Методы ДНК-метрии

Измерение выделенной ДНК. На рис. 2 представлены репрезентативные результаты изменения содержания ДНК в лимфоцитах в ответ на действие митогена ФГА. При анализе выборки были получены следующие данные, отражающие пролиферативную активность клеток: стимуляция лимфоцитов ФГА сопровождалась увеличением количества ДНК на 55% – до $409,8 \pm 22,3$ нг/мкл по сравнению с исходным значением $264,3 \pm 25,0$ нг/мкл ($p=0,049$).

Реакция Фельгена. На рис. 3 отражены репрезентативные результаты денситометрии ядер лимфоцитов, окрашенных по Фельгену, после активации ФГА.

При анализе контрольной выборки было получено унимодальное распределение, для активированных ФГА лимфоцитов было характерно бимодальное распределение. Обращает на себя внимание тот факт, что моды в зоне диплоидных клеток не совпадают, мода выборки активированных лимфоцитов смещена относительно контрольных показателей вправо, в сторону больших значений. По-видимому, это происходит вследствие разницы скорости гидролиза ДНК в плотных и очень рыхлых ядрах [12]. Это не мешает сравнению выборок в тех случаях, когда распределения в зоне диплоидных и тетраплоидных ядер не накладываются частично друг на друга, но затрудняет анализ при их перекрытии. В контрольной выборке ядра, содержащие ДНК в количестве, превышающем $2n$ (более 150 усл. ед.), составляют 2%, а в выборке

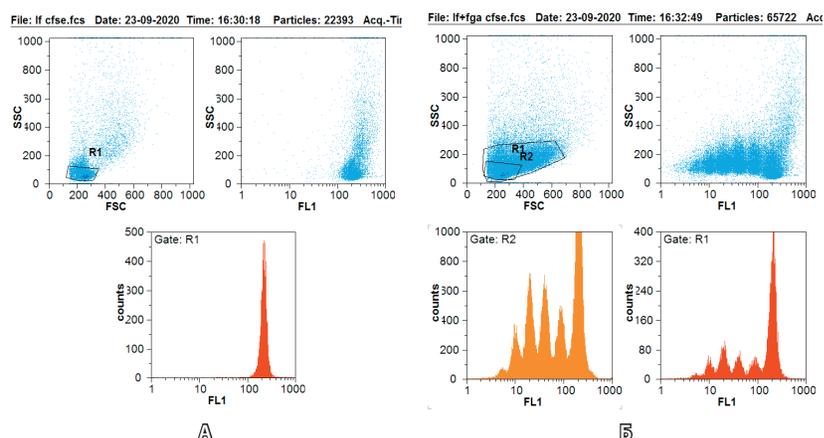


Рис. 4. Репрезентативные гистограммы распределения лимфоцитов по параметрам рассеяния и по интенсивности флуоресценции CFSE. **А** – контрольные лимфоциты, **Б** – фитогемагглютинин (ФГА)-индуцированные. R1 – гейт стандартной по параметрам светорассеяния области лимфоцитов, R2 – гейт по области всех лимфоцитов, включая ФГА-активированные



Интенсивность флюоресценции CFSE в лимфоцитах по пикам, отражающим генерации клеток, %

Лимфоциты	1-й пик (максимальная флюоресценция)	2-й пик	3-й пик	4-й пик	5-й пик	6-й пик (минимальная флюоресценция)
Контроль	98,5 ± 1,9	1,68 ± 0,9	–	–	–	–
ФГА+	36,9 ± 4,8	11,2 ± 1,9	15,3 ± 1,2	18,1 ± 2,0	8,3 ± 0,5	1,6 ± 0,4

ФГА+ – индукция фитогемагглютинином

Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения (M ± SD)

активированных ФГА лимфоцитов – 14,8%. Разница между группами – 12,8%. При этом распределения диплоидных и тетраплоидных ядер не перекрываются, что делает возможным сравнение их количества. Результаты денситометрии ядер лимфоцитов, окрашенных по Фельгену, позволили оценить степень ФГА-индуцированной активации лимфоцитов, однако для проведения полноценного статистического анализа требовались измерения в нескольких сотнях ядер, что достаточно трудозатратно и неэффективно.

Проточная цитометрия с использованием CFSE. CFSE представляет собой интернализуемую флюоресцентную метку, способную пассивно проникать внутрь клетки. Конъюгат красителя с белками, который формируется в меченых клетках, сохраняется этими клетками в течение всего развития, а также во время мейоза. Метка равномерно передается дочерним клеткам после клеточного деления и никогда не передается соседним клеткам в культуре. При делении концентрация метки в дочерних клетках снижается ровно в 2 раза, и интенсивность флюоресценции, соответственно, тоже, что проявляется дискретным снижением интенсивности флюоресценции первого канала при анализе на проточном цитофлюориметре. К важным достоинствам CFSE следует отнести высокую интенсивность флюоресценции красителя на одну молекулу, устойчивость и способность равномерно распределяться в цитоплазме дочерних клеток при делении [13, 14].

На характерной для спонтанной пролиферации лимфоцитов гистограмме А (контроль), представленной на рис. 4, показано, что практически все лимфоциты (99,1%) характеризуются исходной максимальной интенсивностью свечения в первом пике, в течение 5 суток выявлена лишь одна генерация (0,8% лимфоцитов). На рис. 4Б выявляется облако стимулированных ФГА лимфоцитов с высокими показателями прямого и бокового светорассеяния, а на гистограмме по первому каналу флюоресценции (соответствует CFSE) присутствуют 6 дискретных пиков,

отражающих 5 циклов деления активированных клеток.

В целом при использовании прединкубационной окраски лимфоцитов CFSE с последующей проточной цитофлюориметрией культивированных клеток установлено, что без стимуляции ФГА в среднем пролиферировали лишь 1,68 ± 0,9% лимфоцитов, а при митогенной стимуляции процент поделившихся клеток составил 55,56 ± 5,6% (p = 0,00068) (таблица).

Обсуждение

Наши исследования подтвердили возможность использования метода интерференционной микроскопии для изучения активности лимфоцитов. Данные, полученные разными лабораториями, совпадают [10]. Среди преимуществ метода следует выделить отсутствие специальной пробоподготовки, быструю оценку исследуемого образца, а также изучение нативных образцов в реальном времени с возможностью дальнейших манипуляций и наблюдением в динамике воздействия.

Проведенный анализ различных методических подходов для оценки ФГА-индуцированной активации лимфоцитов показал, что наиболее эффективными, хорошо воспроизводимыми и максимально автоматизированными являются методы проточной цитометрии с использованием флюоресцентных красителей, позволяющие оценивать пролиферационный потенциал клеток. Микроспектрофотометрия выделенной ДНК дает приемлемый результат, но воспроизводимость метода зависит от чистоты выделения ДНК (примеси белка и РНК влияют на показатели). Цитофотометрия с помощью реакции Фельгена дает значительно более низкую повторяемость, позволяет в большей степени проводить качественную оценку, но остается трудозатратным и длительным методом оценки пролиферативной активности. При этом данные методы не подходят для оценки лимфоцитов в динамике наблюдения, так как после пробоподготовки и анализа клетки становятся нежизнеспособными.



Заключение

По сравнению с классическими методами оценки активности лимфоцитов метод модуляционной интерференционной микроскопии не требует пробоподготовки, показывает сопоставимую и даже большую эффективность, при этом

позволяет изучать функциональное состояние лимфоцитов в реальном времени в динамике культивирования. Это открывает широкие возможности для оценки клеток иммунной системы как в исследовательских, так и в диагностических целях. ☺

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

А.С. Сустретов – сбор и обработка материала, проведение лабораторных исследований, анализ и интерпретация полученных данных;

В.В. Богуш – проведение лабораторных исследований, анализ результатов; О.С. Гусева – анализ и интерпретация результатов, статистическая обработка данных, написание и редактирование текста; П.В. Ильясов и Л.В. Лимарева – концепция и дизайн исследования, редактирование и утверждение итогового варианта текста рукописи. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Литература / References

1. Семикина ЕЛ, Родионова ТВ, Закиров РШ, Филянская ЕГ, Маянский НА. Методические возможности оценки активации лимфоцитов in vitro. *Иммунология*. 2014;35(2):85–88. [Semikina EL, Rodionova TV, Zakirov RS, Filyanskaya EG, Mayanskiy NA. [Methodical possibilities of evaluating the activation of lymphocytes in vitro]. *Immunology*. 2014;35(2):85–88. Russian.]
2. Dyck L, Mills KHG. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol*. 2017;47(5):765–779. doi: 10.1002/eji.201646875.
3. Herzig MC, Delavan CP, Jensen KJ, Cantu C, Montgomery RK, Christy BA, Cap AP, Bynum JA. A streamlined proliferation assay using mixed lymphocytes for evaluation of human mesenchymal stem cell immunomodulation activity. *J Immunol Methods*. 2021;488:112915. doi: 10.1016/j.jim.2020.112915.
4. Lee KR, Kyoohyun K, Jung J, Heo J, Cho S, Lee S, Chang G, Jo Y, Park H, Park Y. Quantitative phase imaging techniques for the study of cell pathophysiology: from principles to applications. *Sensors (Basel)*. 2013;13(4):4170–4191. doi: 10.3390/s130404170.
5. Гизингер ОА, Левкова ЕА, Савин СЗ. Использование модуляционной интерференционной микроскопии в задачах прикладной иммунологии. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2020;24(2):168–175. doi: 10.22363/2313-0245-2020-24-2-168-175. [Gizinger OA, Levkova EA, Savin SZ. [Use of modulation interference microscopy in applied immunology]. *RUDN Journal of Medicine*. 2020;24(2):168–175. Russian. doi: 10.22363/2313-0245-2020-24-2-168-175.]
6. Лопарев АВ, Игнатъев ПС, Индукаев КВ, Осипов ПА, Мазалов ИН, Козырев АВ. Высокоскоростной модуляционный интерференционный микроскоп для медико-биологических исследований. *Измерительная техника*. 2009;(11):60–64. [Loparev AV, Ignat'ev PS, Indukaev KV, Osipov PA, Mazalov IN, Kozyrev AV. [Modulation interference microscope with high speed for biomedical research]. *Measurement Techniques*. 2009;(11):60–64. Russian.]
7. Kyselá K, Philimonenko AA, Philimonenko VV, Janáček J, Kahle M, Hozák P. Nuclear distribution of actin and myosin I depends on transcriptional activity of the cell. *Histochem Cell Biol*. 2005;124(5):347–358. doi: 10.1007/s00418-005-0042-8.
8. Василенко ИА, Метелин ВБ, Игнатъев ПС, Кардашова ЗЗ, Лифенко РА. Диалог с клеткой: диагностическая real-time технология на основе лазерной интерферометрии. *Альманах клинической медицины*. 2018;46(8):748–757. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-748-757. [Vasilenko IA, Metelin VB, Ignat'ev PS, Kardashova ZZ, Lifenko RA. [A dialogue with the cell: diagnostic real-time technology based on laser interferometry]. *Almanac of Clinical Medicine*. 2018;46(8):748–757. Russian. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-748-757.]
9. Habaza M, Kirschbaum M, Guernth-Marschner C, Dardikman G, Barnea I, Korenstein R, Duschl C, Shaked NT. Rapid 3D Refractive-Index Imaging of Live Cells in Suspension without Labeling Using Dielectrophoretic Cell Rotation. *Adv Sci (Weinh)*. 2016;4(2):1600205. doi: 10.1002/adv.201600205.
10. Гаспарян СА, Попова ОС, Василенко ИА, Хрипунова АА, Метелин ВБ. Оценка фенотипа интерфазных ядер лимфоцитов методом количественного фазового имиджинга (QPI) у пациенток с эндометриодными кистами яичников. *Альманах клинической медицины*. 2017;45(2):109–117. doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-109-117. [Gasparyan SA, Popova OS, Vasilenko IA, Khripunova AA, Metelin VB. [Evaluation of the lymphocyte interphase nuclei phenotype by quantitative phase imaging (QPI) in patients with endometrial ovarian cysts]. *Almanac of Clinical Medicine*. 2017;45(2):109–117. Russian. doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-109-117.]
11. Шмаров ДА, Погорелов ВМ, Козинец ГИ. Современные аспекты оценки пролиферации и апоптоза в клинико-лабораторной диагностике (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013;(1):36–39. [Shmarov DA, Pogorelov VM, Kozinets GI. [The actual aspects of evaluation of proliferation and apoptosis in clinical laboratory diagnostic: a review]. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2013;(1):36–39. Russian.]
12. Vulkov I. [Ultrastructure of the lymphocytic nucleus under the effect of phytohemagglutinin stimulation]. *Eksp Med Morfol*. 1975;14(2):65–75. Bulgarian.
13. Quah BJC, Parish CR. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *J Vis Exp*. 2010;(44):2259. doi: 10.3791/2259.
14. Azarsiz E, Karaca N, Ergun B, Durmuscan M, Kutukculer N, Aksu G. In vitro T lymphocyte proliferation by carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester method is helpful in diagnosing and managing primary immunodeficiencies. *J Clin Lab Anal*. 2018;32(1):e22216. doi: 10.1002/jcla.22216.



Comparison of modulation interference microscopy, DNA spectrometry, DNA cytometry, and flow cytofluorimetry in the assessment of phytohemagglutinin-induced activity of human blood lymphocytes

A.S. Sustretov¹ • V.V. Bogush¹ • O.S. Guseva¹ • P.V. Iliasov¹ • L.V. Limareva¹

Rationale: The study of the structural particulars and functional state of immune cells and primarily lymphocytes is of great importance for both fundamental and clinical medicine. It requires the development of simple and reliable analytic methods that would allow for fast and effective real-time assessment of cell activity.

Aim: To evaluate the effectiveness of the interference microscopy compared to DNA spectrometry, DNA cytometry, and flow cytometry with an internalized fluorescent label CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) in the assessment of PHA-induced proliferation of human blood lymphocytes.

Materials and methods: Phytohemagglutinin (PHA)-induced proliferative activity of blood lymphocytes from 10 healthy volunteers was studied with various methodological strategies. Blast transformation of lymphocytes was induced by their incubation for 5 days with PHA 5 µg/mL. The cell proliferative activity was assessed as follows: 1) by DNA spectrometry at 260/280 nm using Tecan Infinite 200 Pro with a specialized NanoQuant Plate™; 2) by cytophotometry followed by cell distribution analysis assessing deoxyribonucleic acid (DNA) content after staining with Felgen's dye with an imaging system based on an Olympus BX41 light microscope with a ProgRes CF camera; 3) by flow cytometry using an internalized fluorescent label CFSE; the analysis was performed with a BD FACS Calibur flow cytometer; 4) by measurement of the lymphocyte interference profile with a modulation interference microscope MIM-340 (Schwabe, Russia). The functional activity of the nucleus (FAN) was determined and used as a criterion for assessment of the lymphocyte functional state.

Results: Incubation of lymphocytes with PHA led to an increase in the linear size by $22.2 \pm 2.8\%$, a decrease in phase height by $46.3 \pm 4.7\%$ ($p=0.019$), and an increase in FAN by $75.9 \pm 9.4\%$,

vs control ($p=0.046$). As measured by isolated DNA spectroscopy, PHA stimulation of lymphocytes was associated with an increase in the amount of DNA by 55% vs baseline (409.8 ± 22.3 ng/µL and 264.3 ± 25.0 ng/µL, respectively, $p=0.049$). Felgen's reaction revealed that the proportion of nuclei containing more than 2n DNA was 2% in the control cells and 14.8% in the PHA-activated lymphocytes, with a difference between the groups of 12.8%. CFSE staining with subsequent incubation and assessment by flow cytofluorimetry demonstrated an increase in the percentage of proliferating cells from $1.68 \pm 0.9\%$ in the control to $55.56 \pm 5.6\%$ ($p=0.00068$) in the mitogen-stimulated sample.

Conclusion: Modulation interference microscopy does not require the sample preparation and demonstrated comparable and even higher effectiveness compared to conventional methods for assessment of lymphocyte activity. At the same time, it allows for evaluation of the lymphocyte functional state in real time in the process of cultivation. This opens ample opportunities for evaluation immune cells for research and diagnostic purposes.

Key words: lymphocytes, proliferation, modulation interference microscopy, flow cytofluorimetry, DNA cytophotometry, DNA spectrophotometry

For citation: Sustretov AS, Bogush VV, Guseva OS, Iliasov PV, Limareva LV. Comparison of modulation interference microscopy, DNA spectrometry, DNA cytometry, and flow cytofluorimetry in the assessment of phytohemagglutinin-induced activity of human blood lymphocytes. *Almanac of Clinical Medicine*. 2021;49(6):412–418. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-054.

Received 31 May 2021; revised 19 November 2021; accepted 22 November 2021; published online 6 December 2021

Aleksey S. Sustretov – Research Fellow, Laboratory of Immunology and Molecular Genetics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3021-2130>

Vanda V. Bogush – Research Fellow, Laboratory of Immunology and Molecular Genetics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7597-449X>

Olga S. Guseva – PhD (in Vet.), Senior Research Fellow, Laboratory of Biochemistry¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0499-4631>

Pavel V. Iliasov – PhD (in Biol.), Leading Research Fellow, Laboratory of Biochemistry¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1532-0272>

Larisa V. Limareva – Doctor of Biol. Sci., Associate Professor, Director¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4529-5896>

✉ 20 Gagarina ul., Samara, 443079, Russian Federation. Tel.: +7 (846) 374 10 04, ext. 42 07, 42 04. E-mail: l.v.limareva@samsmu.ru

Conflict of interests

The authors declare no obvious and potential conflict of interests associated with the manuscript.

Authors' contribution

A.S. Sustretov, data collection and management, laboratory studies, analysis and interpretation of the results; V.V. Bogush, laboratory studies, analysis of the results; O.S. Guseva, analysis and interpretation of the results, statistical analysis, text writing and editing; P.V. Iliasov and L.V. Limareva, the study concept and design, editing and approval of the final version of the manuscript. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work have been appropriately investigated and resolved.

¹Institute for Experimental Medicine and Biotechnology of Samara State Medical University; 20 Gagarina ul., Samara, 443079, Russian Federation