

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ КАК СОВРЕМЕННЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Хайдуков С.В.¹, Зурочка А.В.²

¹ Институт Биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

² ГОУ ВПО Челябинская государственная медицинская академия РОСЗДРАВА, г. Челябинск

Резюме. 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. В данной статье отображены основные направления развития проточной цитометрии и применение ее в медико-биологической практике. 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. Использование моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами, в свою очередь, привело к развитию многопараметрового анализа и значительно упростило работу специалистов в диагностике различных нарушений иммунной системы.

Появление новых направлений в проточной цитометрии, таких как проточная цитоэнзимология, открывает широкие перспективы для дальнейшей идентификации поврежденных или измененных клеток, и позволяют принимать адекватные решения по лечению выявленных патологических изменений.

Авторы предполагают, что данная статья послужит началом серии публикаций по применению данной технологии и современных ее приложений в широкой лабораторной практике.

Ключевые слова: проточная цитометрия, сортировка, многопараметровый анализ, моноклональные антитела, флуорохромы.

Khaidukov S.V., Zurochka A.V.

FLOW CYTOMETRY AS A MODERN ANALYTICAL TOOL IN BIOLOGY AND MEDICINE

Abstract. Flow cytometry is considered as a modern technology for fast measurements of cellular characteristics, their organelles, and processes occurring within them. It is regarded as an efficient solution in many important areas of cell biology, immunology and cellular engineering. Present article bears on main developments in flow cytometry and their applications in medical and biological practice. Usage of modern achievements in fluorescent dyes, progress in laser and computer technologies, as well as potent software, resulted in wide application of this technique in medical practice. Accordingly, usage of monoclonal antibodies conjugated to different fluorochromes has led to elaboration of multiparametric analysis and did sufficiently simplify specialized works aimed for diagnostics of various immune disorders. The new directions in flow cytometry, e.g., flow cytoenzymology, provide wide opportunities for detailed identification of damaged or altered cells, and taking adequate decisions in treatment of detected pathological changes. The authors suggest that this article could initiate a series of publications concerning usage of this technology and its modern applications in broad laboratory practice. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 4-5, pp 373-378)

Адрес для переписки:

Хайдуков Сергей Валерьевич
Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии Наук
117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Тел.: (495) 336-02-55, +7 (985) 103-41-62.
E-mail: khsv@mail.ibch.ru; khsergey54@mail.ru

Проточная цитометрия как современная технология быстрого измерения характеристик клеток, направленная в сторону их автоматизации, появилась в результате естественного развития традиционных гистохимических и цитохимических методов анализа. Созданная для ускорения анализа в клинической цитологии и цитодиагностике, эта технология постепенно развивалась

в эффективный подход к решению многих важных задач биологии клетки, иммунологии, клеточной инженерии и т.д. [2].

Проточная цитометрия базируется на всем арсенале современных цитохимических флуоресцентных методов анализа структурных компонентов клеток их антигенов и внутриклеточных процессов. От классической цитохимии проточную цитометрию отличает высокая производительность. Так, исследуются выборки от нескольких тысяч до нескольких миллионов клеток, что гарантирует статистическую достоверность результатов [8]. В свою очередь, от классической биохимии и молекулярной биологии современную цитометрию отличает возможность анализировать не усредненные молекулярные характеристики по всей популяции, а индивидуальные параметры для каждой из клеток [14].

Можно отметить существование двух направлений: проточная цитометрия и проточная цитометрия-сортировка. Первое представляет собой чисто аналитический подход, второе позволяет отобрать интересующие исследователя субпопуляции клеток, основываясь на аналитических возможностях первого, и в дальнейшем проводить работу с отобранными субпопуляциями. Хотя в последнее время позиции проточных цитометров как сортировщиков несколько поколебались за счет появления магнитной сепарации [5], но целый ряд научных исследований невозможен без их использования. К таким исследованиям можно отнести сортировку индивидуальных хромосом [13], получение тетраном [16], получение трансфицированных клонов суперпродукторов с GFP [17] и др.

Две существенные особенности проточной цитометрии делают этот метод особенно ценным для клинической практики:

- во-первых, этот метод позволяет охарактеризовать гетерогенные клеточные популяции по фенотипу, а при использовании ДНК-цитометрии [3] — и генотипу входящих в них клеток. Анализы такого рода служат для выявления отклонений, происходящих в процессе онкогенеза. Большинство современных применений цитометрии связано, в первую очередь, с анализами именно такого рода [1];

- во-вторых, это способность обнаружить и охарактеризовать редкие события, т.е. встречающиеся с частотой 10^{-5} – 10^{-7} , что возможно благодаря его огромной производительности [8, 16]. Так, современные цитометры могут регистрировать несколько параметров для каждой отдельной клетки со скоростью до 10 000 клеток в секунду [15].

Основной принцип проточной цитометрии очень прост. Через проточную ячейку движется постоянный ток изотонического раствора под

определенным давлением, который называется «обжимающим». Внутри проточной ячейки находится зонд, из которого подается образец, содержащий клетки. Условия подобраны таким образом, что за счет разницы давления в зонде и «обжимающей» жидкости происходит гидродинамическое фокусирование струи в струе, и клетки за счет этого выстраиваются друг за другом. В определенном месте клетки пересекают луч света, и здесь происходит считывание информации [15].

Какие же параметры клеток можно измерять, используя проточную цитометрию, и какую информацию несет это исследователю? Во-первых, это рассеяние света под малыми углами (1 – 10°). Этот параметр используется для определения размеров клеток. Во-вторых, рассеяние света под углом 90° . Использование этого параметра позволяет судить о соотношении размеров ядра и цитоплазмы, а также о неоднородности или гранулярности цитоплазмы. И наконец, третий параметр — это измерение интенсивности флуоресценции изучаемого объекта. Следует отметить, что именно способность анализировать интенсивность флуоресценции сделала метод проточной цитометрии высокоинформативным и широко применяемым.

Современные цитометры, как правило, оборудованы несколькими фотоэлектронными умножителями (ФЭУ), что позволяет одновременно регистрировать несколько типов флуоресценции. Кроме этих основных параметров, существует возможность измерять поляризацию флуоресценции и время пролета частицы через зону анализа. Первое позволяет исследователю судить о степени вязкости мембран клеток, которая меняется в зависимости от их функционального состояния, а второе — о степени асимметричности клеток или исследуемых органелл [15].

В связи с возможностями приборов области применения проточной цитометрии стали весьма разнообразны. Сначала интенсивно развивались способы количественного анализа внутриклеточных компонентов, таких как ДНК и РНК [15]. Работа в данном направлении привела исследователей к разработке различных методик анализа параметров клеточного цикла. В свою очередь, это послужило фундаментом для разработки методик диагностирования делящихся клеток и клеток с аномальным содержанием ДНК [3]. Для этих целей используют такие флуоресцентные красители, как иодид пропидия, Hoechst, 7-амино-актиномицин D (7-AAD) и целый ряд других [2].

Информация, извлекаемая из сигналов светорассеяния и измерения времени пролета клеток через зону анализа, позволила исследователям

судить о морфологических характеристиках клеток (размере, отношении размеров ядра и цитоплазмы, гранулярности цитоплазмы, степени асимметрии клеток). В свою очередь, это привело к возможности типировать клетки без применения флуоресцентных красителей, что особенно ценно при работе с периферической кровью. Примером может служить одновременное измерение рассеяния света клетками под малыми углами ($1-10^\circ$) и под углом 90° . Данный подход позволяет разделить и расположить в виде гистограммы лейкоциты периферической крови на три группы клеток: лимфоциты, моноциты и гранулоциты [4].

Однако современная диагностика гематологических заболеваний не ограничивается только клиническим анализом форменных элементов крови. В дополнении к этому анализу появилась возможность выявления патологий на клеточном и мембранном уровне.

Развитие гибридной технологии привело к тому, что у исследователей появился в руках такой инструмент, как моноклональные антитела (МА) [11]. МА предоставили возможность типировать клетки не только благодаря их морфологическим различиям, но и за счет набора поверхностных антигенов и рецепторов, характерных для строго определенных клеток и их функционального состояния. Однако в различных лабораториях мира были получены МА к одним и тем же антигенам, и авторы присвоили им свои собственные названия. Это привело к тому, что в литературе возникла путаница — исследователи говорили об одних и тех же антигенах клеточной поверхности, но называли их разными именами. Чтобы избежать этого, в начале 80-х годов было создано международное рабочее совещание по антигенам лейкоцитов человека. Было предложено объединить МА в группы или кластеры исходя из того, какую антигенную структуру на клеточной поверхности они распознают. Таким образом, первоначальный смысл понятия «кластер дифференцировки» (Cluster of Differentiation, CD) — это набор МА, которые распознают одну и ту же структуру на клеточной поверхности независимо от эпитопной специфичности [11].

Со временем это понятие видоизменилось, и многие исследователи понимают под CD саму структуру на клеточной поверхности. Исходя из изложенного выше, становится понятно, что для эффективного использования МА должны быть кластеризованы, т.е. внесены в реестр известных МА и отнесены к определенному кластеру дифференцировки. Для этого каждые МА должны пройти проверку в нескольких независимых лабораториях, где должно быть пока-

зано, что они взаимодействуют с определенными клетками и распознают определенную структуру на их поверхности. Совещания, посвященные этим вопросам, проходят с периодичностью в несколько лет и на них исследователи вносят на рассмотрение своих коллег все новые и новые МА. Некоторые из них распознают уже известные структуры, но встречаются такие, которые взаимодействуют с неизвестными ранее. В настоящее время известно 339 кластеров дифференцировки клеток человека.

Использование МА революционизировало подходы к типированию клеток, и в настоящее время большинство клинических применений проточной цитометрии выполняется именно с их помощью. Меченые флуорохромами МА позволяют проводить как качественный, так и количественный анализ поверхностных и внутриклеточных антигенов.

На сегодняшний день ряд фирм предлагают широкий спектр МА, позволяющих определять поверхностные антигены или кластеры дифференцировки лейкоцитов человека. Эти МА используются для типирования лейкоемий и опухолей, определения аутоиммунных и иммунодефицитных заболеваний, исследования активации Т-, В-клеток, натуральных киллеров и моноцитов/макрофагов и др. Кроме этого, последние достижения в области флуоресцентных красителей позволяют значительно повысить информативность получаемых результатов. Так, использование нескольких МА, меченых различными флуоресцентными красителями, позволяет в одном эксперименте получать информацию сразу о нескольких антигенах на поверхности клеток и, как следствие этого, дает возможность исследователю судить о субпопуляционном составе клеток и наличии различных аномалий, а также об активности клеток внутри одной субпопуляции.

В качестве примера можно привести использование таких красителей, как флуоресцеин (FITC), фикоэритрин (PE) и так называемый краситель с переносом энергии (ECD). Первые два возбуждаются одной и той же линией спектра испускаемой аргоновым лазером, т.е. 488 нм, но испускают свет в различных областях спектра: первый — 515-525 нм, а второй — 575-585 нм, что позволяет развести их флуоресценцию по разным фотоэлектронным умножителям. В третьем случае используется так называемый эффект переноса энергии. На МА ковалентно пришивается сразу два красителя, в данном случае это фикоэритрин и Техасский красный. Фикоэритрин возбуждается аргоновым лазером и испускает кванты света в более высоковольтном диапазоне, это, в свою очередь, вызывает возбуждение молекулы

ТАБЛИЦА 1. ФЛУОРОХРОМЫ, НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ИСПОЛЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПРЯМОЙ КОНЪЮГАЦИИ С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

Флуорохромы	Длина волны возбуждения (нм)	Эмиссия (нм)
Флуоресцеинизотиоцианат (FITC)	488	525
Алекса Флуор 488 (Alexa Fluor 488)	488	525
Фикоэритрин (PE, R-PE, RD1)	488	575
ECD (PE-Texas Red)*	488	610
PC5 (PE/CY5)*	488	675
PC5.5 (PE/CY5.5)*	488	700
PE Alexa Fluor 700*	488	725
PC7 (PE/CY7)	488	790
Алофиоцианин (APC)	633/635	680
Alexa Fluor 647	633/635	680
Alexa Fluor 700	633/635	725
APC Alexa Fluor 700*	633/635	725
APC7 (APC/CY7)*	633/635	790

Примечания: CY – цианин; * – tandemные флуоресцентные красители

Техасского красного, который, в свою очередь, испускает кванты света в еще более дальней области спектра (610–635 нм) – именно они и регистрируются инструментом. Таким образом, если мы имеем МА к CD3, CD4 и CD8, меченые этими флуорохромами, мы можем сразу количественно охарактеризовать содержание в периферической крови Т-клеток, Т-хелперов и Т-цитотоксических. По аналогичному принципу работает и комплекс фикоэритрина и цианина-5 (CY5) и целый ряд других tandemных красителей, но испускание кванта света происходит в еще более дальней красной области спектра (670 нм и больше), чем у Техасского красного (табл. 1).

Поскольку современные цитометры, как правило, оборудованы более чем тремя фотоэлектронными умножителями (от 3 до 9 ФЭУ), это позволяет на одном образце периферической крови проанализировать практически все основные субпопуляции клеток [6, 11].

Наличие на рынке большого выбора МА, меченых различными флуорохромами, дает возможность исследователю подобрать такой набор МА, чтобы на меньшем количестве образцов получить максимальную информацию. Все это привело к формированию многопараметрового анализа в цитометрии [6].

В проточной цитометрии начало развиваться как отдельное направление исследование

ТАБЛИЦА 2. СИНТЕТИЧЕСКИЕ СУБСТРАТЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Субстраты	Ферментативная специфичность
A•Aminopeptidase M	Aminopeptidase M
AAPL•Elastase	Leukocyte & pancreatic elastases
AAPV•Elastase	Leukocyte & pancreatic elastases
AG•Cathepsin	Cathepsin B & C
Bu•Butyryl Esterase	a) Butyryl esterase b) Phospholipase A2
ClAc•Cl Acetate Esterase	Chloroacetate esterase
D•Aminopeptidase A	Aminopeptidase A
DCFH•Peroxidase	Process specific
DCFH, PMA•Oxidative Burst	Process specific
E. coli•Phagocytosis	Process specific
FDA•Esterase	Acetate esterase
FDA, NaF•Esterase	Acetate esterase
FR•Kallikerin	Kallikerin
G•Aminopeptidase	Aminopeptidases
Gal•Galactosidase	α & β galactosidase
GFGA•Collagenase	Galactosidases
GGL•Subtilisin	Subtilisin
GL•Cathepsin D	Cathepsin D
Glu•Glucosidase	B-glucosidase
Glucuronide•Glucuronidase	B-glucuronidase
GP•DPP IV	Dipeptidyl peptidase IV
GPLGP•Collagenase	Collagenases
K•Aminopeptidase B	Aminopeptidase B
KA•DPP II	Dipeptidyl peptidase II
L•Aminopeptidase	Aminopeptidases
LL•DPP I	Dipeptidyl peptidase I
LY•DPP I	Dipeptidyl peptidase I
LY•Calpain	Calpain
P•Pro Aminopeptidase	Prolyl Aminopeptidase
Palmitate•Alkyl Esterase	B1 & B2 Esterase
PO4•Acid Phosphatase	Acid Phosphatase
QS•Cathepsin	Cathepsin D
R•Aminopeptidase B	Aminopeptidase B
RGES•Elastase	Leukocyte & pancreatic elastases
TP•Cathepsin	Cathepsin C & G
VK•Cathepsin	Cathepsin D & B
VS•Cathepsin	Cathepsin D & B

активности внутриклеточных ферментов с помощью флуорогенных субстратов. Это направление получило название «проточная цитоэнзимология». Был разработан ряд реагентов, представляющих собой синтетические субстраты, которые могут быть использованы для измерения активности внутриклеточных ферментов (табл. 2). Они проникают через мембрану живой клетки и имеют большие преимущества перед синтезированными прежде субстратами, включая возросшую разрешающую способность и уменьшение времени анализа. Большое число новых субстратов позволяет оценивать активность значительно большего количества ферментов, чем было возможно. Важность применения их заключается в том, что при сравнении уровней активности ферментов нормальных клеток с уровнями активности в клетках, вовлеченных в процесс заболевания, могут быть обнаружены значительные различия, и это позволяет идентифицировать поврежденные или измененные клетки и исследовать протекающие в них процессы [10].

Целый набор различных флуорохромов сделал возможным количественное исследование таких физиологических параметров, как внутриклеточный pH (флуоресцеин и 7-гидроксикумарин), концентрация свободных ионов кальция (Fura-2, Indo-1, Fluo-3), уровень окислительных процессов, активация митохондрий, потенциал наружной мембраны клеток, процессы апоптоза, и т.д. [15].

Все новые и новые достижения в различных областях молекулярной биологии, биохимии и медицины позволяют изучать при помощи проточной цитометрии различные аспекты биологии клетки, такие как содержание секретируемых цитокинов в сыроворотке при помощи мультиплексного анализа [14], локализацию антигенспеци-

фических клонов клеток при помощи тетрамеров [19] и многое другое.

Кроме всего этого в настоящее время существуют методики, позволяющие при помощи проточной цитометрии измерять и такой физиологический параметр, как фагоцитоз, экспрессию цитокинов и др. Все это создает предпосылки для современных исследований всего комплекса внутриклеточных процессов на уровне отдельных клеток.

Таким образом, высокий уровень автоматизации, простота в эксплуатации и небольшие размеры современных приборов позволяют рассматривать их не только как исследовательские, но и как клиничко-диагностические.

Перечисленные возможности метода проточной цитометрии определяют следующие области его применения:

- клинические: иммунология, онкология, онкогематология (включая диагностику, оценку эффективности лечения, мониторинг пациентов, входящих в группу риска), трансплантология, общая гематология, диагностическое типирование клеток и др.;

- общебиологические: клеточная кинетика, клеточная энзимология, изучение механизмов действия различных иммуномодуляторов и других биологически активных веществ, клеточная физиология, генетика и др.

Очень важным разделом для биологии и медицины при появлении новых методик исследования является формирование нормативных показателей. Не является исключением и проточная цитометрия. Поэтому в заключение хотелось бы привести сравнительную таблицу распределения CD маркеров на поверхности клеток периферической крови здоровых доноров, полученных разными авторами (табл. 3) [7, 12, 20]. Остается открытым вопрос о Российских нормах, связан-

ТАБЛИЦА 3. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ВЗРОСЛЫХ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ ПО ЛИТЕРАТУРНЫМ ДАННЫМ [7, 12, 20] И ДАННЫМ АВТОРОВ (ПРОЦЕНТИЛИ 5%-95%)

Субпопуляции	Zidovec Lepej S. et al. (2003) n = 50	Pope V. et al. (1994) n = 246	Comans-Bitter W.M. et al. (1997) n = 51	Данные авторов (n = 356)
Т-лимфоциты (CD3 ⁺)	73,3 (59,0-88,2)	72,1 (54-85)	72 (55-83)	73 (61-85)
Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	43,8 (34,9-64,3)	44,1 (32-58)	44 (28-57)	45 (35-55)
Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	23,9 (11,0-37,1)	31,2 (19-44)	24 (10-39)	27 (19-35)
Т-активированные (CD3 ⁺ HLA-DR ⁺)	1,9 (0,5-25,9)	Нет данных	5 (2-12)	3 (0,5-6)
В-лимфоциты (CD19 ⁺)	9,7 (4,4-26,4)	13,3 (6-23)	12 (6-19)	12 (7-17)
NK-клетки (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	3,9 (0,4-19,3)	12,2 (5-23)	13 (7-31)	15 (12-18)

ных с региональными особенностями отдельных областей. Все это требует объединения усилий различных лабораторных коллективов в проведении исследований в данном направлении.

Авторы предполагают, что данная статья послужит началом серии публикаций по применению данной технологии и современных ее приложений в широкой лабораторной практике.

Список литературы

1. Луговская С.А., Почтарь М.Е., Тупицын Н.Н. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов. — М., Тверь: Триада, 2005. — 168 с.
2. Полетаев А.И. Проточная цитометрия и сортировка в цитологии, молекулярной биологии, биотехнологии и медицине / ИНТ серия «Общие проблемы физико-химической биологии». — М., 1989. — Т. 12. — 88 с.
3. Шмаров Д.А., Козинец Г.И. Лабораторно-клиническое значение проточно-цитометрического анализа крови. — М.: МИА, 2004. — 128 с.
4. Bossuyt X., Marti G.E., Fleisher T.A. Comparative analysis of whole blood lysis methods for flow cytometry // *Cytometry*. — 1997. — Vol. 30. — P. 124-133.
5. Chou T., Sano M., Ogura M., Marishima Y., Itagaki H., Takuda Y. Isolation and transplantation of highly purified autologous peripheral CD34⁺ progenitor cells: purging efficacy, hematopoietic reconstitution following high dose chemotherapy in patients with breast cancer: results of feasibility study in Japan // *Brest Cancer*. — 2005. — Vol. 12, N 3. — P. 178-188.
6. Claude L., Lobagiu C., Genin C. Enumeration of peripheral lymphocyte subsets using 6 vs. 4 color staining: a clinical evaluation of new flowcytometer // *Cytometry, Part B*. — 2005. — Vol. 70B. — P. 29-38.
7. Comans-Bitter W.M., de Groot R., van den Beemd R., Neijens H.J., Hop W.C., Groeneveld K., Hooijkaas H., van Dongen J.J. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations // *J. Pediatr*. — 1997. — Vol. 130, N 3. — P. 388-393.
8. Di Nicola M., Siena S., Bregni M., Peccatori F., Magni M., Ravagnani F., Zorzino L., Bonadonna G., Gianni A.M. Quantization of CD34⁺ peripheral blood hematopoietic progenitors for autografting in cancer patients // *Int. J. Artif. Organs*. — 1993. — Suppl. 5. — P. 80-82.
9. Llorente L., De La Fuente H., Richaud-Patin Y., Alvarado-De La Barrera C., Diaz-Borjon A., Lopez-Ponce A., Lerman-Garber I., Jakez-Ocampo J. Innate immune response mechanisms in non-insulin dependent diabetes mellitus patients assessed by flow cytometry // *Immunol. Lett.* — 2000. — Vol. 74, N 3. — P. 239-244.
10. Leucocyte typing VI / Ed. Kishimoto K. et al. — Garland Publishing, Inc. N. Y. & L., 1997. — P. 1342.
11. Luider J., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service // *Lab. Hematol.* — 2004. — Vol. 10. — P. 102-108.
12. Pope V., Larsen S.A., Rice R.J., Goforth S.N., Parham C.E., Fears M.B. Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocyte immunophenotypes in persons infected with *treponema pallidum* // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 1994. — Vol. 1, N 1. — P. 121-124.
13. Rack K.A., Harris P.C., MacCarthy A.B., Boone R., Raynham H., McKinley M., Fitchett M., Towe C.M., Rudd P., Armour J.A.L., Lindenbaum R.H., Buckle V.J. Characterization of three de novo derivative chromosomes 16 by «reverse chromosome painting» and molecular analysis // *Am. J. Hum. Genet.* — 1993. — Vol. 52. — P. 987-997.
14. Sack U., Scheibe R., Wotzel M., Hammerschmidt S., Kuhn H., Emmrich F., Hoheisel G., Wirtz H., Gessner C. Multiplex analysis of cytokines in exhaled breath condensate // *Cytometry*. — 2006. — Vol. 69, Iss. 3. — P. 169-172.
15. Shapiro H.M. Practical flow cytometry. — WILEY-LISS, Inc., N.Y., Chichester, Brisbane, Toronto & Singapore, 1995. — P. 542.
16. Stratieva-Taneeva P.A., Khaidukov S.V., Kovalenko V.A., Nazimov I.V., Samochvalova L.V., Nesmeyanov V.A. Bispecific monoclonal antibodies to human Interleikin 2 and horseradish peroxidase // *Hybridoma*. — 1993. — Vol. 12, N 3. — P. 271-284.
17. Teixeira G., Lenormand B., Jean P., Fardoun D., Sumereau-Dassin E., Bastit D., Tilly H., Piguet H., Monconduit M., Vannier J.P. Immunological evaluation of harvested stem cells obtained by leukapheresis after chemotherapy // *Am. J. Hematol.* — 1992. — Vol. 39, N 3. — P. 172-175.
18. Xian H.-Q., McNichols E., St. Clair A., Gottlieb D.I. A subset of ES-cell-derived neural cells marked by gene targeting // *Stem Cells*. — 2003. — Vol. 21. — P. 41-49.
19. Xu L., Zha Q., Sun H., Jia Q., Li F., He X. Preparation and characterization of HLA-A*0201 tetramer loaded with IE-1316-324 antigenic peptide of human cytomegalovirus // *Cell Mol. Immunol.* — 2006. — Vol. 3, N 5. — P. 367-371.
20. Zidovec Lepej S., Vince A., Rakušić S., Paković Rode O., Sonicki Z., Jeren T. Center for disease control (CDC) flow cytometry panel for human immunodeficiency virus infection allows recognition of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus or Cytomegalovirus // *Croat. Med. J.* — 2003. — Vol. 44. — P. 702-706.

поступила в редакцию 28.04.2007
принята к печати 14.05.2007