

МЕТОДЫ СКРИНИНГА ЖИВЫХ КЛЕТОК

©2018 г. А. А. ГОРДЕЕВ, А. Б. ЧЕТВЕРИН

Институт белка РАН, Пущино, Московская область

I. Введение. II. Методы скрининга, основанные на 2D-формате презентации клеток. III. Методы скрининга, основанные на 1D-формате презентации клеток. IV. Технология слитых гелей. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Под скринингом живых клеток, как правило, понимают процесс поиска клеток с определенными свойствами среди большой гетерогенной популяции, анализ распределения клеток в таких популяциях, либо исследование влияния разнообразных условий на поведение клеток. Различные методы скрининга клеток находят широкое применение в таких областях биологии и медицины, как диагностика различных заболеваний, контроль качества воды и продуктов питания, поиск ранее неизвестных микроорганизмов, оценка и мониторинг физиологии и функционирования клеток, исследование продуктов жизнедеятельности клеток, таких как ферменты и антибиотики, разработка новых лекарственных препаратов. Большинство существующих методов скрининга клеток использует либо двумерный формат (2D), либо одномерный (1D) формат презентации клеток. Рассмотрению особенностей этих двух форматов посвящен данный обзор.

II. МЕТОДЫ СКРИНИНГА, ОСНОВАННЫЕ НА ДВУМЕРНОМ ФОРМАТЕ ПРЕЗЕНТАЦИИ КЛЕТОК

2D-формат скрининга основан на иммобилизации клеток на поверхности плоской подложки. Каждая из них занимает уникальное положение и может быть неоднократно исследована, это обеспечивает надежную идентификацию клеток по морфологии или другим признакам, с ними можно проводить различные манипуляции, и, если это позволяет данная технология, клонировать.

Адрес для корреспонденции: aagordeev@gmail.com.

Работа выполнена при поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и РФФИ (проект №16-34-00594)

МЕТОДЫ НА ОСНОВЕ ВЫРАЩИВАНИЯ КОЛОНИЙ

*Колонии клеток на поверхности подложки
(твердой питательной среды)*

Такой подход был впервые реализован Р. Кохом [1], применившим выращивание бактериальных колоний на поверхности плотных питательных желатиновых и агаровых пластинок для скрининга бактерий с целью получения чистых культур возбудителей различных заболеваний. Это дало мощный толчок в развитии медицины и микробиологии, были получены и исследованы возбудители многих болезней [2]. После того, как Р. Петри ввел в микробиологическую практику стеклянные чашки [3], метод почти не менялся, и его продолжают широко использовать и в настоящее время. Несмотря на свою простоту и надежность, данный метод имеет существенный недостаток – низкую разрешающую способность. На стандартной чашке Петри диаметром 100 мм, как правило, удается разрешить не более 1000 колоний. При высокой плотности засева часть колоний сливается, наблюдается эффект ингибирования роста близкорасположенных колоний [4, 5]. Поэтому для надежности детекции и подсчета колоний рекомендуется давать на чашку не более 250–300 колониобразующих единиц [5, 6]. При этом, как правило, скринингу подвергаются относительно небольшие популяции, не превышающие нескольких тысяч или десятков тысяч клеток [7–13]. Это связано в первую очередь с тем, что ручной анализ большого количества чашек Петри трудоемок и занимает много времени. Так Маулли [14] указывает, что на скрининг библиотеки, состоящей из ~96 000 клонов, при высеве на чашку не более 300 колоний, понадобилось несколько месяцев работы одного человека. Однако в ряде случаев бывает необходимо проанализировать популяции, состоящие из нескольких сотен тысяч клеток. Такие задачи возникают, например, при скрининге геномных библиотек, полученных путем случайного мутагенеза определенного белка [15, 16], либо метагеномных библиотек [17–19]. Для решения этих задач желательным является оптимизировать процедуру скрининга.

Упростить процедуру позволяет её автоматизация. На сегодня предложено несколько моделей [20–23], основанных на фотографировании чашек с колониями и последующем анализе изображений при помощи специального программного обеспечения. Такой подход позволяет увеличить численность анализируемой клеточной популяции. Так, Джу и соавторами [24] с использованием такого подхода была проанализирована библиотека, состоящая из 200 000

клеток. Имеется несколько коммерчески доступных автоматических счетчиков клеток (например, ColonyQuant фирмы Schuett, серия Scan фирмы Interscience). По заявленным производителями данным, такие приборы позволяют анализировать до 6 чашек Петри в минуту.

Другой способ повысить производительность метода чашек Петри – увеличить разрешающую способность, повысив плотность засева поверхности питательной среды колониями. При таком подходе на одной чашке выращивают до 5 тысяч колоний [25]. Колонии при этом вырастают мелкими, часть из них сливается. В этом случае речь уже не идет о точном подсчете каждой колонии, но появляется возможность путем беглого просмотра сотен тысяч колоний быстро находить по селективному признаку нужные редкие клоны [26]. Иногда для скрининга плотно расположенных мелких колоний используют микроскоп. Если микроскоп оснащен подходящими флуоресцентными фильтрами, то это дает возможность, помимо оптического увеличения, анализировать флуоресценцию колоний [15, 25].

Используя описанные выше подходы, как правило, удается анализировать библиотеки размером не более 10^6 клеток. Анализ библиотек такого размера позволяет найти нужные варианты, поскольку в большинстве случаев частота встречаемости искомым клеток выше 10^{-4} [8, 27]. Однако в случае, когда доля нужных клонов составляет 10^{-5} – 10^{-6} , в библиотеке из 10^5 – 10^6 клеток эти клоны являются единичными [28, 29], а с большой вероятностью могут даже не встретиться. Иногда нужные клоны составляют еще меньшую долю, и поиск таких клонов требует создания и анализа более крупных библиотек. В этом случае иногда применяют жесткую селекцию, создавая такие условия роста, когда размножаться и формировать колонии могут только искомые клетки. В этом случае на чашку Петри с селективной средой помещают до 10^7 клеток, но вырастают лишь одиночные колонии [30]. С использованием такого подхода удается анализировать библиотеки размером до $\sim 10^9$ клеток и искать клоны, частота встречаемости которых составляет 10^{-7} [31–34]. Несмотря на то, что этот подход действительно существенно повышает производительность, скрининг по способности размножаться используют не так часто, поскольку далеко не всегда удается разработать и осуществить селекционную процедуру, когда клетки могли бы расти, только обладая искомым признаком, например, определенной ферментативной активностью [35].

Особую проблему в молекулярной биологии составляет поиск редких клонов, содержащих в своем геноме определенную известную последовательность, которая фенотипически не проявляется, или её проявление трудно выявить. В случае небольших библиотек для этой

цели используют стандартные протоколы, основанные на поштучном анализе каждой колонии путем ПЦР или гибридизации. Однако при увеличении числа анализируемых клонов необходимы все большие трудовые и финансовые ресурсы, что делает стандартные подходы непрактичными. Поэтому при скрининге больших библиотек вводят стадию первичного грубого отбора, анализируя путем ПЦР не отдельные колонии, а целые пулы клонов, полученные смывом колоний с чашек. Пулы, которые дали положительный результат, далее вновь высевают на твердую питательную среду, но уже с меньшим количеством колоний на чашку. Затем вновь повторяют процедуру скрининга, и так до тех пор, пока не будут найдены отдельные нужные клоны [36, 37]. Преимуществом этой методики являются высокие чувствительность и эффективность, позволяющие за одну неделю проводить скрининг библиотек размером до 100 000 клеток. Однако анализ более крупных библиотек требует большего количества чашек и становится слишком трудоемким. Для скрининга таких библиотек был предложен схожий подход, в котором, однако, первые раунды скрининга проводили, выращивая колонии в пробирках в толще полужидкой легкоплавкой агарозы (рис. 1). Такая среда, с одной стороны – обеспечивает пространственное разделение колоний, с другой – позволяет легко перемешивать или центрифугировать клетки прямо в пробирке. На первом этапе 1 мл полужидкой среды содержит в среднем 1000 колоний, на каждом последующем этапе концентрацию колоний понижают на порядок. Скрининг библиотеки из 400 000 клонов занял у исследователей, предложивших этот подход, всего четыре дня [38]. Несмотря на свою высокую производительность, такой подход остается узкоспециализированным и малоприменимым для прямого скрининга по фенотипическим особенностям колоний. Действительно, на первых стадиях скрининга колонии, густо расположенные в толще среды, будут неизбежно перекрываться между собой и мешать наблюдению удаленных от стенок пробирки колоний.

Метод маленьких пластин Фроста

Все описанные выше подходы по процедуре получения колоний практически не отличаются от протокола, предложенного Кохом: клетки высевают на твердую питательную среду и выращивают; меняется только состав среды, размер чашек Петри или аналогичной им по функции посуды, плотность колоний, или вводится дополнительная стадия предварительного грубого скрининга. Существуют и более существенные модификации стандартного подхода. Так Фрост разработал метод маленьких пластин для быстрого подсчета жизнеспособных

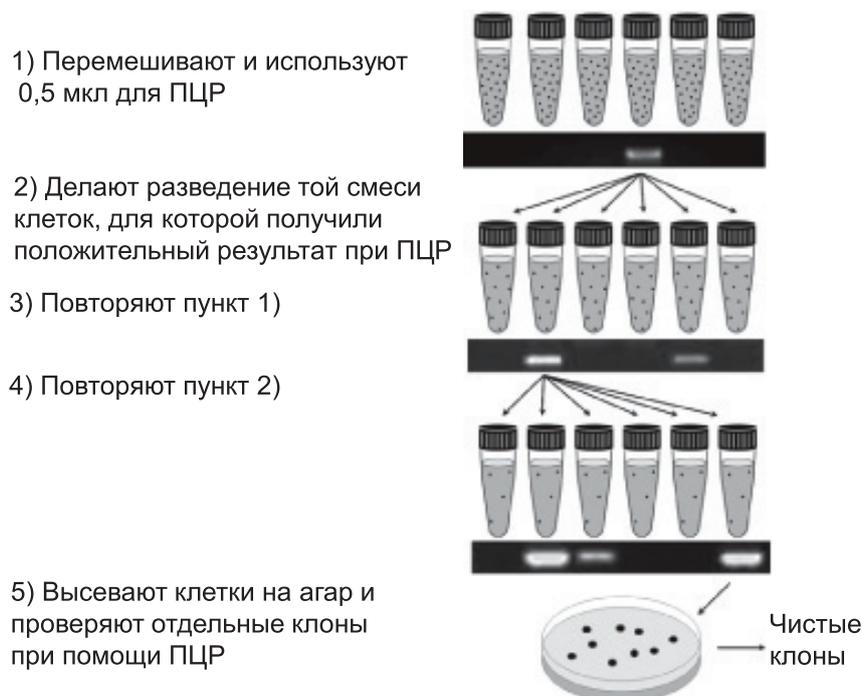


Рис. 1. Схема обогащения генных библиотек нужными клонами.

Смесь клонов, с которой получили нужный ПЦР-продукт, разводят в новых пробирках и подвергают следующему раунду культивации в геле и ПЦР-скринингу до тех пор, пока не будут получены индивидуальные клоны. Взято с изменениями из [38] с разрешения Elsevier, Copyright (2007).

бактериальных клеток [39–41]. Он смешивал каплю бактериальной суспензии с каплей расплавленного агара, распределял примерно 100 мкл смеси по покровному стеклу площадью 2 см × 2 см и давал агару застыть. Инкубация такого стекла во влажной камере в течение 3–6 часов приводила к появлению «лилипутских» бактериальных колоний, видимых при малом увеличении микроскопа. Диаметр таких колоний сопоставим с толщиной пленки геля, поэтому можно условно сказать, что они находятся в одной плоскости. Эти колонии при необходимости можно зафиксировать и окрасить прямо в геле. Позднее метод был усовершенствован Таннером, применившим новую процедуру окрашивания колоний и предложившим использовать стекла, имеющие бортики, ограничивающие область геля, что привело к большей стандартизации метода [42]. Метод маленьких пластинок

Фроста разработан в первую очередь для микробиологического анализа пищи, в частности, молока, молочных продуктов, образцов воды, а также смывов с овощей. Получаемые при помощи этого метода результаты хорошо коррелируют с результатами, полученными на традиционных чашках Петри [43–46]. Однако по сравнению со стандартным протоколом чашек Петри, метод маленьких пластинок Фроста на порядок сокращает время анализа образцов, позволяя проводить всю процедуру за один день; метод требует меньше материалов (посуды и сред), что актуально при рутинном анализе большого количества образцов [44, 47, 48]. Метод адаптирован не только для выращивания бактериальных колоний, но также колоний дрожжей и плесневых грибов [48]. Из известных недостатков метода следует отметить возможность формирования агрегатов из мёртвых клеток, которые часто присутствуют в анализируемых образцах (например, в пастеризованном или стерилизованном молоке); такие скопления в поле зрения микроскопа могут быть ошибочно приняты за растущие колонии, что приведет к искажению результатов микробиологического анализа [43]. Кроме того, хотя Фрост предлагал применять свой метод не только для скрининга колоний, но и отдельных клеток, при использовании этого метода исходные клетки исследуемого образца, случайно распределяясь по всей толще геля, находятся на разной глубине и не доступны для одновременного наблюдения и сравнения при помощи микроскопа.

МЕТОДЫ ПРЯМОГО НАБЛЮДЕНИЯ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ МИКРОСКОПА

Для прямого подсчета или наблюдения за каждой из многих клеток при помощи микроскопа существует ряд подходов, обеспечивающих выстраивание клеток в одной плоскости. К этим методам относят использование влажных препаратов, счетных камер, фильтрацию клеток на мембране, иммобилизацию на плоской подложке.

При использовании таких методов исследователь сразу видит клетки в анализируемом образце, то есть нет необходимости ждать, чтобы клетки, размножившись, сформировали видимую невооруженным глазом колонию, как это происходит в случае выращивания колоний на питательных средах. Как правило, некоторые клетки в образце образуют агрегаты или просто находятся близко друг к другу, при этом потомство этих клеток сольется в одну общую колонию. Прямые методы наблюдения позволяют исследовать все клетки образца, поэтому они чувствительней методов выращивания колоний [42, 49–51].

Прямые методы наблюдения намного удобней при исследовании гетерогенных по видовому составу популяций. Рост колоний разных видов микроорганизмов идет с разной скоростью, и одни колонии могут стать видимыми уже после суток роста, другие появятся лишь спустя несколько дней. Прямые методы наблюдения позволяют исследовать некультивируемые бактерии, то есть живые бактерии, колоний которых на агаре в лабораторных условиях получить невозможно или это трудновыполнимо [52–57]. Это особенно важно при исследовании образцов почвы и воды из природных источников, где доля микроорганизмов, детектируемых культивированием на агаре, может составлять менее 1% от всех микроорганизмов [58, 59].

Влажные препараты

Одними из первых для микроскопии живых бактериальных клеток стали применять влажные препараты (метод раздавленной капли или влажной камеры). Для приготовления влажных препаратов каплю образца помещают на чистую обезжиренную поверхность предметного стекла и накрывают её покровным стеклом. Для предотвращения вызываемого конвекцией движения жидкости, смещения или высыхания, зазор между покровным и предметным стеклами рекомендуется герметично заливать вазелином, «вазпаром» (смесь равных частей вазелина и парафина), воском или прозрачным лаком для ногтей [60, 61]. Для рассматривания влажных препаратов рекомендуется контрастная микроскопия. Многие подвижные микроорганизмы движутся очень быстро, что затрудняет точное наблюдение. Добавляя к суспензии микроорганизмов метилцеллюлозу, можно уменьшить скорость их движения и создать условия, при которых становится видимым движение жгутиков [62]. В центре влажного препарата быстро возникает недостаток кислорода. Это наблюдение позволило Пастеру открыть анаэробный обмен: наблюдая за влажным препаратом, он заметил, что облигатные анаэробы сохраняли подвижность только в центре, но не по краям [63]. Влажные препараты применяют для исследования не только бактерий, но и различных эукариотических клеток, начиная от представителей простейших и заканчивая клетками высших позвоночных [64–67]. Метод применяют как в диагностических целях – поиске патогенных возбудителей в различных клинических образцах, так и для решения научных задач, таких как: исследование гетерогенных микробных популяций, изучение подвижности бактерий [60], оценка состояния клеток в исследуемых образцах, в частности, оценка их жизнеспособности [68], исследование активности лейкоцитов [69, 70] и др.

Преимуществом метода влажных препаратов является простота приготовления препарата и быстрота проведения анализа. Недостатком метода является то, что от препарата к препарату меняется толщина слоя жидкости между стеклами, и этот параметр не удается контролировать. Из-за невозможности определить толщину препарата не удается вычислить концентрацию клеток в образце, а это бывает важно в диагностических процедурах. Кроме того, для выстраивания клеток в одной плоскости необходимо прижимать покровное стекло к предметному, при этом можно раздавить часть клеток, особенно в случае клеток животных, которые лишены клеточной стенки.

Счетные камеры

Эти проблемы позволяет решить использование счетных камер – специальных устройств для подсчета микроорганизмов, а также форменных элементов крови, мочи, спинномозговой жидкости и др. Впервые счетная камера была предложена физиологом Малассе в 1874 г. [71]. Счетная камера представляет собой толстое предметное стекло с углублением, на дне которого методом вакуумного напыления или гравировки нанесена счетная сетка; над углублением накладывают шлифованное покровное стекло. В зависимости от типа камер размер углубления по вертикали варьирует от 10 до 200 мкм. Постоянная высота камеры обеспечивается плотным притиранием покровного и предметного стекол до образования радужных ньютоновых колец (полосы интерференции) [71, 72].

Структурными элементами всех типов сеток являются большие и малые квадраты. Сетки различных типов – Тома, Бюркера, Предтеченского, Тюрка, Нейбауэра, Горяева, Нусбаума, Фукса-Розенталя и др. – отличаются площадью, различным числом и группированием больших и малых квадратов. Известные величины: высота камеры, площадь сетки и её делений, позволяют высчитать количество клеток в определенном объеме.

Различают открытые и закрытые счетные камеры. В закрытой камере покровное стекло притирают после её заполнения, при этом в препарат могут попасть пузырьки воздуха [71]. Раньше такие камеры использовали для анализа форменных элементов крови (камера Тома-Цейса) и спинномозговой жидкости (камера Дунгера), бактериальных суспензий [73, 74]; сейчас их место заняли камеры открытого типа. Закрытые камеры сегодня используются в основном для анализа вязких жидкостей. Так, например, счетная камера Маклера (рис. 2), глубина которой составляет 10 мкм, используется для анализа неразбавленной спермы: подсчета количества сперматозоидов, расчета

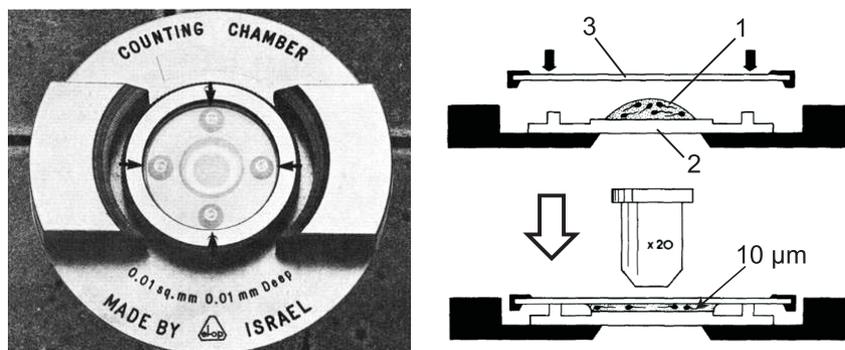


Рис. 2. Камера Маклера.

Фотография (слева) и принцип действия (справа) камеры Маклера. Каплю анализируемого препарата (1) наносят на поверхность сетки (2) и накрывают покровным стеклом (3). Взято с изменениями из [76] и [77] с разрешения Elsevier, Copyright (1980), Copyright (1984).

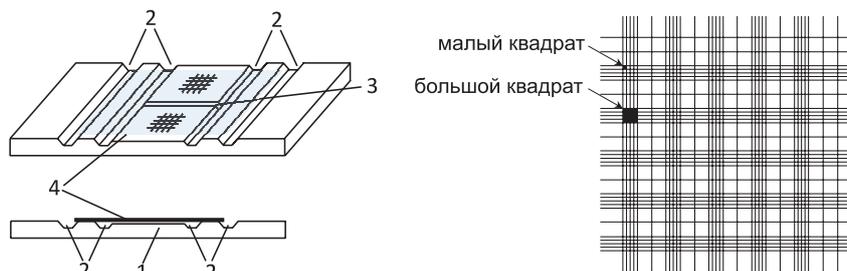


Рис. 3. Схема открытой счетной камеры для подсчета клеток.

Справа, сверху – общий вид; справа снизу – вид сбоку; слева – схема сетки Горяева.

- 1 – пластинки с выгравированными сетками;
- 2 – продольные желобки; средняя часть пластинки ниже боковых на 0,1 мм (глубина камеры) и разделена поперечным желобком (3);
- 4 – покровное стекло.

их концентрации и определения параметров подвижности [75–77]. Однако результаты, получаемые при помощи этой камеры, неточны и концентрация клеток часто получается завышенной [78–81].

Открытые камеры (рис. 3) впервые описал Алферов в 1883 г., затем в 1905 г. Бюркер [71]. Эти камеры заполняются после притирания покровного стекла. Каплю образца наносят на предметное стекло у самого края покровного стекла так, чтобы суспензия под действием капиллярных сил проникла в камеру [60, 72]. Поверхности с нане-

сенными сетками отграничены желобками одна от другой, а также от остальной части предметного стекла. Наличие желобков дает возможность регулировать заполнение камер. Подсчет клеток в камере начинают обычно не ранее, чем через 3 минуты после заполнения камеры – за это время происходит оседание клеток (время может зависеть от размера используемых клеток). Известно много разновидностей открытых камер, они различаются типом и числом сеток (от одной до десяти, но, как правило, две или четыре), глубиной камеры. Некоторые камеры (например, камера Гаусера) снабжены зажимами, фиксирующими покровное стекло. Сейчас широко применяются счетные камеры Фукса-Розенталя [82–86], Горяева [87–89], Тома [90, 91], Ньюбауэра [81, 92–94], Бюркера [95–97]. В России наибольшей популярностью пользуются камеры Горяева и Фукса-Розенталя. Камеру Горяева, как правило, используют для анализа форменных элементов крови. Камера Горяева (рис. 3) имеет объем 0,9 мкл, глубину 100 мкм, площадь сетки 9 мм². Сетка состоит из 225 больших квадратов (со стороной 200 мкм); из них 100 – пустые, 25 – разделены каждый на 16 малых квадратов (со стороной 50 мкм), 100 – разделены полосами. Камеру Фукса-Розенталя обычно используют для анализа клеток, присутствующих в спинномозговой жидкости, моче. Концентрация клеток в этих биологических жидкостях ниже, чем в крови, поэтому размер камеры Фукса-Розенталя больше, чем у камеры Горяева: объем – 3,2 мкл, площадь сетки – 16 мм², глубина – 200 мкм [71].

Использование обычных счетных камер затрудняет анализ бактерий, так как бактерии перемещаются вследствие броуновского движения; располагаются на разной глубине и долго не оседают. Для решения этих проблем используют мелкую открытую камеру Тома, имеющую глубину 10 мкм. Для уменьшения броуновского движения рекомендуется прибавлять 0,2%–0,5% гуммиарабика или 2%-ный раствор пептона [73].

Стоит отметить, что подсчет в счетных камерах не вполне точен. Ошибка метода составляет до 20% и зависит от нескольких факторов [71, 98]. Точность зависит от количества проанализированных и подсчитанных клеток. Считается, для того, чтобы результат подсчетов был достоверный, в пробе должно быть сосчитано не менее 100, желательнее 300–600 клеток [60, 99]. Кроме того, хотя счетные камеры имеют строго заданную форму, Норрис и Паэлл [100] обнаружили, что толщина слоя жидкости, заполняющей камеру, обычно больше номинальной глубины камеры. Такое различие, имеющее место и при наличии интерференционных колец, вызывается неплотным кон-

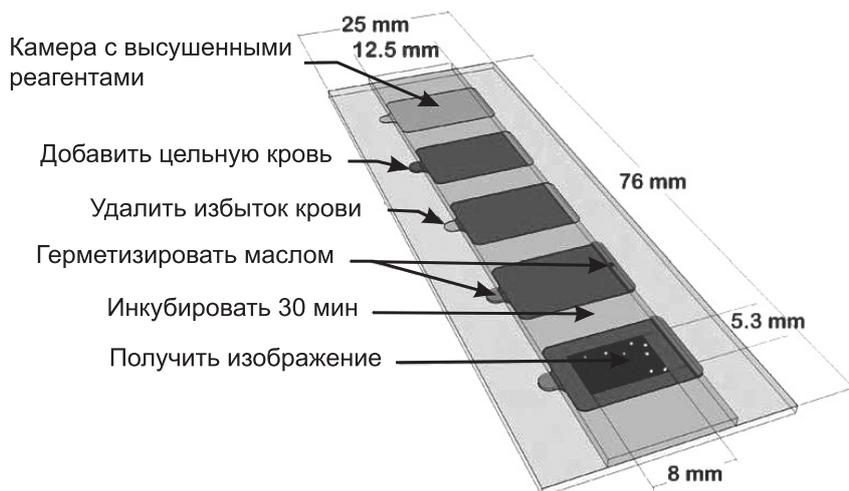


Рис.4. Схема использования двумерного микрофлюидного чипа.

Глубина (26,5 мкм) и форма камер определяются слоем клея между наложенными друг на друга предметными стеклами разного размера. Камеры содержат отверстия для ввода крови и выхода воздуха. Одна из внутренних поверхностей покрыта высушенным желатином, содержащим конъюгированные с флуорофором антитела для окраски клеток. Заполненную за счет капиллярного потока камеру герметизируют при помощи минерального масла. После 10–30 минутной инкубации получают флуоресцентные изображения для подсчета клеток. Взято с изменениями из [101, <http://dx.doi.org/10.1039/C1LC20565J>] с разрешения The Royal Society of Chemistry.

тактом покровного стекла с поверхностью счетной камеры. Авторы считают, что основная ошибка наблюдаемых при подсчетах числа живых клеток в счетных камерах объясняется этим фактом; они рекомендуют определять действительную толщину слоя суспензии в камере в каждом отдельном случае, пользуясь интерферометром. Помимо этого, к ошибкам может привести прилипание клеток к покровному стеклу и их агглютинация. Движение жидкости в камере сильно ограничено капиллярными силами, но из-за того, что глубина камеры в несколько раз превышает линейные размеры клеток, клетки не иммобилизованы в слое жидкости и могут менять свое положение.

Несколько модифицированной счетной камерой открытого типа можно считать микрофлюидный чип (рис. 4), предложенный М. Бекем и соавторами [101] и предназначенный для определения концентрации $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов в крови пациентов, инфицированных ВИЧ и проходящих антиретровирусную терапию. Чип изготовлен на предметном стекле и состоит из пяти одинаковых

камер, каждая площадью 130 мм² и глубиной ~ 25 мкм. На дне камер находится слой высушенного желатина толщиной 100–150 нм, содержащий набор флуоресцентно-меченных антител для окраски детектируемых клеток. После того, как за счет капиллярных сил камера заполняется образцом цельной крови, происходит высвобождение антител в кровь и окраска клеток. Далее делают снимок центральной части камеры и при помощи специального программного обеспечения проводят автоматический подсчет CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Полученные при помощи такого чипа данные сравнимы с результатами проточной цитометрии, традиционно используемой для таких задач. Но чип проще в использовании, не требует специального дорогостоящего оборудования, для проведения анализа достаточно капли неразбавленной крови пациента без предварительных обработок, которые могли бы привести к изменению концентрации клеток.

Скрининг клеток на мембране

Для анализа разбавленных суспензий микроорганизмов часто применяют фильтрование, пропуская образец, объем которого может достигать десятков миллилитров, через мембрану. Впервые такой подход был предложен в 1928 г. Н. Холодным [50, 58] для анализа бактериального планктона, при этом клетки с фильтра переносили на предметное стекло, и только после этого исследовали под микроскопом. Позднее А. Разумов [102] предложил смотреть клетки прямо на фильтре. Для лучшего наблюдения клеток применяют фазовое контрастирование [103] или окрашивание [104–106]. В случае флуоресцентного окрашивания, для получения более контрастных изображений используют мембраны с низкой автофлуоресценцией, изготовленные на поликарбонатной основе [107–110] или из оксида алюминия [111]. Для быстрой и простой идентификации различных бактерий, иммобилизованных на мембране, и оценки их метаболической активности разработана многоканальная система обработки изображений [112].

Недостатком метода является то, что при фильтрации клетки подвергаются воздействию давления, что может привести к их повреждению. Кроме того, существует ряд бактерий, называемых фильтруемыми, размеры которых меньше диаметра пор на фильтре [113, 114]. Такие бактерии, не будучи сорбированными на мембране, будут потеряны для исследователя [50]. Метод накладывает ограничения на манипуляции с клетками: если не использовать фиксацию клеток, которая ведет к их гибели, при интенсивных промывках часть клеток может быть смыта с фильтра и потеряна.

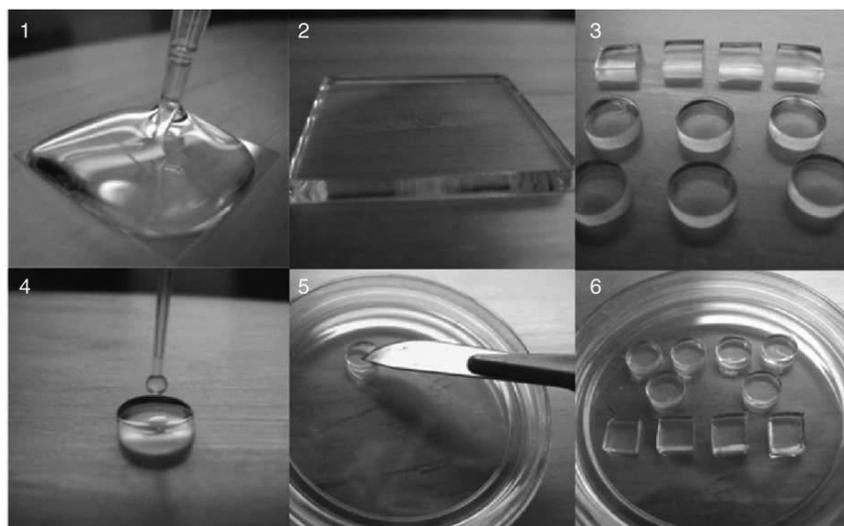


Рис. 5. Приготовление агарозных подушек.

1 – расплавленную агарозу выливают на покровное стекло; 2 – на агарозу помещают второе покровное стекло, получая «сэндвич» одинаковой толщины; 3 – извлекают агарозный слой и вырезают из него агарозные подушки; 4 – каплю суспензии клеток помещают на поверхность подушки; 5 – переворачивают подушку и переносят на чашку Петри для последующего наблюдения при помощи микроскопа; 6 – на одну чашку можно поместить много подушек. Взято с изменениями из [118, <https://www.nature.com/nprot/journal/v7/n1/full/nprot.2011.432.html>] с разрешения Macmillan Publishers Ltd: [*Nat. Protoc.*], Copyright (2012).

Метод агарозных подушек

Выстроить живые бактериальные клетки в одной плоскости и одновременно наблюдать за каждой из многих при помощи микроскопа позволяет метод агарозных подушек. Агарозные подушки изготавливают, заливая расплавленную агарозу, содержащую питательные вещества, на стекло, и далее сверху на жидкую агарозу помещают второе стекло (рис. 5; <http://www.youtube.com/watch?v=8IZmkPffMmg>). Полученный таким образом «сэндвич» охлаждают, позволяя агарозе застыть. Далее извлекают агарозный слой и вырезают из него фрагменты требуемого размера – эти фрагменты собственно и есть агарозные подушки. Небольшую каплю суспензии клеток помещают на такую подушку. Далее переносят подушку с суспензией на чашку Петри, переворачивая подушку (либо просто накрывают подушку с каплей сверху покровным стеклом) так,

что клетки оказываются фиксированными, будучи зажатыми между подушкой и поверхностью чашки Петри (либо покровного стекла) [115–118]. В состав агарозы можно ввести любые необходимые вещества – индукторы, ингибиторы, антибиотики, прижизненные красители и т.п., что позволяет экспериментатору в режиме реального времени наблюдать эффект от влияния различных химических соединений на синтез определенных белков или их локализацию [115]. В случае наблюдения за флуоресценцией клеток, для изготовления подушек по возможности используют компоненты с низкой автофлуоресценцией. Агарозные подушки довольно мягкие и не повреждают клетки при иммобилизации. Агарозная прослойка выступает как резервуар питательных веществ и содержит достаточное количество кислорода, чтобы клетки росли и делились, формируя колонии [118–121]. Если инкубация занимает больше нескольких часов, во избежание высыхания образца используют силиконовую смазку или парафин, иногда также используют специальные стекла, имеющие полости, содержащие дополнительный запас питательных веществ и кислорода [120]. При использовании агарозных подушек клетки могут делиться и формировать микроколонию. Нужно отметить, что в случае использования агарозных подушек, делящиеся клетки могут распространяться только вдоль границы подушки и покровного стекла геля, формируя таким образом некомпактные плоские колонии, которые быстрее, чем колонии на агаре, сливаются между собой. Недостатком метода является также то, что клетки остаются фиксированными только пока зажаты между стеклом и агарозной подушкой. Стоит отделить подушку, и клетки получают возможность перемещаться. Поэтому экспериментатор не имеет возможности отобрать интересующие его клетки или поменять клеточное окружение, удаляя или вводя новый компонент путем промывания геля.

Адгезивная иммобилизация клеток на подложке

Другой способ выстроить клетки в одной плоскости – иммобилизовать их на подложке за счет адгезии. Такой подход часто применяют при работе с клетками эукариот. За адгезию отвечают взаимодействия между поверхностными белками клеток и заряженными группами подложки. Прикреплённые таким образом к поверхности, покрытые питательной средой, многие эукариотические клетки способны расти и размножаться. Иммобилизованные клетки удобно исследовать при помощи микроскопа. Одними из первых появились подложки, изготовленные из стекла, целлофана, полиметилметакрилата и других пластмасс, при этом долгое время наиболее популярным

материалом оставалось стекло, так как оно было более доступно [122]. Стеклянные подложки до сих пор остаются одним из самых популярных способов иммобилизации клеток для микроскопических исследований [123–127].

Начиная приблизительно со второй половины 70-х годов для работы с клетками стали использовать полистирольную посуду. Полистирол обладает высокой оптической прозрачностью, из него легко изготовить посуду заданной формы, и он дешев. Сам по себе полистирол – гидрофобный материал, и клетки к нему крепятся плохо. Для придания адгезивных свойств, полистирол модифицируют химически (например, серной кислотой) или физически (воздействуют коронным электрическим разрядом, плазмой или радиацией), в результате на обработанной поверхности полистирола образуются сульфо-, гидроксильные, альдегидные, кетонные, карбоксильные и другие группы [128–130]. Конечно, поскольку клетки, расположенные на подложке, залиты средой, этот подход не обеспечивает полной иммобилизации клеток. Действительно, несмотря на то, что многие культуры в целом являются адгезивными, часть клеток культуры на некоторое время могут открепляться от субстрата и перемещаться в растворе.

Одним из ограничений этой техники является то, что она не может быть применена к неадгезивным, суспензионным типам клеток, таким как клетки крови (особенно иммуноциты), некоторые раковые клетки, стволовые клетки, каждая из которых важна в различных биологических и медицинских областях. Для решения этой задачи был разработан метод иммобилизации, использующий имеющий средство к мембране полиэтиленгликоль-липид (ПЭГ-липид), названный БАМ «биосовместимый анкер (якорь) для мембраны» (biocompatible anchor for membrane) [131, 132]. БАМ состоит из трех функциональных последовательно соединенных единиц: гидрофобной олеильной группы, гидрофильной ПЭГ-цепи, N-гидроксисукцинимидэфирной группой. Покрытое белком БСА стекло модифицируют при помощи БАМ, посредством образования амидной связи между аминокруппами белков и N-гидроксисукцинимидэфирной группами БАМ. Неадгезивные клетки иммобилизуют на БАМ-покрытой поверхности стекла за счет встраивания олеильного фрагмента БАМ в клеточную мембрану. При этом авторами метода показано, что такая иммобилизация не нарушает пролиферацию клеток.

Для иммобилизации бактерий, в частности клеток *E. coli*, используют стекла, покрытые поли-L-лизинном. После такой иммобилизации клетки можно подвергать промывкам и окрашиванию [133].

3D-культуры

При работе с клетками высших эукариот особую проблему составляет имитация условий клеточного микроокружения, присущего клеткам в многоклеточном организме. В многоклеточном организме развитие и нормальное функционирование клеток зависит от их взаимодействий с микроокружением, основу которого составляет внеклеточный матрикс (ВКМ). ВКМ состоит из ряда различных макромолекул, чья структурная целостность и набор выполняемых функций важны для поддержания нормальной архитектуры клеток в тканях, их развития и тканеспецифических функций [134]. Поэтому при изучении многих культур клеток для того, чтобы приблизить их окружение к физиологическому, а также для придания дополнительных адгезивных свойств, подложку покрывают компонентами ВКМ: коллагеном [135, 136], фибронектином [137–139], ламинином [137, 140], а также соединениями, являющимися производными ВКМ или имитирующими его, например: желатином [141, 142] или поли-D или поли-L-лизинном [143–145], и их комбинацией [146].

Еще лучшую имитацию *in vivo*-условий многоклеточного организма обеспечивают так называемые 3D-культуры (рис. 6) [147–150]. Этот подход основан на культивировании клеток погруженными в толщу ВКМ (данный подход по сути уже не относится к методам, основанным на 2D-формате презентации клеток, но все же разберем его в этом разделе как пример для сравнения). Впервые 3D-культура была применена в 1972 году для модельной системы фибробластных

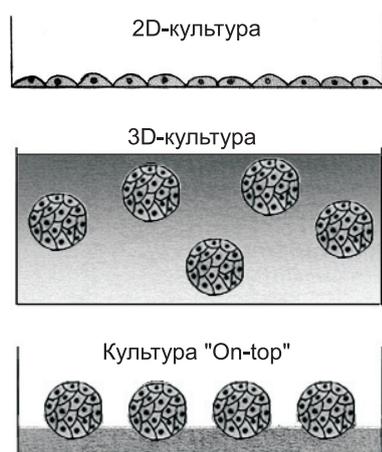


Рис. 6. Различные подходы к культивированию клеток эукариот.

клеток в организме и была основана на использовании коллагенового матрикса, полимеризованного *in vitro*, для формирования фибриллярной 3D-сети [151]. Сегодня известно, что в некоторых случаях ответ клеток на различные воздействия в 2D-культуре довольно сильно отличается от ответа клеток, находящихся *in vivo* или в 3D-культурах [152–155]. Частично это происходит потому, что физиология клетки определяется механическими свойствами ВКМ и физической и химической анизотропией [149, 156–158], которые совершенно различны в

2D- и 3D-культурах [152, 159, 160]. Поэтому 3D-культуры предпочтительнее 2D-культур в ряде областей, таких как: изучение дифференцировки стволовых клеток, морфогенеза тканей, биологии рака, взаимодействий «клетка–вирус» и основанных на клетках скрининге лекарственных препаратов и токсикологических дисплеях [147, 161, 162].

Однако 3D-культуры лишены ряда преимуществ, присущих 2D-культурам: клетки в 3D-культурах находятся на разной глубине. В результате этого клетки находятся в разных физиологических условиях по таким параметрам, как эффективность газообмена, снабжения питательными веществами и удаления продуктов жизнедеятельности. Кроме того, распределение клеток по всей толще 3D-матрикса затрудняет одновременный мониторинг, скрининг клеток и их отбор для дальнейшего использования [150, 155]. Другая возникающая проблема – сложность использования обычного микроскопа для мониторинга клеток, погруженных в сильно рассеивающую среду на разную глубину [152]. Обе эти проблемы частично преодолеваются использованием «поверхностных» («on-top») культур (рис. 6), когда клетки культивируют в жидкой среде прикрепленными к поверхности геля. Компоненты внеклеточного матрикса также добавляют в питательную среду, откуда эти компоненты частично оседают на поверхность геля с клетками. Это в некоторой степени имитирует условия 3D-культур [163, 164]. Однако в таком формате клетки и их потомство иммобилизованы ненадежно и перемещаются в окружающий раствор. Кроме того, перед тем как прикрепиться к поверхности геля, клетки, как правило, агрегируют друг с другом и могут неравномерно распределиться по поверхности геля [163].

III. МЕТОДЫ СКРИНИНГА, ОСНОВАННЫЕ НА ОДНОМЕРНОМ ФОРМАТЕ ПРЕЗЕНТАЦИИ КЛЕТОК

1D-формат презентации клеток состоит в том, что клетки последовательно проходят через детектор в потоке жидкости. Этот формат обеспечивает высокую пропускную способность, с его помощью удается анализировать тысячи клеток в секунду.

Впервые идею такого подхода предложил Молдаван в 1934 году [165]. Он предложил пропускать суспензию клеток под давлением через тонкую трубку, находящуюся в поле зрения микроскопа. Фотоэлектрический прибор, установленный на окуляр микроскопа, должен был регистрировать прохождение каждой клетки через капилляр. Но данный прибор, по всей видимости, так и не был построен [166]. В

последующие десятилетия было создано несколько инструментов для подсчета частиц в суспензии [167–169].

СЧЕТЧИК КОУЛТЕРА

Одной из наиболее удачных первых моделей проточного цитометра стало устройство, запатентованное в 1953 г. У. Коултером [170] и названное позднее счетчиком Коултера. Принцип работы этого устройства основан на пропускании под давлением суспензии клеток в растворе электролита сквозь ячейку, через которую пропускают слабый электрический ток. Проходя через отверстие, клетка увеличивает сопротивление в ячейке, что приводит к кратковременному падению силы тока. Концентрацию клеток определяют, подсчитывая количество таких импульсов во время пропускания определенного объема. Величина и форма импульса зависят от размера клетки, позволяя, таким образом, определять распределение клеток и других частиц в образце по линейному размеру или объему [72, 171]. Счетчики Коултера с момента их создания и по сей день остаются востребованным инструментом для исследователей [72, 172–174]. Но во многих случаях, помимо информации о размере клетки, требуются данные о её оптических характеристиках. Для этого нужны более сложные устройства.

ОПТИЧЕСКИЕ ПРОТОЧНЫЕ ЦИТОМЕТРЫ

Информацию об оптических свойствах клетки позволяют получить проточные цитометры, оснащенные оптической системой, через которую одна за другой в потоке жидкости проходят клетки. Существенного успеха в этом направлении удалось достигнуть во второй половине 60-х годов прошлого века, когда был сконструирован автоматический проточный цитометр, использующий оптическую систему микроскопа (по принципу Молдована), который измерял и записывал УФ-поглощение и рассеяние синего света клеток, протекающих мимо объектива со скоростью 500 клеток в секунду [175]. В 1969 г. Дитрих и Гёдэ описали подобную установку, детектирующую флуоресценцию клеточной ДНК, окрашенной бромистым этидием [176].

Гидродинамическое фокусирование

В 1969 году был разработан флуоресцентный цитометр, который, в отличие от ранее предложенных систем на основе микроскопа, в дополнение к взаимно перпендикулярным оси потока суспензии клеток в трубке и оси освещения образца, имел перпендикулярную к ним обеим оснащенную фотоумножителем ось детекции [177]. В качестве источника света использовали аргоновый лазер, что позво-

лило получить чистый монохромный поток света высокой плотности, что важно при работе с флуоресценцией. Кроме того, данный цитометр использовал принцип гидродинамического фокусирования, ранее предложенный Кросланд-Тейлором [178]. Этот принцип основан на впрыскивании через специальный наконечник суспензии клеток в центр быстро текущего широкого потока буферного раствора, так называемой обжимающей жидкости. Геометрия наконечника позволяет предотвратить турбулизацию потока суспензии исследуемых клеток и ее перемешивание с обжимающей внешней жидкостью. Объемный поток обжимающей жидкости как правило в 10–100 раз больше потока образца. Давление внешнего потока, направленное на суспендированные клетки, выстраивает эти клетки в центральной области потока. Вследствие этого клетки, образуют «цепочку» в потоке жидкости. Ранее создатели проточных цитометров стояли перед выбором: использовать широкую трубку, которая позволяла проходить одновременно по две или более клеток через детектор, таким образом искажая результаты измерений, или использовать узкую трубку, что затрудняло наблюдение клеток из-за разных показателей преломления материала трубки и жидкости, в которой находились клетки. Кроме того, узкие трубки быстро забивались [166]. Гидродинамическое фокусирование позволило решить вышеописанные проблемы: с одной стороны, используя достаточно широкий поток, с другой – локализовав клетки в довольно узкой его части.

Дальнейшее развитие проточных цитометров пошло в направлении технического совершенствования данной модели. Некоторые современные цитометры оснащены целым комплектом лазеров и могут измерять и анализировать сигналы от различных флуорофоров, содержащихся в клетке. На сегодня доступны цитометры, анализирующие одновременно до 17 каналов флуоресценции [179].

Помимо флуоресценции, проточные цитометры могут измерять рассеяние луча лазера каждой клеткой (рис. 7, 8). Оценивают прямое (малоугловое) и боковое рассеяние. Для измерения малоуглового рассеяния на пути лазерного луча ставят узкую перегородку, отсекающую сам лазерный луч, но не рассеянные лучи; за перегородкой размещают собирающую линзу, а за ней фотодетектор. Эта система обычно устроена так, что линза собирает лучи, отклоненные на $0,5\text{--}10^\circ$ от исходного лазерного луча. В общем случае, клетка с большим поперечным сечением сильнее отклоняет лучи. Поэтому по величине прямого рассеяния оценивают объем клеток. Но это не совсем верно, так как на величину прямого рассеяния влияет показатель преломления клетки, который зависит от её морфологии и физиологического состояния [180]. Для оценки бокового рассеяния

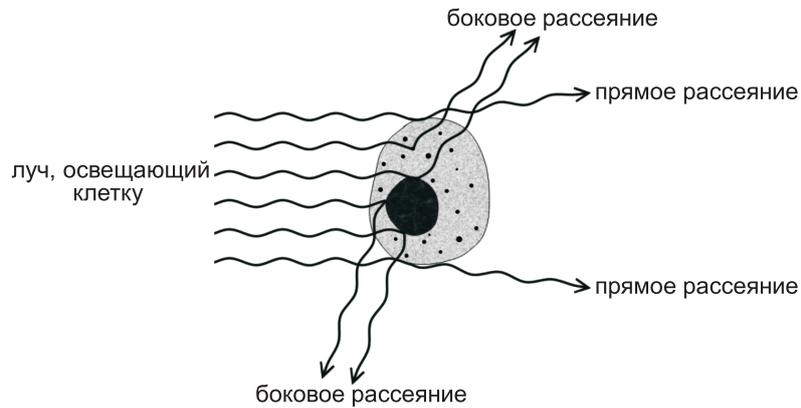


Рис. 7. Виды рассеяния лучей клеткой в проточном цитометре.

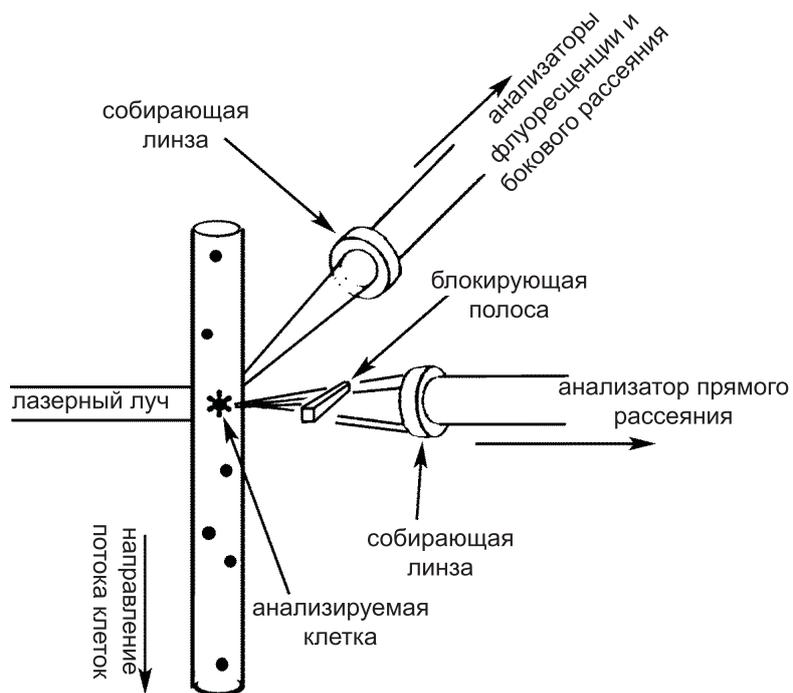
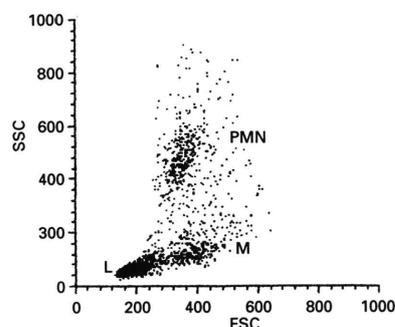


Рис. 8. Схема скрининга клеток в лазерном проточном цитометре.

Поток жидкости и линзы, собирающие прямое и боковое рассеяния, расположены на взаимно перпендикулярных осях. Взято с изменениями из [166] с разрешения Springer (© Springer Science+Business Media, LLC 2011).

Рис. 9. Анализ субпопуляций лейкоцитов периферической крови крысы на основании прямого (FSC) и бокового (SSC) рассеяний.

PMN – полиморфноядерные клетки, М – моноциты, L – лимфоциты. Взято из [245] с разрешения John Wiley and Sons, Copyright (1995) Wiley.



собирающую линзу и фотодетектор ставят перпендикулярно направлению лазерного луча. Эта система детектирует сильно отклоненные клеткой лучи. Такое рассеяние дает информацию о цитоплазматических и мембранных особенностях клетки. Только на анализе рассеяния света, не используя флуоресцентный блок, проточные цитометры позволяют анализировать морфологию клеток, что находит применение, в частности, при анализе образцов крови (рис. 9).

Отдельную проблему проточной цитофлуориметрии составляет анализ бактериальных клеток. Это вызвано тем, что бактерии намного меньше клеток эукариот, для анализа которых созданы большинство современных цитометров. Так средний размер бактерии – 1 мкм, а средний размер клетки крови – 10 мкм, и, следовательно, площадь поверхности у бактерий примерно в 100, а объем в 1000 раз меньше. Сигнал от флуоресцентных зондов, связанных с поверхностью или распределённых по объему бактериальных клеток, существенно слабее, чем в случае клеток эукариот. Поэтому для работы с бактериями требуются более чувствительные системы [181, 182].

Ключевая особенность, сделавшая проточные цитометры столь популярным инструментом для скрининга клеток – это скорость их работы. Современные цитометры способны пропускать поток исследуемого образца с объемной скоростью порядка нескольких сотен микролитров в секунду, анализируя при этом до 100 000 клеток в секунду [183]. Однако, как правило, используют скорости, не превышающие 10 000 клеток в секунду [184, 185], и часто используют скорость менее 1000 клеток в секунду [91, 186, 187]. Это вызвано тем, что при повышении скорости скрининга возрастает вероятность ошибки. При фиксированной скорости подачи суспензии клеток увеличить скорость скрининга можно, если увеличить концентрацию клеток в суспензии. Однако с повышением концентрации возрастает вероятность слипания клеток в образце еще до того, как клетки пройдут через

детектор. Кроме того, повышается вероятность, что через детектор одновременно пройдет больше одной клетки (рис. 10). Другой способ увеличить скорость скрининга – повысить скорость впрыска клеток во внешний поток. Однако при этом происходит увеличение поперечного сечения области, в которой могут присутствовать клетки (рис. 11), то есть ухудшается гидродинамическое фокусирование. В результате, через детектор могут одновременно проходить больше одной клетки, что также ведет к искажению результатов.

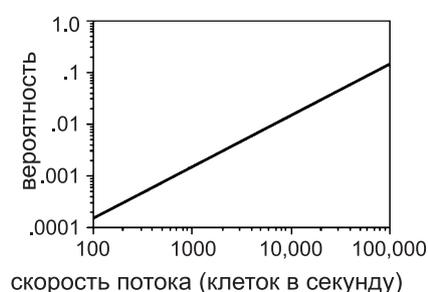


Рис. 10. Зависимость вероятности того, что проточный цитометр воспримет прохождение двух и более клеток через лазерный луч как одиночное событие, от скорости потока клеток. Взято с изменениями из [182] с разрешения John Wiley and Sons, Copyright (2001) Wiley.

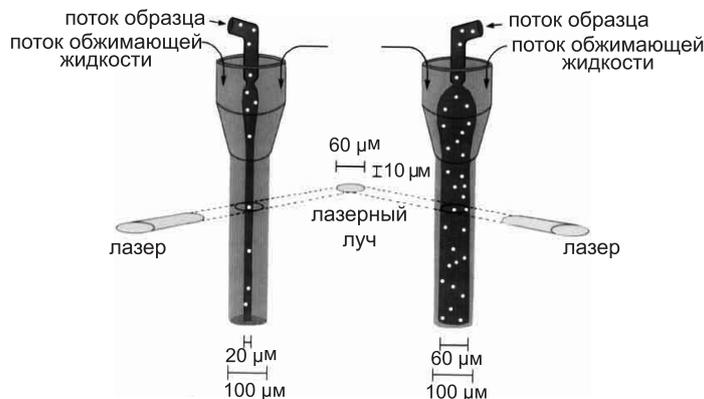


Рис. 11. Влияние скорости подачи образца на эффективность гидродинамического фокусирования.

Схема потока клеток в центре потока обжимающей жидкости, проходящей через аналитическую ячейку, освещаемую лазерным лучом. Когда образец впрыскивается медленно (слева), клетки фокусируются лучше и проходят через центр лазерного луча по одной. Когда образец впрыскивается быстро (справа), клетки фокусируются хуже и освещаются не одинаково, поскольку не все оказываются в центре луча. Кроме того, более одной клетки может быть освещено одновременно. Взято с изменениями из [182] с разрешения John Wiley and Sons, Copyright (2001) Wiley.

Акустическое фокусирование

Активно развивающимся направлением проточной цитометрии является акустическая цитометрия, основанная на силе давления звукового излучения [188]. Эффект этого давления на частицы был впервые описан Кундтом и Леманом в 1874 году после наблюдения исчерченности узора из частиц пыли, левитирующих в трубах органа [189]. Позже этот эффект применяли для разделения частиц в водных растворах [190–193]. Акустическая фокусировка, применяемая в проточной цитометрии, заменяет традиционно используемое гидродинамическое фокусирование, не требуя потока обжимающей жидкости. Этот подход использует физические различия между буфером и клетками, которые в нём находятся, для выстраивания клеток в цепочку, направленную вдоль центральной оси потока в капилляре (рис. 12). Возможность компактно сфокусировать клетки в линию без использования потока обжимающей жидкости дает дополнительные преимущества, выходящие за рамки обычной проточной цитометрии: быстрый анализ сильно разбавленных образцов, уникальная возможность контроля потока – от его замедления или остановки до обращения движения в обратную сторону. Теория акустически управляемого капилляра была описана в 2005 году [194], а его применение для цитометрии – несколькими годами позже [195].

Принцип действия акустической цитометрии состоит в том, что в капилляре с протекающим образцом в результате воздействия ультразвука формируется поле давления звукового излучения. Пример распределения потенциала этого поля в поперечном сечении капилляра представлен на рис. 12. Частицы, проходящие через капилляр, испытывают давление, которое переносит их в область минимального потенциала (потенциальную яму), центрируя вдоль оси капилляра. Стоит отметить, что так ведут себя почти все частицы, исследуемые в проточной цитометрии, однако есть исключения. Строго говоря, поведение частиц в акустическом поле определяется акустическим контрастом между жидкостью и находящейся в ней частицей. Контраст, в свою очередь, определяется разностью в сжимаемости и плотности частиц и жидкости. Частицы, которые выстраиваются вдоль центральной оси капилляра, имеют положительный акустический контраст. Однако существуют частицы с отрицательным акустическим контрастом, такие как глобулы жира или пузырьки газа, которые под воздействием акустической силы мигрируют в направлении стенок капилляра. Если плотность и сжимаемость частиц и окружающей их жидкости одинакова, т.е. акустического контраста нет, то давления звукового излучения на частицу не возникает.

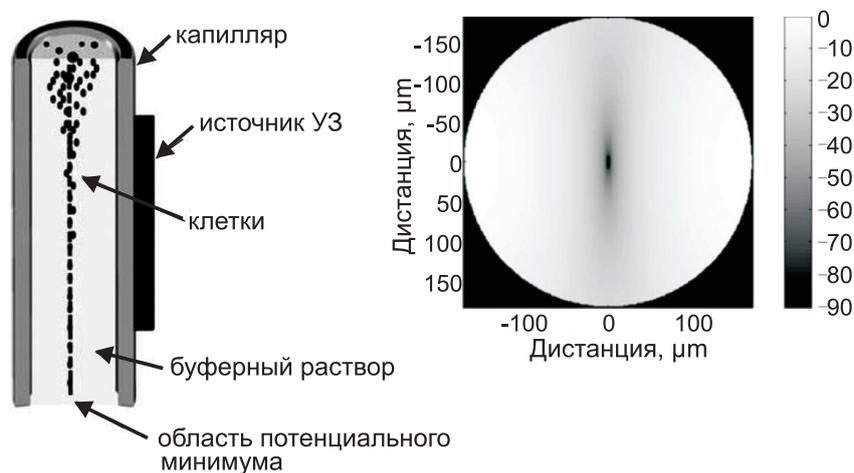


Рис. 12. Акустическое фокусирование.

Слева: схема линейного капилляра с изображением плотной фокусировки частиц вдоль центральной оси капилляра; поток жидкости направлен сверху вниз.

Справа: расчётный акустический потенциал для эритроцитов, суспендированных в буфере PBS, в поперечном сечении капилляра. Клетки, имеющие положительный акустический контраст, сосредотачиваются в потенциальной яме в центре поперечного сечения. Взято с изменениями из [188] с разрешения John Wiley and Sons, Copyright (2009) Wiley.

Стоит упомянуть, что ультразвуковое давление не оказывает разрушающего эффекта на клетки. В отличие от акустического лизиса клеток в ультразвуковых гомогенизаторах, где применяют ультразвук с частотой порядка нескольких десятков кГц, при акустическом фокусировании используют ультразвук более высокой частоты, выше 1 МГц, что не позволяет формироваться кавитационным пузырям, коллапс которых приводит к лизису клеток. Кроме того, при акустическом лизисе используют очень высокий уровень энергии, акустическая цитометрия же выполняется с применением относительно низкого уровня энергии всего в несколько сотен милливатт при очень высокой скорости протока образца, так что энергия быстро рассеивается в жидкости. Было показано, что акустическое поле, создаваемое капилляром с акустическим приводом в субмегагерцовой области, не оказывает существенного влияния на жизнеспособность клеток яичника китайского хомячка СНО [196].

Использование акустической цитометрии имеет ряд недостатков. Во-первых, это сильная зависимость условий фокусировки от темпе-

ратуры и типа используемого буфера, в котором находятся клетки. При изменении этих параметров требуется оптимизация частоты резонанса ультразвука. Во-вторых, прямой контакт образца со стенками капилляра делает систему восприимчивой к загрязнению [197]. В-третьих, воздействие акустической силы на частицы зависит от их размера. Итоговое воздействие, являющееся результатом действия акустической силы и противопоставленной ей силы сопротивления жидкости, пропорционально квадрату радиуса частицы. Таким образом, маленькие частицы концентрируются медленнее, чем большие частицы с таким же акустическим контрастом. Это, в свою очередь, требует, чтобы при цитометрии небольших клеток, таких как бактерии, скорость протекания образца в фокусирующем капилляре была уменьшена – что замедляет анализ. Более мелкие, субмикронные объекты, такие как маленькие бактерии и вирусы, на сегодня не могут быть достаточно хорошо акустически сфокусированы: в этом случае требуется применение гидродинамического фокусирования. Поскольку акустические силы не зависят от потока, обжимающий поток может быть введен при любом желаемом соотношении с потоком образца. В обычном проточном цитометре объемный поток обжимающей жидкости, необходимый для достижения плотного фокуса, обычно в 100-1000 раз больше, чем поток пробы. В совмещенном акустическо-гидродинамическом цитометре его можно уменьшить до соотношения 10:1 или 2:1 или даже 1:10. Этого оказывается достаточно для удержания мелких частиц от контакта со стенками капилляра, а поскольку акустические силы действуют на частицы тем сильнее, чем ближе они к центральной оси, то фокусирование частиц в этом случае требует меньше времени. Однако совмещение акустического и гидродинамического фокусирования имеет свои ограничения, в частности, точность фокусировки может ухудшаться, если обжимающая жидкость и жидкость образца не аналогичны «акустически». Этот эффект имеет сложную природу и зависит от физических свойств указанных жидкостей, объемного соотношения их подачи, геометрии системы их доставки, и еще не полностью исследован. Прием, который позволяет частично преодолеть эту проблему – использование гидродинамической фокусировки образца после фокусировки в акустическом капилляре. Этот метод также приводит к лучшему фокусированию более мелких частиц и предотвращению контакта образца со стенкой оптической ячейки.

Текущие акустические фокусирующие цитометры могут фокусировать лимфоциты и более крупные клетки при объемном потоке образца от 2 до 3 мл/мин, что на один – два порядка выше, чем у

обычных проточных цитометров. Такая высокая скорость потока позволяет поддерживать высокую пропускную способность клеток даже для разбавленных образцов.

Еще одно преимущество акустической фокусировки по сравнению с гидродинамической проявляется при цитометрии клеток, несущих небольшое число флуорофоров. В этом случае для достаточного накопления сигнала на детекторе замедляют скорость потока образца. В случае гидродинамического фокусирования совмещение медленного потока и компактной фокусировки образца требует маленьких размеров проточной системы, что сильно затрудняет анализ клеток, которые легко «забивают» систему. В случае же акустической фокусировки, как упоминалось выше, легко можно понизить скорость потока, при этом фокусировка клеток не только не ухудшится, но даже улучшится, поскольку, двигаясь с меньшей скоростью, они будут дольше находиться под действием акустической силы.

Интересным развитием акустической цитометрии является формирование в одной общей проточной ячейке нескольких параллельных потоков сфокусированных клеток. Для создания таких параллельных потоков используют мультиузловые плоские акустические стоячие волны, в узлах которых и выстраиваются клетки. Для демонстрации возможностей такого подхода был создан цитометр, проточная ячейка которого представляла собой уже не круглый в сечении капилляр, а камеру, сверху и снизу ограниченную предметными стеклами (25 мм × 75 мм), зазор между которыми был толщиной 0,73 мм. В такой проточной ячейке с помощью акустической фокусировки удалось создать до 37 параллельных потоков клеток [198].

При использовании акустической цитометрии управление потоком позволяет остановить или даже обратить его. Объединив этот контроль потока с высокой пропускной способностью, можно сделать инструменты, которые сочетали бы статистическую мощность обычной цитометрии с достоверностью исследования клеток при помощи микроскопа. Такие инструменты позволили бы анализировать клетки с высокой скоростью, но также дали бы возможность приостановки потока и получения изображения заинтересовавших пользователя клеток.

Говоря о современной проточной цитометрии, нельзя не упомянуть приборы, не использующие фокусировку [197, 199]. В этом случае поток клеток ограничен капилляром с небольшим внутренним диаметром. При таком подходе требуется избегать высоких концентраций клеток: во-первых, для подавления одновременного прохождения нескольких клеток через детектор; во-вторых, для пре-

дотвращения «забивания» капилляра слипшимися клетками. Оптика при этом настраивается более грубым образом, чтобы детектировать клетки, находящиеся не только вдоль центральной оси потока, но и отклонившиеся в периферийную область [200]. Такие приборы являются не такими точными, как приборы с гидродинамической и оптической фокусировкой, но зато более дешевы и просты в обслуживании.

Микрофлюидные системы

Развитие технологий микрообработки и микропроизводства материалов позволило уменьшить размеры проточных систем. В связи с этим в 1990-е годы возникло самостоятельное междисциплинарное направление – микрофлюидика, которое описывает поведение малых (порядка 10^{-6} – 10^{-18} л) объемов жидкостей [201–203] в капиллярах диаметром, сопоставимым с размером эукариотической клетки. Исторически исследования микрофлюидики проводились с целью компактизации, упрощения оборудования, удешевления его производства [200], экономии реагентов, но в целом считалось, что меньшие устройства будут работать так же, как их макроаналоги. Как оказалось, физика поведения жидкости меняется по мере перехода к микропотокам. В микромасштабе возможны совершенно новые и полезные устройства, которые не имеют аналогов в макромасштабе [197, 200, 204, 205].

Потоки в каналах микрофлюидных систем, как правило, являются ламинарными, а не турбулентным, и поэтому эти потоки и изменение концентраций веществ в них можно математически моделировать, что делает возможным количественное предсказание окружения клеток. Это детерминированное поведение потока в микроканалах является уникальной особенностью микрофлюидики, которое не имеет аналогов в макроскопическом мире и поэтому часто требует отдельной инженерии для ее использования. Микроканалы, как видно из их названия, могут быть легко изготовлены в масштабе, подобном клеточному, поэтому их можно использовать для исследования клеточных эффектов, для рассеивания и сортировки одиночных клеток, для создания систем, имитирующих физиологические параметры и т. д. При относительно небольших дополнительных затратах можно интегрировать микроклапаны и микронасосы и другие модули на одну и ту же подложку, что позволяет изолировать образец от внешней среды, устраняя тем самым ошибки, обусловленные загрязнением и человеческим фактором, а также автоматизировать управление жидкостями. В связи с этим системы на основе микрофлюидных чипов

получили названия «лаборатория на чипе» (lab-on-a-chip) [203, 206]. Прогнозируют, что микрофлюидика позволит снизить стоимость постановки высокопроизводительных экспериментов, особенно когда будут налажены серийное изготовление такого оборудования и манипуляции на нём. Как упоминалось выше, микрофлюидные устройства потребляют меньше реагентов, образуют меньше отходов, занимают меньше места, чем их макрофлюидные аналоги, и поэтому их можно легко транспортировать и использовать не только в ограниченном числе специально подготовленных лабораторий, а в «полевых условиях» [200, 204–207].

Одним из направлений развития микрофлюидики является реализованная на чипе проточная цитометрия. Стоимость и сложность изготовления компонентов проточной системы, которые традиционно делаются из высококачественного стекла, могут быть уменьшены за счет использования недорогих полимеров. Изготовленные с применением микрообработки и микропроизводства структуры каналов, обеспечивающие ламинарный ток, способны стабильно доставлять клетки в зону детекции (оптическую ячейку) с большей точностью и лучшим контролем потока по сравнению с обычными проточными цитометрами [208]. Преимущества новых технологий производства включают в себя также возможность быстро и недорого создавать требуемые структуры и получать оптимизированные геометрии каналов, которые трудно или невозможно изготовить с использованием обычных методов обработки стекла [200]. Так, еще в 1993 была разработана система для проточной цитометрии [209]. Чип этого цитометра состоял из двух частей, выполненных из плавленного кварца, гидродинамическая фокусировка достигалась путем впрыскивания потока образца в центр сужающегося потока обжимающей жидкости. Используя эту систему, удалось сфокусировать поток образца до 10 мкм и обеспечить его высокую скорость (до 10 м/с).

Одна из самых простых современных систем микроканалов для гидродинамической фокусировки состоит из двух потоков обжимающей жидкости, расположенных по обе стороны от потока образца и ориентированных либо перпендикулярно, либо под углом к нему [198, 210]. Подбирая правильное соотношение размеров каналов, удается сфокусировать образец в очень узкий поток. Кроме того, параболический профиль потока в этих каналах обеспечивает некоторую степень фокусировки частиц в вертикальном направлении [211]. Дальнейшее развитие технологии пошло по пути увеличения числа потоков с обжимающей жидкостью. Было предложено устройство с тремя потоками обжимающей жидкости. Точность фокусировки была

дополнительно улучшена варьированием положения высоты потоков с обжимающей жидкостью. Введение трех обжимающих потоков не только точно фокусировало частицы, но также увеличило пропускную способность и точность, сделав их сравнимыми с коммерческими проточными цитометрами [212, 213]. В дальнейшем, число фокусирующих потоков с обжимающей жидкостью увеличивалось – в некоторых конструкциях использовали до восьми потоков фокусировки [214]. Это в общем случае увеличивало качество фокусирования образца и позволяло управлять его положением в канале, однако увеличивало трудность изготовления таких устройств.

Для упрощения производства микрофлюидных чипов разрабатываются новые схемы гидродинамического фокусирования с оптимизированной геометрией потоков. Так, например, был предложен микрофлюидный чип, использующий двухэтапное каскадное фокусирование (рис. 13А), когда на каждом этапе поток образца впрыскивается между двумя сходящимися потоками обжимающей жидкости. Помимо относительной простоты изготовления такого чипа, гидродинамическое воздействие на клетки при этом меньше, чем в случае классического гидродинамического фокусирования [208, 215, 216]. Другой подход, так называемое «фокусирование вращением» (spin focusing), основан на применении потока обжимающей жидкости, закрученного вихрем вокруг потока образца (рис. 13Б). Данный подход также обеспечивает высокое качество выстраивания клеток в центре потока, но при этом, по сравнению с каскадным фокусированием, имеет упрощенный дизайн микрофлюидики и менее сложен в производстве [208].

В микрофлюидике относительно недавно получил распространение способ инерционной фокусировки. Инерционная фокусировка определяется инерционными подъемными силами, а также силами сопротивления [197], которые вызывают латеральную миграцию клеток через поток жидкости в предсказуемые положения равновесия. Точные пространственно-временные фокусирующие положения возникают из-за сочетания латерального фокусирования инерционными силами и продольным упорядочением, возникающим в результате гидродинамических отталкиваний частиц. Фокусировка частиц зависит от их размера, а также от геометрии поперечного сечения и кривизны канала, по которому движется образец [217]. Такой подход фокусирования клеток благодаря его простоте, независимости от внешних сил и отсутствию обжимающей жидкости хорошо подходит для высокопроизводительного анализа клеток в микрофлюидных системах [179, 203]. Так, был разработан прибор,

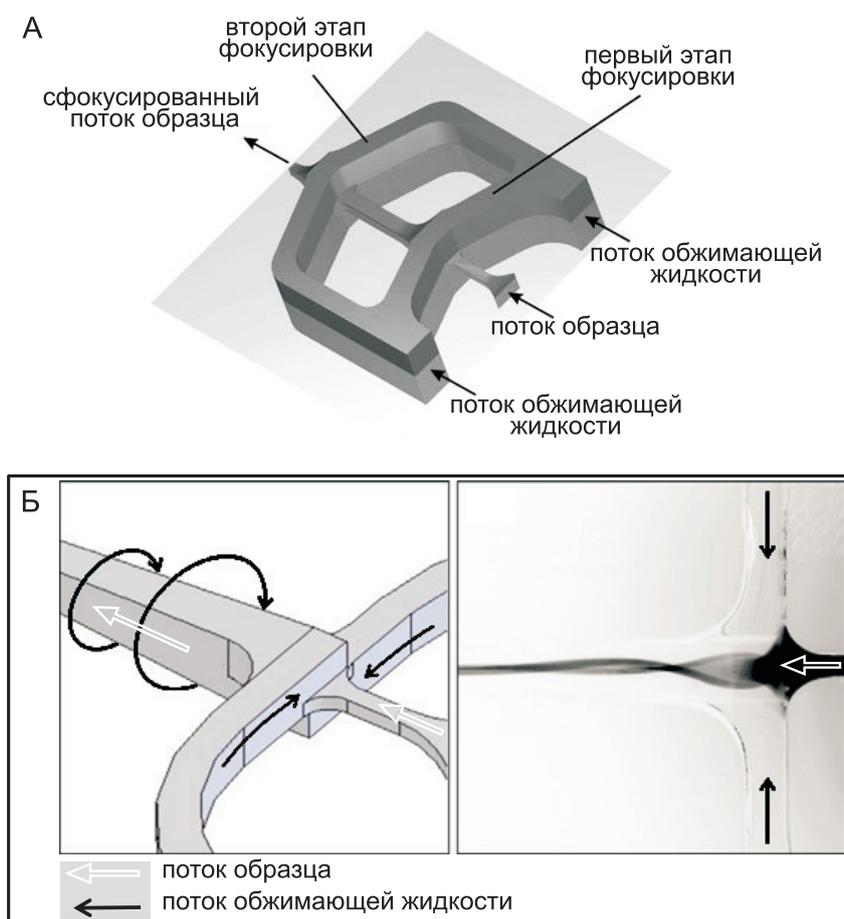


Рис. 13. Схемы гидродинамического фокусирования с оптимизированной геометрией потоков.

А – Потoki жидкостей в микрофлюидном чипе с двухэтапным каскадным фокусированием. Взято с изменениями из [215], с разрешения The Royal Society of Chemistry.

Б – Потoki жидкостей в микрофлюидном чипе с гидродинамическим вращательным фокусированием. Слева – схема, справа – изображение работающего чипа, поток образца подкрашен красителем. Взято с изменениями из [208] на основании лицензии Creative Commons Attribution (CC BY 3.0).

осуществляющий инерционную фокусировку клеток в 256 параллельных микроканалах [218]. Однако этот метод требует, чтобы фокусируемая частица занимала значительную часть поперечного сечения канала, что необходимо учитывать при проектировании инерционных микроканалов [179].

Также стоит сказать, что сегодня в микрофлюидных проточных цитометрах часто используют акустическую фокусировку, поскольку она не требует разработки каналов для обжимающей жидкости [198, 208, 219, 220].

Еще одним применением микрофлюидики является инкапсуляция отдельных клеток в индивидуальных водных везикулах диаметром порядка десятков или сотен микрон (и объемом, соответственно, порядка фемто- и нанолитров), изолированных друг от друга не смешивающейся с водой масляной фазой, и анализ таких везикул. Это направление получило название «капельная микрофлюидика» (droplet microfluidics) [201].

В одной из первых работ по инкапсуляции одиночных клеток с помощью капельной микрофлюидики для создания везикул использовали Т-образное соединение капилляров: по одному из капилляров подавалась масляная фаза, а по второму, перпендикулярно упирающемуся в первый, – суспензия клеток. Во время генерации капли потоки масла и суспензии останавливали. Далее при помощи технологии оптического захвата подводили интересующую клетку к границе раздела фаз воды и масла, после чего подавали небольшое избыточное давление в микрокапилляр с суспензией, в результате чего прилежащий к границе раздела фаз объем водной фазы вместе с клеткой выталкивался в масляную фазу, формируя микровезикулу, и далее подхватывался вновь включенным потоком масла [221]. Из-за необходимости вручную направлять каждую клетку к границе раздела фаз этот прототип имел низкую пропускную способность. Чуть позже были разработаны микрофлюидные системы для инкапсуляции отдельных клеток в липидных везикулах, окруженных непрерывной водной фазой [222] и в везикулах, содержащих расплавленную агарозу, которая после охлаждения застывала, образуя агарозные микрошарики [223]. Эти прототипы также имели низкую пропускную способность [201].

Во многих современных микрофлюидных эмульсионных системах смешивание масляной и водной фазы происходит непрерывно, без остановки потоков, что, конечно, повышает скорость образования везикул, но делает их заполнение клетками случайным. Поэтому, для того, чтобы везикулы преимущественно содержали не более одной

клетки, большинство везикул должны быть пустыми, а часть везикул при этом все равно будет содержать по нескольку клеток. Так, если везикулы, содержащие клетки, будут составлять всего ~15 % от всех везикул, а остальные везикулы будут пустыми, то 10% занятых клетками везикул будут содержать в себе две и более клеток [224]. Существует несколько подходов, позволяющих обойти это ограничение. Один из таких подходов основан на том, что везикулы, содержащие клетки, крупнее, чем пустые везикулы. Подобрав нужную геометрию фокусировки потока везикул в масле, удастся частично отделить пустые везикулы от содержащих клетки. Другой подход основан на предварительном равномерном распределении клеток в капилляре с водной фазой с помощью инерционного фокусирования. В этом случае, пространственно упорядочив клетки в подводящем к маслу потоке и синхронизировав их поступление с образованием везикул, также удастся повысить долю везикул, содержащих по одной клетке. Однако даже с применением таких подходов долю везикул, содержащих одну клетку, удастся повысить максимум до 70–80 % [201].

Поскольку клетка в эмульсии изолирована в ограниченном объеме микрокапли, молекулы, выводимые такой клеткой на клеточную мембрану или в окружающее пространство, быстро достигают в замкнутом объеме детектируемых концентраций и могут быть надежно определены флуоресцентными методами, что позволяет исследовать чрезвычайно низкие количества молекул биомаркеров [201, 225]. Впервые такой подход был опробован для исследования активности щелочной фосфатазы в клетках *E. coli*, когда клетки и субстрат инкапсулировали в везикулах, где в присутствии фосфатазы происходило расщепление субстрата, ведущее к появлению флуоресценции. В дальнейшем подобный подход использовали для исследования активности других ферментов *E. coli*, активации рецепторов на поверхности эукариотических клеток при связывании с лигандами, исследования секретируемых клетками цитокинов, антител и др. [201, 205, 225].

Исследования клеток в эмульсиях имеет ряд недостатков. Локальное микроокружение в везикулах (уровень питательных веществ, газообмена) существенно отличается от ситуации *in vivo*, поэтому в некоторых случаях этот подход не может обеспечить адекватную модель для исследований. При длительной работе с клетками в эмульсиях стоит учитывать риски, связанные с возможностью коалесценции (слияния) капель, истощения питательных веществ или накопления токсичных метаболитов [201, 225]. Кроме того, из-за отсутствия системы калибровки современные методы не позволяют надежно

количественно оценить содержание анализируемых метаболитов, хотя это часто представляет интерес для исследователей [205]. Кроме того, как правило, скорость анализа везикул ниже скорости анализа клеток при помощи обычной проточной цитометрии [225].

В заключение стоит сказать, что общим недостатком всех методов скрининга клеток на основе одномерного формата является недостаточная надежность и полнота идентификации клеток, присущая двумерному формату скрининга. Единоразово измеренная, клетка не может быть проанализирована повторно. Исследователь получает набор спектральных данных, которые лишь косвенно указывают на тип анализируемой клетки, при этом теряется информация о многих морфологических особенностях клетки и её субклеточной структуре [226, 227]. Часть клеток во время анализа может слипаться, и это приведет к искажению результатов. В редких случаях для получения более достоверных результатов часть образцов дополнительно проверяют прямым микроскопическим наблюдением [228]. Поэтому актуальной является задача развития и внедрения методов скрининга клеток, совмещающих доступность, надежность идентификации и возможность повторного анализа, присущие двумерному формату скрининга, и скоростные характеристики, присущие проточной цитометрии.

IV. ТЕХНОЛОГИЯ СЛИТЫХ ГЕЛЕЙ

В заключение данного обзора рассмотрим подход, позволяющий совместить доступность, надежность идентификации и возможность повторного анализа клеток, присущие двумерному формату скрининга, и скоростные характеристики, присущие проточной цитометрии, а также достоинства 2D- и 3D-культивирования. Этот подход основан на технологии слитых гелей [229–231], относится к двумерному формату презентации клеток и позволяет иммобилизовать как прокариотические, так и эукариотические клетки в геле, одновременно выстроив их в тонкий слой. Для этого суспензию клеток в гелеобразующем растворе (содержащем мономеры полиакриламида (ПАА) или расплавленную агарозу), наносят на поверхность высушенного ПАА геля. Разбухая, сухой гель вытесняет клетки и собирает их на своей поверхности (рис. 14А). Разбухание вытесняющего геля прекращается после формирования иммобилизующего геля, и клетки фиксируются в окружающем матриксе. Чем больше разбухает вытесняющий гель, тем сильнее концентрируются клетки, и тем ближе к поверхности слитого геля они

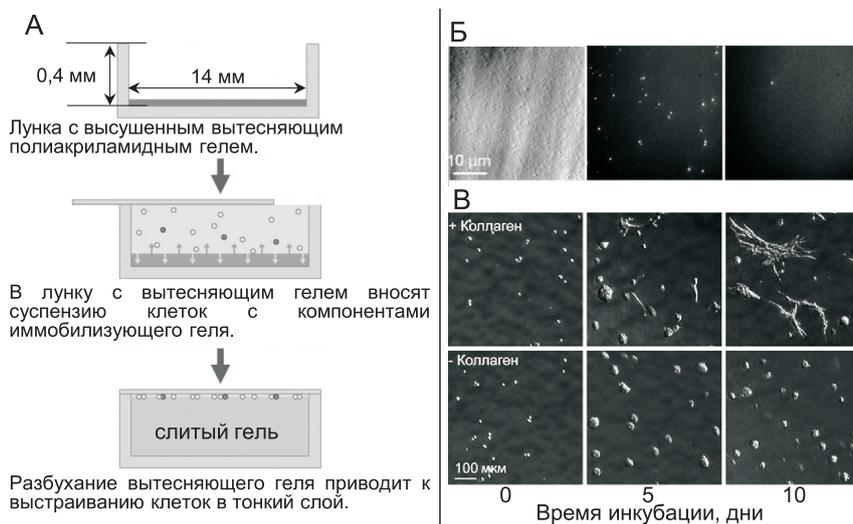


Рис. 14. Технология слитых гелей.

А – Схема формирования слитого геля. Взято с изменениями из [230] с разрешения John Wiley and Sons, Copyright (2011) Wiley.

Б – Скрининг клеток *E. coli* в слитом геле. Смесь GFP-продуцирующих и не продуцирующих клеток *E. coli* внедряли в слитый гель. Слева: изображение слоя клеток в режиме светлого поля, видны все клетки. В центре: изображение во флуоресцентном режиме того же поля, что и на изображении слева; видны только GFP-продуцирующие клетки, составляющие ~1% от исходной популяции. Справа: изображение во флуоресцентном режиме поля, содержащего одну из семи GFP-продуцирующих клеток, найденных среди $1,5 \times 10^7$ всех клеток монослоя. Взято с изменениями из [230] с разрешения John Wiley and Sons, Copyright (2011) Wiley.

В – Влияние коллагена на рост эмбриональных фибробластов в слитом геле. Взято с изменениями из [231] с разрешения BioTechniques, © 2012.

оказываются. С помощью такого подхода клетки *E. coli*, помещенные в лунку глубиной 400 мкм, удалось сконцентрировать более чем в 200 раз, выстроив их в слой толщиной менее 2 мкм [230].

В отличие от метода Фроста и агарозных подушек, слитые гели плотно упаковывают и прочно иммобилизуют клетки в монослой так, что клетки сохраняют местоположение даже при интенсивном промывании геля в течение долгого времени. Надежная иммобилизация всех клеток в слитом геле, а также то, что они находятся в одной плоскости, дают возможность присвоить каждой клетке уникальный двумерный адрес, по которому она впоследствии с легкостью может быть найдена. Иммобилизация позволяет легко воздействовать на

клетки, например, синхронизировать их деление [72], быстро изменяя состав среды, в которой они находятся, простым промыванием геля в подходящем растворе. Иммуобилизация также дает возможность индивидуально следить в режиме реального времени или путем наблюдения через промежутки времени за многими клетками большой популяции, что может найти применение, например, в исследованиях внутриклеточной динамики [232].

Помещая все клетки в гель на одинаковую глубину, технология слитых гелей обеспечивает для них одинаковые физико-химические условия, такие, как скорости газообмена, поступления питательных веществ и удаления продуктов обмена. Важно, что клетки иммуобилизованы в «мягких» условиях, без излишних механических и других неблагоприятных воздействий, поэтому почти все клетки остаются живыми и способны размножаться в геле.

Иммуобилизация также дает возможность индивидуально следить в режиме реального времени или путем наблюдения через промежутки времени за многими клетками большой популяции, что может найти применение, например, в исследованиях внутриклеточной динамики.

Нужно также отметить, что в отличие от метода агарозных подушек, где делящиеся клетки формируют 2D-колонии, распластанные между подушкой и покровным стеклом, бактериальные клетки, иммуобилизованные в слитом геле, образуют компактные сферические микроколонии, напоминающие лилипутские бактериальные колонии, растущие в маленьких пластинах Фроста.

Микроколонии эукариотических клеток в слитом геле намного компактнее колоний, растущих в 2D-культурах на поверхности пластика, и имеют морфологию, характерную для 3D-культур. Так же как и в традиционных 3D-культурах, клетки погружены в матрикс из агарозы, частично имитирующий окружение клеток *in vivo*. Кроме того, ПАА подложка, благодаря своим механическим свойствам (жесткость, упругость), также вносит свой вклад в имитацию естественного окружения [157]. Однако в отличие от традиционных 3D-культур, здесь все исходные клетки и выросшие из них микроколонии погружены на одинаковую глубину, благодаря чему находятся в одинаковых физико-химических условиях и доступны для одновременного наблюдения.

Для большего соответствия требованиям конкретного типа клеток вместо агарозы для иммуобилизации клеток можно использовать другие известные 3D-матрицы натурального или синтетического происхождения [148–150, 233–236], либо в агарозу можно добавлять компоненты внеклеточного матрикса для оптимального развития

клеток выбранного типа [158, 237–240]. Например, введение в состав агарозы коммерческого коллагена (смесь коллагенов I и III типа) способствовало росту клеток фибробластов и влияло на морфологию их колоний (рис. 14В). При этом коллаген удерживался в геле за счет механического включения в агарозный матрикс без какой-либо ковалентной пришивки к нему [241].

Высокая плотность клеток, возникающая при использовании слитых гелей, позволяет проводить высокопроизводительный скрининг клеток. Так всего несколько GFP-продуцирующих клеток, находящихся среди $1,5 \times 10^7$ прочих бактериальных либо 2×10^5 эукариотических клеток, были найдены за 30 мин при помощи вручную управляемого оператором (не автоматизированного) микроскопа (рис. 14Б). Таким образом, скорость скрининга составила около 8 000 бактериальных и 100 эукариотических клеток в секунду. В случае бактерий достигнутая скорость ручного скрининга соответствует скорости автоматической проточной цитометрии (см. выше). Столь высокая скорость скрининга в монослое достигается благодаря тому, что множество клеток двумерного изображения поля зрения микроскопа доступно для анализа одновременно, в отличие от проточной цитометрии, когда клетки анализируются последовательно одна за другой.

Хотя в случае эукариот достигнутая скорость скрининга ниже, чем при использовании проточной цитометрии, двумерный формат позволяет проводить анализ полученных изображений, тем самым повышая надежность детекции: каждую клетку можно отличить от других клеток и частиц неклеточного происхождения. Кроме того, поскольку каждая клетка имеет уникальный адрес в геле, заинтересовавшие клетки после быстрого первоначального скрининга могут быть легко повторно найдены и детально проанализированы. На данном этапе развития технологии сканирование геля проводят вручную, но этот процесс можно существенно ускорить и сделать более информативным, если автоматизировать метод. Можно было бы, например, количественно обчислить фенотипические характеристики каждой клетки, определить их среднее значение, разброс, получить аналогичные данные для интенсивности флуоресценции клеток и других интересных параметров. Оборудование и программы для автоматического сканирования и анализа двумерных клеточных чипов автоматизации уже разработаны и коммерчески доступны [242–244].

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, технология слитых гелей, технически основанная на двумерном формате презентации клеток, совмещает в себе преимущества одномерного и двумерного форматов скрининга клеток и избавлена от их недостатков. Действительно, обеспечивая высокую скорость обследования клеток, присущую проточной цитометрии, слитые гели сочетают надежность визуализации, возможность повторного обследования, иммобилизацию клеток в «мягких» не травмирующих и при этом равных физико-химических условиях, характерные для методов двумерного формата, а также имитацию клеточного микроокружения многоклеточного организма, присущую 3D-культурам. Все это делает технологию слитых гелей высококонкурентоспособной и потенциально позволяет ей стать эффективной альтернативой современным методам скрининга клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Koch, R. (1881) Zur untersuchung von pathogenen organismen. *Mitth. aus dem Kais. Gesundheitsamte*, **1**, 1–48. (English translation: Methods for the study of pathogenic organisms. In: Brock TD, editor and translator. 1998. Milestones in Microbiology: 1546 to 1940. ASM Press. P. 101–108).
2. Шлегель Г.Г. (2002) История микробиологии. М.: Эдиториал УРСС, 302 с.
3. Petri, R.J. (1887) Eine kleine Modification des Koch'schen Plattenverfahrens. *Cent. für Bacteriol. und Parasitenkd.*, **1**, 279–280.
4. Thomas, B.T., Effedua, H.I., Musa, O.S., Adeyemi, M.T., Adesoga, K.O., Ogundero, O., Oluwadun, A. (2012) Enumeration of Microorganism in Dried cassava Powder (Garri); a Comparative Study of Four Methods. *New York Sci. J.*, **5**, 63–66.
5. Breed, R.S., Dotterrer, W.D. (1916) The Number of Colonies Allowable on Satisfactory Agar Plates. *J. Bacteriol.*, **1**, 321–331.
6. Tomaszewicz, D.M., Hotchkiss, D.K., Reinbold, G.W., Read, R.B.J., Hartman, P.A. (1980) The most suitable number of colonies on plates for counting. *J. Food Prot.*, **43**, 282–286.
7. Vieites, J.M., Guazzaroni, M.-E., Beloqui, A., Golyshin, P.N., Ferrer, M. (2010) Molecular methods to study complex microbial communities. *Methods Mol. Biol.*, **668**, 1–37.
8. Ferrer, M., Beloqui, A., Vieites, J.M., Guazzaroni, M.E., Berger, I., Aharoni, A. (2009) Interplay of metagenomics and in vitro compartmentalization. *Microb. Biotechnol.*, **2**, 31–39.
9. Lee, D.-G., Jeon, J.H., Jang, M.K., Kim, N.Y., Lee, J.H., Lee, J.-H., Kim, S.-J., Kim, G.-D., Lee, S.-H. (2007) Screening and characterization of a novel fibrinolytic metalloprotease from a metagenomic library. *Biotechnol. Lett.*, **29**, 465–472.
10. Courtois, S., Cappellano, C.M., Ball, M., Francou, F.-X., Normand, P., Helynck, G., Martinez, A., Kolvek, S.J., Hopke, J., Osburne, M.S., August, P.R., Nalin, R., Guérineau, M., Jeannin, P., Simonet, P., Pernolet, J.-L. (2003) Recombinant envi-

- ronmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 49–55.
11. Van Loo, B., Spelberg, J.H.L., Kingma, J., Sonke, T., Wubbolts, M.G., Janssen, D.B. (2004) Directed evolution of epoxide hydrolase from *A. radiobacter* toward higher enantioselectivity by error-prone PCR and DNA shuffling. *Chem. Biol.*, **11**, 981–990.
 12. Heim, R., Prasher, D.C., Tsien, R.Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12501–12504.
 13. Conway, T., Sewell, G.W., Osman, Y.A., Ingram, L.O. (1987) Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.*, **169**, 2591–2597.
 14. Maullu, C., Lampis, G., Deidda, D., Petruzzelli, S., Pompei, R. (1998) A rapid method for screening large numbers of environmental microorganisms for antiviral activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1161–1162.
 15. Shcherbo, D., Merzlyak, E.M., Chepurnykh, T.V, Fradkov, A.F., Ermakova, G.V, Solovieva, E.A., Lukyanov, K.A., Bogdanova, E.A., Zaraisky, A.G., Lukyanov, S., Chudakov, D.M. (2007) Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat. Methods*, **4**, 741–746.
 16. Wiehler, J., von Hummel, J., Steipe, B. (2001) Mutants of *Discosoma* red fluorescent protein with a GFP-like chromophore. *FEBS Lett.*, **487**, 384–389.
 17. Knietzsch, A., Waschowitz, T., Bowien, S., Henne, A. & Daniel, R. (2003) Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1408–1416.
 18. Knietzsch, A., Waschowitz, T., Bowien, S., Henne, A., Daniel, R. (2003) Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **5**, 46–56.
 19. Streit, W.R., Schmitz, R.A. (2004) Metagenomics – the key to the uncultured microbes. *Curr. Opin. Microbiol.*, **7**, 492–498.
 20. Wang, W. X. (2012) Colony image acquisition and genetic segmentation algorithm and colony analyses. *Color Imaging XVII: Displaying, Processing, Hardcopy, and Applications*. doi:10.1117/12.913588.
 21. Brugger, S.D., Baumberg, C., Jost, M., Jenni, W., Brugger, U., Mühlemann, K. (2012) Automated counting of bacterial colony forming units on agar plates. *PLoS One*, **7**, e33695.
 22. Clarke, M.L., Burton, R.L., Hill, A.N., Litorja, M., Nahm, M.H., Hwang, J. (2010) Low-cost, high-throughput, automated counting of bacterial colonies. *Cytometry*, **77**, 790–797.
 23. Chen, W.-B., Zhang, C. (2009) An automated bacterial colony counting and classification system. *Inf. Syst. Front.*, **11**, 349–368.
 24. Joo, H., Arisawa, A., Lin, Z., Arnold, F.H. (1999) A high-throughput digital imaging screen for the discovery and directed evolution of oxygenases. *Chem. Biol.*, **6**, 699–706.
 25. Terskikh, A., Fradkov, A., Ermakova, G., Zaraisky, A., Tan, P., Kajava, A.V, Zhao, X., Lukyanov, S., Matz, M., Kim, S., Weissman, I., Siebert, P. (2000) «Fluorescent timer»: protein that changes color with time. *Science*, **290**, 1585–1588.
 26. Alexeeva, M., Enright, A., Dawson, M.J., Mahmoudian, M. Turner, N.J. (2002) Deracemization of alpha-methylbenzylamine using an enzyme obtained by in vitro evolution. *Angew.*

- Chem. Int. Ed. Engl.*, **41**, 3177–3180.
27. Handelsman, J. (2005) Sorting out metagenomes. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 38–39.
 28. Henne, A., Schmitz, R.A., Bömeke, M., Gottschalk, G., Daniel, R. (2000) Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 3113–3116.
 29. Henne, A., Daniel, R., Schmitz, R.A., Gottschalk, G. (1999) Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3901–3907.
 30. Van Sint Fiet, S., van Beilen, J. B., Witholt, B. (2006) Selection of biocatalysts for chemical synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 1693–1698.
 31. Mirete, S., de Figueras, C.G., González-Pastor, J.E. (2007) Novel nickel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plants adapted to acid mine drainage. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6001–6011.
 32. Lin, H., Tao, H., Cornish, V.W. (2004) Directed evolution of a glycosynthase via chemical complementation. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 15051–15059.
 33. Taylor, S.V., Walter, K.U., Kast, P., Hilvert, D. (2001) Searching sequence space for protein catalysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10596–10601.
 34. Majerník, A., Gottschalk, G., Daniel, R. (2001) Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring Na⁽⁺⁾(Li⁽⁺⁾)/H⁽⁺⁾ antiporter activity on *Escherichia coli*: characterization of the recovered genes and the corresponding gene products. *J. Bacteriol.*, **183**, 6645–6653.
 35. Parachin, N.S., Gorwa-Grauslund, M.F. (2011) Isolation of xylose isomerases by sequence- and function-based screening from a soil metagenomic library. *Biotechnol. Biofuels*, **4**, 9.
 36. Piel, J., Hui, D., Wen, G., Butzke, D., Platzer, M., Fusetani, N., Matsunaga, S. (2004) Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16222–16227.
 37. Piel, J. (2002) A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14002–14007.
 38. Hrvatin, S., Piel, J. (2007) Rapid isolation of rare clones from highly complex DNA libraries by PCR analysis of liquid gel pools. *J. Microbiol. Methods*, **68**, 434–436.
 39. Frost, W.D. (1915) Rapid method of counting bacteria in milk. *Science*, **42**, 255–256.
 40. Frost, W.D. (1916) A rapid method of counting living bacteria in milk and other richly seeded materials. *J. Am. Med. Assoc.*, **LXVI**, 889–890.
 41. Frost, W.D. (1921) Improved Technic for the Micro or Little Plate Method of Counting Bacteria in Milk. *J. Infect. Dis.*, **28**, 176–184.
 42. Tanner, F.W. (1932) The microbiology of foods. Champaign: The Twin City Printing Co. 768 p.
 43. Frost, W.D. (1916) Comparison of a Rapid Method of Counting Bacteria in Milk with the Standard Plate Method. *J. Infect. Dis.*, **19**, 273–287.
 44. Frost, W.D. (1917) Counting the Living Bacteria in Milk—A Practical Test. *J. Bacteriol.*, **2**, 567–583.
 45. Simmons, J.E. (1919) A comparison, with the standard plate method, of some rapid methods for bacteriologic analysis of milk. *J. Bacteriol.*, **24**, 322–336.
 46. Nickerson, J.T.R. (1943) A modified little plate method for bacterial counts in vegetable freezing plants. *J. Food Sci.*, **8**, 163–168.

47. Hatfield, H.M., Park, W.H. (1922) A Study of the Practical Value of the Frost Little Plate Method in the Routine Colony Count of Milk Samples. *Am. J. Public Health*, **12**, 478–487.
48. Bryan, C.S., Scheid, M.V., Neuhauser, M.D., Gilbert, B.L., Turney, G.J.A. (1942) Comparative Study of the Frost Little Plate and Standard Plate Methods for the Bacteriological Examination of Milk, Cream, and Ice Cream. *J. Dairy Sci.*, **25**, 827–835.
49. Fakhruddin, A.N.M., Quilty, B. (2007) Measurement of the growth of a floc forming bacterium *Pseudomonas putida* CP1. *Biodegradation*, **18**, 189–197.
50. Jannasch, H.W. (1958) Studies on planktonic bacteria by means of a direct membrane filter method. *J. Gen. Microbiol.*, **18**, 609–620.
51. Nelson, B.E. (1917) Direct microscopical counting of bacteria in water. *J. Amer. Chem. Soc.*, **39**, 515–523.
52. Besnard, V., Federighi, M., Cappelier, J.M. (2000) Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **31**, 77–81.
53. Caruso, G., Mancuso, M., Crisafi, E. (2003) Combined fluorescent antibody assay and viability staining for the assessment of the physiological states of *Escherichia coli* in seawaters. *J. Appl. Microbiol.*, **95**, P. 225–33.
54. Daims, H., Wagner, M. (2007) Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 237–248.
55. Oliver, J.D. (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.*, **43**, 93–100.
56. Pyle, B.H., Broadaway, S.C., McFeters, G.A. (1999) Sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food and water by immunomagnetic separation and solid-phase laser cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1966–1972.
57. Besnard, V., Federighi, M., Cappelier, J. (2000) Evidence of Viable But Non-Culturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC-DAPI double staining. *Food Microbiol.*, **17**, 697–704.
58. Jannasch, H.W., Jones, G.E. (1959) Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration. *Limnol. Ocean.*, **4**, 128–139.
59. Kogure, K., Simidu, U., Taga, N. (1979) A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 415–420.
60. Meynell, G.G., Meynell, E. (1970) Theory and Practice in Experimental Bacteriology, 2nd ed. Cambridge: CUP Archive, 346 p.
61. Герхардт, Ф. (1983) Методы общей бактериологии. М.: Мир, 536 с.
62. Pijper, A. (1947) Methylcellulose and Bacterial Motility. *J. Bacteriol.*, **53**, 257–69.
63. Bulloch, W. (1960) The history of bacteriology. London: Oxford University Press. 422 p.
64. Vijaya Mn, D., Umashankar, K., Sudha, Nagure, A.G., Kavitha, G. (2013) Prevalence of the trichomonas vaginalis infection in a tertiary care hospital in rural bangalore, southern India. *J. Clin. Diagn. Res.*, **7**, 1401–1403.
65. Wegayehu, T., Adamu, H., Petros, B. (2013) Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* species infections among children and cattle in North Shewa Zone, Ethiopia. *BMC Infect. Dis.*, **13**, 419.
66. Teklemariam, Z., Abate, D., Mitiku, H., Dessie, Y. (2013) Prevalence of Intestinal Parasitic Infection among HIV Positive Persons Who Are Naive and on Antiretroviral Treatment in Hiwot Fana Specialized University Hospital, Eastern Ethiopia. *ISRN AIDS*, 324–329.

67. Lee, W.C., Russell, B., Lau, Y.L., Fong, M.-Y., Chu, C., Sriprawat, K., Suwanarusk, R., Nosten, F., Renia, L. (2013) Giemsa-stained wet mount based method for reticulocyte quantification: a viable alternative in resource limited or malaria endemic settings. *PLoS One*, **8**, e60303.
68. Hathaway, W.E., Newby, L.A., Githens, J.H. (1964) The acridine orange viability test applied to bone marrow cells. I. Correlation with trypan blue and eosin dye exclusion and tissue culture transformation. *Blood*, **23**, 517–525.
69. Freer, S.M. (1984) A permanent wet-mount for fluorescent microscopy of surface stained lymphoid cells. *J. Immunol. Methods*, **66**, 187–188.
70. Smith, D.L., Rommel, F. (1977) A rapid micro method for the simultaneous determination of phagocytic-microbiocidal activity of human peripheral blood leukocytes in vitro. *J. Immunol. Methods*, **17**, 241–247.
71. Петровский, Б.В. (1979) *Большая медицинская энциклопедия*. **10**.—М.: Советская энциклопедия.—528 с.
72. Adams, R.L.P. (1990) *Cell Culture for Biochemists*, 2nd ed. Amsterdam: Elsevier. 382 p.
73. Семашко, Н.А. (1930) *Большая медицинская энциклопедия в 35 томах. Том 12*. М.: Акционерное общество «Советская Энциклопедия». С. 125–134.
74. Callison, J.G. (1912) A diluting Fluid for Standardization of Vaccines with the Hemocytometer. *J. Med. Res.*, **27**, P. 225–227.
75. Makler, A. (1978) A new chamber for rapid sperm count and motility estimation. *Fertil. Steril.*, **30**, 313–318.
76. Makler, A. (1980) The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil. Steril.*, **33**, 337–338.
77. Makler, A., Fisher, M., Lissak, A. (1984) A new method for rapid determination of sperm concentration in bull and ram semen. *Theriogenology*, **21**, 543–554.
78. Christensen, P., Stryhn, H., Hansen, C. (2005) Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology*, **63**, 992–1003.
79. Lenz, R.W., Kjelland, M.E., Vonderhaar, K., Swannack, T. M., Moreno, J.F. (2011) A comparison of bovine seminal quality assessments with different viewing chambers with a computer-assisted semen analyzer. *J. Anim. Sci.*, **89**, 383–388.
80. Hoogewijs, M.K., de Vlieghe, S.P., Govaere, J.L., de Schauwer, C., de Kruif, A., van Soom, A. (2012) Influence of counting chamber type on CASA outcomes of equine semen analysis. *Equine Vet. J.*, **44**, 542–549.
81. Coetzee, K., Menkveld, R. (2001) Validation of a new disposable counting chamber. *Arch. Androl.*, **47**, 153–156.
82. Benitez, L.B., Caumo, K., Brandelli, A., Rott, M.B. (2011) Bacteriocin-like substance from *Bacillus amyloliquefaciens* shows remarkable inhibition of *Acanthamoeba polyphaga*. *Parasitol. Res.*, **108**, 687–691.
83. De Queiroz, J.C., Ferreira, A.C. de M., da Costa, A.C.A. (2012) The growth of *Monoraphidium* sp. and *Scenedesmus* sp. cells in the presence of thorium. *ScientificWorldJournal.*, 592721. doi: 10.1100/2012/592721.
84. Xiang, D., Cong, Y., Wang, C., Yue, J., Ma, X., Lu, Y., Liu, P., Ma, J. (2012) Development of microscopic review criteria by comparison urine flow cytometer, strip and manual microscopic examination. *Clin. Lab.*, **58**, 979–985.
85. Yamanishi, H., Imai, N., Suehisa, E., Kanakura, Y., Iwatani, Y. (2007) Determination of leukocyte counts in cerebrospinal fluid with a disposable plastic hemocytometer. *J. Clin. Lab. Anal.*, **21**, 282–285.

86. Zimmermann, M., Ruprecht, K., Kainzinger, F., Heppner, F. L., Weimann, A. (2011) Automated vs. manual cerebrospinal fluid cell counts: a work and cost analysis comparing the Sysmex XE-5000 and the Fuchs-Rosenthal manual counting chamber. *Int. J. Lab. Hematol.*, **33**, 629–637.
87. Блинкова, Л.П., Пахомов, Ю.Д., Дмитриева, О.В. (2013) Обнаружение некультивируемых форм бактерий в лиофилизированных препаратах пробиотиков. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии*, **3**. С. 83–88.
88. Свистунова, Е.В., Денисов, Л.А. (1988) Определение антипролиферативной активности рекомбинантного человеческого интерферона (реаферона) на диплоидных клетках человека. *Антибиотики и химиотерапия*, **33**, 513–515.
89. Alekseeva, E.M., Volkova, I.V, Losev, I.R., Lemenkov, V.A. Perevozchikov, S.M. (1996) A unit for automatic blood cell counting. *Med. Tekh.*, **2**, 32–33.
90. Yaqub, S., Anderson, J.G., MacGregor, S.J., Rowan, N.J. (2004) Use of a fluorescent viability stain to assess lethal and sublethal injury in food-borne bacteria exposed to high-intensity pulsed electric fields. *Lett. Appl. Microbiol.*, **39**, 246–251.
91. Gunasekera, T.S., Sørensen, A., Attfield, P.V, Sørensen, S.J., Veal, D.A. (2002) Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 1988–1993.
92. Hilson, G.R. (1964) A disposable counting chamber for urinary cytology. *J. Clin. Pathol.*, **17**, 571–572.
93. Madu, A.J., Ibegbulam, O.G., Ocheni, S., Madu, K.A., Aguwa, E. N. Absolute neutrophil values in malignant patients on cytotoxic chemotherapy. *Niger. J. Med.*, **20**, 120–123.
94. Sukcharoen, N., Ngeamjirawat, J., Chanprasit, Y., Aribarg, A. (1994) A comparison of Makler counting chamber and improved Neubauer hemocytometer in sperm concentration measurement. *J. Med. Assoc. Thai.*, **77**, 471–476.
95. Metzler-Zebeli, B.U., Schmitz-Esser, S., Klevenhusen, F., Podstatzky-Lichtenstein, L., Wagner, M., Zebeli, Q. (2013) Grain-rich diets differently alter ruminal and colonic abundance of microbial populations and lipopolysaccharide in goats. *Anaerobe*, **20**, 65–73.
96. Hundt, W., Steinbach, S., O'Connell-Rodwell, C. E., Bednarski, M. D., Guccione, S. (2009) The effect of high intensity focused ultrasound on luciferase activity on two tumor cell lines in vitro, under the control of a CMV promoter. *Ultrasonics*, **49**, 312–318.
97. Makdoui, K., Bäckman, A., Mortensen, J., Magnuson, A., Crafoord, S. (2013) Comparison of UVA- and UVA/riboflavin-induced growth inhibition of *Acanthamoeba castellanii*. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **251**, 509–514.
98. Collins, C.E., Young, N.A., Flaherty, D.K., Airey, D.C, Kaas, J.H. (2010) A rapid and reliable method of counting neurons and other cells in brain tissue: a comparison of flow cytometry and manual counting methods. *Front. Neuroanat.*, **4**, 5.
99. Strober, W. (2001). Monitoring cell growth. *Curr. Protoc. Immunol.*, Appendix 3A.
100. Norris, K., Powell, E. O. (1961) Improvements in determining total counts of bacteria. *J. R. Microsc. Soc.*, **80**, 107–119.
101. Beck, M., Brockhuis, S., van der Velde, N., Breukers, C., Greve, J. Terstappen, L.W.M. M. (2012) On-chip sample preparation by controlled release of antibodies for simple CD4 counting. *Lab Chip*, **12**, 167–173.

102. Разумов, А.С. (1932) Прямой метод счета бактерий в воде. Сравнение его с методом Коха. *Микробиология*, **1**, 131–146.
103. Richards, O.W., Kkrabek, W.B. (1954) Visibilizing microorganisms on membrane filter surface. *J. Bacteriol.*, **67**, 613.
104. Ecker, R.E., Lockhart, W.R. (1959) A rapid membrane filter method for direct counts of microorganisms from small samples. *J. Bacteriol.*, **77**, 173–176.
105. Ehrlich, R. (1960) Application of membrane filters. *Adv. Appl. Microbiol.*, **2**, 95–112.
106. Ehrlich, R. (1955) Technique for microscopic count of microorganisms directly on membrane filters. *J. Bacteriol.*, **70**, 265–268.
107. Bogosian, G., Aardema, N.D., Bourneuf, E.V, Morris, P.J., O'Neil, J.P. (2000) Recovery of hydrogen peroxide-sensitive culturable cells of *Vibrio vulnificus* gives the appearance of resuscitation from a viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.*, **182**, 5070–5075.
108. Hobbie, J.E., Daley, R.J., Jasper, S. (1977) Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1225–1228.
109. Sekar, R., Fuchs, B.M., Amann, R., Pernthaler, J. (2004) Flow sorting of marine bacterioplankton after fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 6210–6219.
110. Banning, N., Toze, S. Mee, B.J. (2003) Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system. *Microbiology*, **149**, 47–55.
111. Durtschi, J.D., Erali, M., Bromley, L.K., Herrmann, M.G., Petti, C.A., Smith, R.E., Voelkerding, K.V. (2005) Increased sensitivity of bacterial detection in cerebrospinal fluid by fluorescent staining on low-fluorescence membrane filters. *J. Med. Microbiol.*, **54**, 843–850.
112. Ogawa, M., Tani, K., Ochiai, A., Yamaguchi, N., Nasu, M. (2005) Multicolour digital image analysis system for identification of bacteria and concurrent assessment of their respiratory activity. *J. Appl. Microbiol.*, **98**, 1101–1106.
113. Haller, C., Rölleke, S., Vybiral, D., Witte, A., Velimirov, B. (2000) Investigation of 0.2 µm filterable bacteria from the Western Mediterranean Sea using a molecular approach: dominance of potential starvation forms. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **31**, 153–161.
114. Klieneberger-Nobel, E. (1951) Filterable forms of bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **15**, 77–103.
115. Levin, P.A. (2002) Light microscopy techniques for bacterial cell biology. *Methods Microbiol.*, **31**, 115–132.
116. Miyashiro, T., Goulian, M. (2007) Single-cell analysis of gene expression by fluorescence microscopy. *Methods Enzymol.*, **423**, 458–475.
117. Skinner, S.O., Sepúlveda, L.A., Xu, H., Golding, I. (2013) Measuring mRNA copy number in individual *Escherichia coli* cells using single-molecule fluorescence in situ hybridization. *Nat. Protoc.*, **8**, 1100–1113.
118. Young, J.W., Locke, J.C.W., Altinok, A., Rosenfeld, N., Bacarian, T., Swain, P.S., Mjolsness, E., Elowitz, M.B. (2012) Measuring single-cell gene expression dynamics in bacteria using fluorescence time-lapse microscopy. *Nat. Protoc.*, **7**, 80–88.
119. Elowitz, M.B., Levine, A.J., Siggia, E.D., Swain, P.S. (2002) Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, **297**, 1183–1186.
120. Stewart, E.J., Madden, R., Paul, G., Taddei, F. (2005) Aging and death

- in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS Biol.*, **3**, e45.
121. Süel, G.M., Garcia-Ojalvo, J., Liberman, L.M., Elowitz, M.B. (2006) An excitable gene regulatory circuit induces transient cellular differentiation. *Nature*, **440**, 545–550.
 122. Paul, J. (1960) Cell and tissue culture. Edinburgh: E. & S. Livingstone, stone, Ltd. 312 p.
 123. Zicha, D., Dunn, G.A. (1995) An image processing system for cell behaviour studies in subconfluent cultures. *J. Microsc.*, **179**, 11–21.
 124. Mashanov, G.I., Molloy, J.E. (2007) Automatic detection of single fluorophores in live cells. *Biophys. J.*, **92**, 2199–2211.
 125. Gu, Y., Di, W.L., Kelsell, D.P., Zicha, D. (2004) Quantitative fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement with acceptor photobleaching and spectral unmixing. *J. Microsc.*, **215**, 162–173.
 126. Zicha, D., Dobbie, I.M., Holt, M.R., Monypenny, J., Soong, D.Y.H., Gray, C., Dunn, G.A. (2003) Rapid actin transport during cell protrusion. *Science*, **300**, 142–145.
 127. Dunn, G.A., Dobbie, I.M., Monypenny, J., Holt, M.R., Zicha, D. (2002) Fluorescence localization after photobleaching (FLAP): a new method for studying protein dynamics in living cells. *J. Microsc.*, **205**, 109–112.
 128. Maroudas, N.G. (1977) Sulphonated polystyrene as an optimal substratum for the adhesion and spreading of mesenchymal cells in monovalent and divalent saline solutions. *J. Cell. Physiol.*, **90**, 511–519.
 129. Amstein, C.F., Hartman, P.A. (1975) Adaptation of plastic surfaces for tissue culture by glow discharge. *J. Clin. Microbiol.*, **2**, 46–54.
 130. Curtis, A.S., Forrester, J.V., McInnes, C., Lawrie, F. (1983) Adhesion of cells to polystyrene surfaces. *J. Cell Biol.*, **97**, 1500–1506.
 131. Yamaguchi, S., Matsunuma, E., Nagamune, T. (2011) Immobilized culture and transfection microarray of non-adherent cells. *Methods Mol. Biol.*, **706**, 151–157.
 132. Kato, K., Umezawa, K., Funeriu, D.P., Miyake, M., Miyake, J., Nagamune, T. (2003) Immobilized culture of nonadherent cells on an oleyl poly(ethylene glycol) ether-modified surface. *Biotechniques*, **35**, 1014–1021.
 133. Mangoni, M.L., Papo, N., Barra, D., Simmaco, M., Bozzi, A., Di Giulio, A., Rinaldi, A. C. (2004) Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane permeability and viability of *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **380**, 859–865.
 134. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. Watson, J.D. (1994) *Molecular Biology of the Cell*, 3rd edition. New York and London: Garland Publishing. 1352 p.
 135. Swift, L.L., Farkas, M.H., Major, A.S., Valyi-Nagy, K., Linton, M.F., Fazio, S. (2001) A recycling pathway for resecretion of internalized apolipoprotein E in liver cells. *J. Biol. Chem.*, **276**, 22965–229670.
 136. Ivankovic-Dikic, I., Grönroos, E., Blaukat, A., Barth, B. U., Dikic, I. (2000) Pyk2 and FAK regulate neurite outgrowth induced by growth factors and integrins. *Nat. Cell Biol.*, **2**, 574–581.
 137. Miller, K.A., Eklund, E.A., Peddinghaus, M.L., Cao, Z., Fernandes, N., Turk, P. W., Thimmapaya, B., Weitzman, S.A. (2001) Kruppel-like factor 4 regulates laminin alpha 3A expression in mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **276**, 42863–42868.
 138. Wan, L.Q., Ronaldson, K., Park, M., Taylor, G., Zhang, Y., Gimble, J.M., Vunjak-Novakovic, G. (2011)

- Micropatterned mammalian cells exhibit phenotype-specific left-right asymmetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 12295–12300.
139. Lavoie, J.N., Champagne, C., Gingras, M.C., Robert, A. (2000) Adenovirus E4 open reading frame 4-induced apoptosis involves dysregulation of Src family kinases. *J. Cell Biol.*, **150**, 1037–1056.
140. Nakano, J., Yasui, H., Lloyd, K. O., Muto, M. (1999) Biologic roles of gangliosides G(M3) and G(D3) in the attachment of human melanoma cells to extracellular matrix proteins. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **4**, 173–176.
141. Read, M.A., Whitley, M.Z., Gupta, S., Pierce, J.W., Best, J., Davis, R.J., Collins, T. (1997) Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.*, **272**, 2753–2761.
142. Laurance, M.E., Kwok, R.P., Huang, M.S., Richards, J.P., Lundblad, J.R., Goodman, R.H. (1997) Differential activation of viral and cellular promoters by human T-cell lymphotropic virus-1 tax and cAMP-responsive element modulator isoforms. *J. Biol. Chem.*, **272**, 2646–2651.
143. Kuhn, T.B., Brown, M.D., Bamberg, J.R. (1998) Rac1-dependent actin filament organization in growth cones is necessary for beta1-integrin-mediated advance but not for growth on poly-D-lysine. *J. Neurobiol.*, **37**, 524–540.
144. Sugawara, T., Tsurubuchi, Y., Agarwala, K.L., Ito, M., Fukuma, G., Mazaki-Miyazaki, E., Nagafuji, H., Noda, M., Imoto, K., Wada, K., Mitsudome, A., Kaneko, S., Montal, M., Nagata, K., Hirose, S., Yamakawa, K. (2001) A missense mutation of the Na⁺ channel alpha II subunit gene Na(v)1.2 in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6384–6389.
145. Santambrogio, L., Belyanskaya, S.L., Fischer, F.R., Cipriani, B., Brosnan, C.F., Ricciardi-Castagnoli, P., Stern, L.J., Strominger, J.L., Riese, R. (2001) Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6295–6300.
146. Tanner, S.L., Franzen, R., Jaffe, H., Quarles, R.H. (2000) Evidence for expression of some microtubule-associated protein 1B in neurons as a plasma membrane glycoprotein. *J. Neurochem.*, **75**, 553–562.
147. Bissell, M.J., Rizki, A., Mian, I.S. (2003) Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 753–62.
148. Tibbitt, M.W., Anseth, K.S. (2009) Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **103**, 655–663.
149. Zhang, S. (2004) Beyond the Petri dish. *Nat. Biotechnol.*, **22**, 151–152.
150. Griffith, L.G., Swartz, M.A. (2006) Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 211–224.
151. Elsdale, T., Bard, J. (1972) Collagen substrata for studies on cell behavior. *J. Cell Biol.*, **54**, 626–637.
152. Pampaloni, F., Reynaud, E.G., Stelzer, E.H.K. (2007) The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 839–845.
153. Weaver, V.M., Petersen, O.W., Wang, F., Larabell, C.A., Briand, P., Damsky, C. Bissell, M.J. (1997) Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J. Cell Biol.*, **137**, 231–245.

154. Roskelley, C.D., Desprez, P.Y., Bissell, M.J. (1994) Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12378–12382.
155. Yamada, K. M., Cukierman, E. (2007) Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*, **130**, 601–610.
156. Bissell, M.J., Radisky, D.C., Rizki, A., Weaver, V.M., Petersen, O.W. (2002) The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation*, **70**, 537–46.
157. Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., Discher, D.E. (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, **126**, 677–689.
158. Sabeh, F., Shimizu-Hirota, R., Weiss, S.J. (2009) Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J. Cell Biol.*, **185**, 11–19.
159. Buxboim, A., Ivanovska, I.L. Discher, D.E. (2010) Matrix elasticity, cytoskeletal forces and physics of the nucleus: how deeply do cells «feel» outside and in? *J. Cell Sci.*, **123**, 297–308.
160. Zegers, M.M.P., O'Brien, L.E., Yu, W., Datta, A., Mostov, K.E. (2003) Epithelial polarity and tubulogenesis in vitro. *Trends Cell Biol.*, **13**, 169–176.
161. Pampaloni, F., Stelzer, E. (2010) Three-dimensional cell cultures in toxicology. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **26**, 117–138.
162. Pampaloni, F., Stelzer, E.H.K., Masotti, A. (2009) Three-dimensional tissue models for drug discovery and toxicology. *Recent Pat. Biotechnol.*, **3**, 103–117.
163. Lee, G.Y., Kenny, P.A., Lee, E.H., Bissell, M.J. (2007) Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat. Methods*, **4**, 359–365.
164. Wang, Y.L., Pelham, R. J. (1998) Preparation of a flexible, porous polyacrylamide substrate for mechanical studies of cultured cells. *Methods Enzymol.*, **298**, 489–496.
165. Moldavan, A. (1934) Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. *Science*, **80**, 188–189.
166. Givan, A.L. (2011) Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol. Biol.*, **699**, 1–29.
167. Cornwall, J.B., Davison, R.M. (1960) Rapid counter for small particles in suspension. *J. Sci. Instrum.*, **37**, 414–417.
168. Gucker, F.T., O'Konski, C.T. (1947) A photoelectric counter for colloidal particles. *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2422–2431.
169. Beirne, T., Hutcheon, J.M. (1957) A photoelectric particle counter for use in the sieve range. *J. Sci. Instrum.*, **34**, 196–200.
170. Coulter, W.H. (1953) Means for counting particles suspended in a fluid. Patent US2656508 (A).
171. Bakke, A.C. (2001) The Principles of Flow Cytometry. *LabMedicine*, **32**, 207–211.
172. Guo, J., Pui, T.S., Ban, Y.-L., Rahman, A., Kang, Y. (2013) Electrokinetic Analysis of Cell Translocation in Low-Cost Microfluidic Cytometry for Tumor Cell Detection and Enumeration. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **60**(12):3269–3275.
173. Yang, W., Huang, H., Wang, Y., Yu, X., Yang, Z. (2013) High red blood cell distribution width is closely associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **26**, 174–178.
174. Zhang, W., McLamore, E.S., Garland, N.T., Leon, J.V.C., Banks, M.K. (2013) A simple method for quantifying biomass cell and poly-

- mer distribution in biofilms. *J. Microbiol. Methods*, **94**, 367–374.
175. Kamentsky, L.A., Melamed, M.R., Derman, H. (1965) Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. *Science*, **150**, 630–631.
176. Dittrich, W., Göhde, W. (1969) Impulsfluorometrie bei einzelnzellen in suspensionen. *Z Naturforsch*, **24b**, 221–228.
177. VanDilla, M.A., Trujillo, T.T., Mullaney, P.F., Coulter, J.R. (1969) Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science*, **163**, 1213–1214.
178. Crosland-Taylor, P.J. (1953) A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature*, **171**, 37–38.
179. Piyasena, M.E., Graves, S.W. (2014) The intersection of flow cytometry with microfluidics and microfabrication. *Lab Chip*, **14**, 1044–1059.
180. Radcliff, G., Jaroszeski, M. J. (1998) Basics of flow cytometry. *Methods Mol. Biol.*, **91**, 1–24.
181. Nebe-von Caron, G., Badley R.A. (1996) Bacterial characterization by flow cytometry. In Al-Rubeai, M., Emery, N. (Ed.), *Flow cytometry applications in cell culture*. New York, Hong Kong: Marcel Dekker, Inc. P. 257–290.
182. Givan, L.A. (2001) *Flow Cytometry: First Principles*, 2nd Edition. New York: Wiley-Liss, Inc. 296 p.
183. Ibrahim, S.F., van den Engh, G. (2007) Flow cytometry and cell sorting. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **106**, 19–39.
184. Davey, H.M., Kell, D.B. (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol. Rev.*, **60**, 641–696.
185. Davey, H.M., Winson, M.K. (2003) Using flow cytometry to quantify microbial heterogeneity. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **5**, 9–15.
186. Chen, G., Hayhurst, A., Thomas, J.G., Harvey, B. R., Iverson, B.L., Georgiou, G. (2001) Isolation of high-affinity ligand-binding proteins by periplasmic expression with cytometric screening (PECS) *Nat. Biotechnol.*, **19**, 537–542.
187. Kalyuzhnaya, M.G., Zabinsky, R., Bowerman, S., Baker, D.R., Lidstrom, M.E., Chistoserdova, L. (2006) Fluorescence in situ hybridization-flow cytometry-cell sorting-based method for separation and enrichment of type I and type II methanotroph populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 4293–4301.
188. Ward, M., Turner, P., DeJohn, M., Kaduchak, G. (2009) Fundamentals of acoustic cytometry. *Curr. Protoc. Cytom.*, **49**, 1.22.1–1.22.12.
189. Kundt, A., Lehmann, O. (1874) Ueber longitudinale Schwingungen und Klangfiguren in cylindrischen Flüssigkeitssäulen. *Ann. der Phys. und Chemie.*, **229**, 1–12.
190. Curtis, H., Stephans, E. (1982) Ultrasonic continuous flow plasmapheresis separator. *IBM Tech. Disc. Bull.*, **25**, 192–193.
191. Coakley, W.T., Bardsley, D.W., Grundy, M.A., Zamani, F., Clarke, D.J. (1989) Cell manipulation in ultrasonic standing wave fields. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **1**, 43–62.
192. Coakley, W.T., Hawkes, J.J., Sobanski, M.A., Cousins, C.M., Spengler, J. (2000) Analytical scale ultrasonic standing wave manipulation of cells and microparticles. *Ultrasonics.*, **38**, 638–641.
193. Yasuda, K., Haupt, S.S., Umemura, S., Yagi, T., Nishida, M., Shibata, Y. (1997) Using acoustic radiation force as a concentration method for erythrocytes. *J. Acoust. Soc. Am.*, **102**, 642–645.
194. Goddard, G., Kaduchak, G. (2005) Ultrasonic particle concentration

- in a line-driven cylindrical tube. *J. Acoust. Soc. Am.*, **117**, 3440–3447.
195. Goddard, G., Martin, J.C., Graves, S.W., Kaduchak, G. (2006) Ultrasonic particle-concentration for sheathless focusing of particles for analysis in a flow cytometer. *Cytometry A.*, **69**, 66–74.
 196. Goddard, G.R., Sanders, C.K., Martin, J.C., Kaduchak, G., Graves, S.W. (2007) Analytical performance of an ultrasonic particle focusing flow cytometer. *Anal. Chem.*, **79**, 8740–8746.
 197. Austin Suthanthiraraj, P.P., Graves, S.W. (2013) Fluidics. *Curr. Protoc. Cytom.*, **65**, 1.2.1–1.2.22.
 198. Piyasena, M.E., Austin Suthanthiraraj, P.P., Applegate, R.W. Jr., Goumas, A.M., Woods, T.A., López, G.P., Graves, S.W. (2012) Multinodal acoustic focusing for parallel flow cytometry. *Anal. Chem.*, **84**, 1831–1839.
 199. Goix, P.J. (2004) Method and apparatus for detecting microparticles in fluid samples. Patent US 6710871 B1.
 200. Huh, D., Gu, W., Kamotani, Y., Grothberg, J.B., Takayama, S. (2005) Microfluidics for flow cytometric analysis of cells and particles. *Physiol. Meas.*, **26**, R73–R98.
 201. Wen, N., Zhao, Z., Fan, B., Chen, D., Men, D., Wang, J., Chen, J. (2016) Development of droplet microfluidics enabling high-throughput single-cell analysis. *Molecules.*, **21**, 1–13.
 202. Chen, J., Xue, C., Zhao, Y., Chen, D., Wu, M.H., Wang, J. (2015) Microfluidic impedance flow cytometry enabling high-throughput single-cell electrical property characterization. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 9804–9830.
 203. Reece, A., Xia, B., Jiang, Z., Noren, B., McBride, R., Oakey, J. (2016) Microfluidic techniques for high throughput single cell analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **40**, 90–96.
 204. Folch, A. (2013) Introduction to bioMEMS. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. 492 p.
 205. Fan, B., Li, X., Chen, D., Peng, H., Wang, J., Chen, J. (2016) Development of microfluidic systems enabling high-throughput single-cell protein characterization. *Sensors (Basel)*, **16**, 1–12.
 206. Евстрапов, А.А. (2011) Микрофлюидные чипы для биологических и медицинских исследований. *Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева*, **LV**, 99–110.
 207. Евстрапов, А.А., Лукашенко, Т.А., Рудницкая, Г.Е., Буляница, А.Л., Курочкин, В.Е., Гусев, В.С., Иванов, О.Г., Беркутова, И.Ф., Савицкая, А.А. (2012) Микрофлюидные чипы из стеклянных материалов. *Научное приборостроение*, **22**, 27–43.
 208. Frankowski, M., Theisen, J., Kummrow, A., Simon, P., Ragusch, H., Bock, N., Schmidt, M., Neukammer, J. (2013) Microflow cytometers with integrated hydrodynamic focusing. *Sensors (Basel)*, **13**, 4674–4693.
 209. Sobek, D. (1997) Microfabricated fused silica flow chambers for flow cytometry: Thesis Ph. D. Cambridge: Massachusetts Institute of Technology, 232 p.
 210. Daniele, M.A., Boyd, D.A., Mott, D.R., Ligler, F.S. (2015) 3D hydrodynamic focusing microfluidics for emerging sensing technologies. *Biosens. Bioelectron.*, **67**, 25–34.
 211. Lee, G., Chang, C., Huang, S., Yang, R. (2006) The hydrodynamic focusing effect inside rectangular microchannels. *J. Micromechanics Microengineering*, **16**, 1024–1032.
 212. Simonnet, C., Groisman, A. (2005) Two-dimensional hydrodynamic focusing in a simple microfluidic device. *Appl. Phys. Lett.*, **87**, id. 114104. doi:10.1063/1.2046729.
 213. Simonnet, C., Groisman, A. (2006) High-throughput and high-reso-

- lution flow cytometry in molded microfluidic devices. *Anal. Chem.*, **78**, 5653–5663.
214. Villarruel, C.A., Lou, J.W., Schermer, R. (2012) Tubular Array for Fluidic Focusing with Integrated Optical Access Region. Patent US 8651138 B2.
215. Kummrow, A., Theisen, J., Frankowski, M., Tuchscheerer, A., Yildirim, H., Brattke, K., Schmidt, M., Neukammer, J. (2009) Microfluidic structures for flow cytometric analysis of hydrodynamically focussed blood cells fabricated by ultraprecision micromachining. *Lab Chip.*, **9**, 972–981.
216. Frankowski, M., Bock, N., Kummrow, A., Schädel-Ebner, S., Schmidt, M., Tuchscheerer, A., Neukammer, J. (2011) A microflow cytometer exploited for the immunological differentiation of leukocytes. *Cytometry. A.*, **79**, 613–624.
217. Oakey, J., Applegate, R.W.Jr., Arellano, E., Di Carlo D., Graves, S.W., Toner, M. (2010) Particle focusing in staged inertial microfluidic devices for flow cytometry. *Anal. Chem.*, **82**, 3862–3867.
218. Hur, S.C., Tse, H.T.K., Di Carlo D. (2010) Sheathless inertial cell ordering for extreme throughput flow cytometry. *Lab Chip.*, **10**, 274–280.
219. Lenshof, A., Magnusson, C., Laurell, T. (2012) Acoustofluidics 8: Applications of acoustophoresis in continuous flow microsystems. *Lab Chip.*, **12**, 1210.
220. Yang, A.H.J., Soh, H.T. (2012) Acoustophoretic sorting of viable mammalian cells in a microfluidic device. *Anal. Chem.*, **84**, 10756–10762.
221. He, M., Edgar, J.S., Jeffries, G.D., Lorenz, R.M., Shelby, J.P., Chiu, D.T. (2005) Selective encapsulation of single cells and subcellular organelles into picoliter- and femtoliter-volume droplets. *Anal. Chem.*, **77**, 1539–1544.
222. Tan, Y.C., Hettiarachchi, K., Siu, M., Pan, Y.R., Lee, A.P. (2006) Controlled microfluidic encapsulation of cells, proteins, and microbeads in lipid vesicles. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 5656–5658.
223. Luo, D., Pallela, S.R., Marquez, M., Cheng, Z. (2007) Cell capsules with tunable transport and mechanical properties. *Biomicrofluidics*, **1**, 34102. doi: 10.1063/1.2757156.
224. Edd, J.F., Di Carlo, D., Humphry, K.J., Köster, S., Irimia, D., Weitz, D.A., Toner, M. (2008) Controlled encapsulation of single-cells into monodisperse picolitre drops. *Lab Chip.*, **8**, 1262–1264.
225. Lindström, S., Andersson-Svahn, H. (2010) Overview of single-cell analyses: microdevices and applications. *Lab Chip.*, **10**, 3363–3372.
226. Mahieu, S., Vertessen, F., Van der Planken, M. (2004) Evaluation of ADVIA 120 CSF assay (Bayer) vs. chamber counting of cerebrospinal fluid specimens. *Clin. Lab. Haematol.*, **26**, 195–199.
227. Wlodkovic, D., Cooper, J.M. (2010) Microfluidic cell arrays in tumor analysis: new prospects for integrated cytomics. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **10**, 521–530.
228. Caroprese, M., Marzano, A., Schena, L., Sevi, A. (2008) Technical note: immunomagnetic procedure for positive selection of macrophages in ovine milk. *J. Dairy Sci.*, **91**, 1908–1912.
229. Chetverin, A.B., Chetverina, H.V., Samatov, T.R. (2007) Non-invasive molecular colony methods, kits and apparatus. Patent EP1999268.
230. Gordeev, A.A., Samatov, T.R., Chetverina, H.V., Chetverin, A.B. (2011) 2D format for screening bacterial cells at the throughput of flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.*, **108**, 2682–2690.

231. Gordeev, A.A., Chetverina, H.V., Chetverin, A.B. (2012) Planar arrangement of eukaryotic cells in merged hydrogels combines the advantages of 3-D and 2-D cultures. *Biotechniques*, **52**, 325–331.
232. Eden, E., Geva-Zatorsky, N., Issaeva, I., Cohen, A., Dekel, E., Danon, T., Cohen, L., Mayo, A., Alon, U. (2011) Proteome half-life dynamics in living human cells. *Science*, **331**, P. 764–768.
233. Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J.F., Harrington, K., Sahai, E. (2007) Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.*, **9**, 1392–1400.
234. Kraehenbuehl, T.P., Langer, R., Ferreira, L. S. (2011) Three-dimensional biomaterials for the study of human pluripotent stem cells. *Nat. Methods*, **8**, 731–736.
235. Shapira-Schweitzer, K., Habib, M., Gepstein, L., Seliktar, D. (2009) A photopolymerizable hydrogel for 3-D culture of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes and rat neonatal cardiac cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **46**, 213–224.
236. Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R., Yamada, K. M. (2001) Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, **294**, 1708–1712.
237. Katz, E., Dubois-Marshall, S., Sims, A.H., Gautier, P., Caldwell, H., Meehan, R.R., Harrison, D.J. (2011) An in vitro model that recapitulates the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human breast cancer. *PLoS One*, **6**, e17083.
238. Katz, E., Dubois-Marshall, S., Sims, A.H., Faratian, D., Li, J., Smith, E. S., Quinn, J.A., Edward, M., Meehan, R.R., Evans, E.E., Langdon, S.P., Harrison, D. J. (2010) A gene on the HER2 amplicon, C35, is an oncogene in breast cancer whose actions are prevented by inhibition of Syk. *Br. J. Cancer*, **103**, 401–410.
239. Amjad, S.B., Carachi, R., Edward, M. (2007) Keratinocyte regulation of TGF-beta and connective tissue growth factor expression: a role in suppression of scar tissue formation. *Wound Repair Regen.*, **15**, 748–755.
240. Serebriiskii, I., Castelló-Cros, R., Lamb, A., Golemis, E.A., Cukierman, E. (2008) Fibroblast-derived 3D matrix differentially regulates the growth and drug-responsiveness of human cancer cells. *Matrix Biol.*, **27**, 573–585.
241. Ulrich, T.A., Jain, A., Tanner, K., MacKay, J.L., Kumar, S. (2010) Probing cellular mechanobiology in three-dimensional culture with collagen-agarose matrices. *Biomaterials*, **31**, 1875–1884.
242. Ozaki, Y., Uda, S., Saito, T.H., Chung, J., Kubota, H., Kuroda, S. (2010) A quantitative image cytometry technique for time series or population analyses of signaling networks. *PLoS One*, **5**, e9955.
243. Henriksen, M., Miller, B., Newmark, J., Al-Kofahi, Y., Holden, E. (2011) Laser scanning cytometry and its applications: a pioneering technology in the field of quantitative imaging cytometry. *Methods Cell Biol.*, **102**, 161–205.
244. Conrad, C., Wunsche, A., Tan, T. H., Bulkescher, J., Sieckmann, F., Verissimo, F., Edelstein, A., Walter, T., Liebel, U., Pepperkok, R., Ellenberg, J. (2011) Micropilot: automation of fluorescence microscopy-based imaging for systems biology. *Nat. Methods*, **8**, 246–249.
245. Webster G.A., Bowles M.J., Karim M.S., Wood R.F., Pockley A.G., (1995) Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocyte subset light scatter characteristics as a means of monitoring the development of rat small bowel allograft rejection. *Clin Exp Immunol.*, **100**, 536–542.