

*Коломиец О. О., Глушен С. В.*

**ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ИЗМЕРЕНИЕ ДНК  
МЕТОДОМ СТАТИЧЕСКОЙ ЦИТОМЕТРИИ**

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

*Статья посвящена определению объема выборки и минимизации случайной и систематической ошибок в методе статической цитометрии ДНК*

*Ключевые слова: ДНК, цитометрия, клеточное ядро*

*Kalamiyets A. A., Gloushen S. V.*

**FACTORS INFLUENCING MEASURING DNA  
BY THE METHOD OF STATIC CYTOMETRY**

*Belarusian State University, Minsk, Belarus*

*The article is devoted to estimate the sample size and minimizing random and systematic errors in the method of static DNA cytometry.*

*Key words: DNA, cytometry, cell nucleus*

Статическая цитометрия представляет собой метод количественной цитологии, основанный на компьютерных технологиях получения и обработки изображений клеток. С его помощью можно определять ploидность нормальных и патологически измененных клеток, исследовать кинетику ДНК в клеточном цикле, определять состав гетерогенных клеточных популяций и т.п. [1]. Однако по сравнению с проточной цитометрией этот метод отличается пониженной точностью и повторяемостью данных.

В связи с этим целью работы было повышение качества измерения содержания ДНК в клеточных ядрах методом статической цитометрии. При этом решались задачи определения объема выборки, необходимого для получения результата с заданным уровнем точности, и минимизации ошибок, возникающих в процессе анализа.

Исследование выполнялось на клеточных ядрах паренхимы зрелых листьев перца сладкого *Capsicum annuum*, пролиферация клеток в которых уже закончилась. Выделение клеточных ядер и приготовление из них препаратов проводилось по разработанной ранее методике [2]. Препараты исследовали с

помощью микроскопа Eclipse 50i (Nikon). Микрофотографии клеточных ядер обрабатывали программой ImageJ, измеряя интенсивность флуоресценции связанного с ДНК бромида этидия. Полученные данные использовались затем для построения ДНК-цитогамм в программе Origin.

Всего было проведено 12 серий анализов с различным сочетанием изучаемых факторов. В каждой серии рассчитывали зависимость параметров вариационной статистики от размера выборки. Уровень случайной ошибки оказалось удобнее оценивать, используя в качестве контрольного параметра ошибку средней, тогда как систематическая ошибка лучше выявлялась по стандартному отклонению.

График зависимости среднего арифметического от величины выборки (рис. 1) имеет вид обратной экспоненты, достигая величины менее 2% после накопления 300 и более измерений. Дальнейшее увеличение количества измерений не приводит к существенному снижению этого параметра.

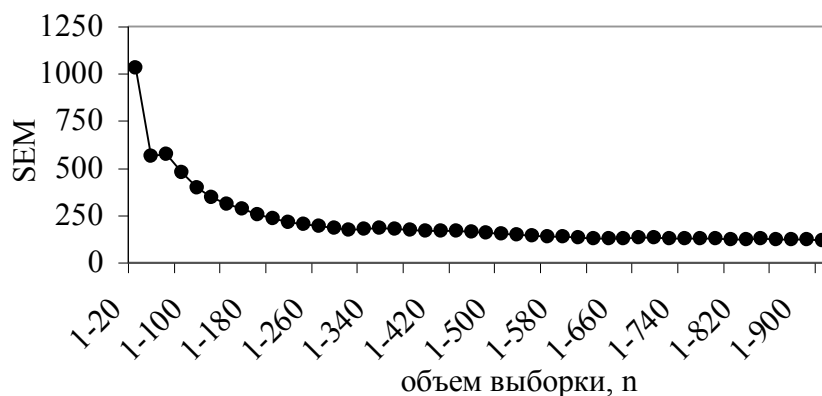


Рис 1. Зависимость ошибки среднего (SEM) от величины выборки (n)

График зависимости стандартного отклонения среднего арифметического от размера выборки позволяет увидеть, что после уменьшения до минимума (приблизительно при 340 измерениях), наблюдается ее небольшой рост, носящий волнообразный характер (рис. 2). Поскольку величина выборки уже достигла заданной точности, такое поведение стандартного отклонения было расценено как отражение систематических ошибок, возникающих в процессе анализа.

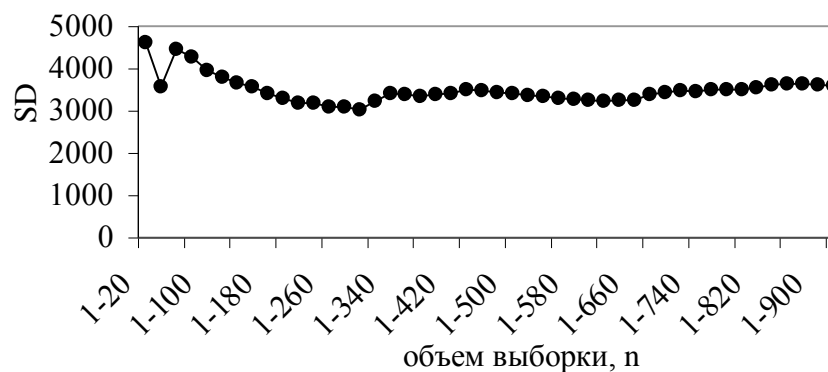


Рис 2. Зависимость величины стандартного отклонения (SD) от величины выборки (n)

В работе были предприняты меры для минимизации систематической ошибки, возникающей под влиянием ряда факторов.

**Высыхание препарата.** Для его предотвращения была использована специальная камера, которую изготавливали из двухстороннего скотча и закрывали покровным стеклом. При этом обеспечивалась также более высокая концентрация клеток, что ускоряло процесс съемки.

**Динамический диапазон телекамеры.** При проведении количественных исследований интенсивность флуоресценции должна быть пропорциональна количеству ДНК. Однако это условие выполняется только в том случае, если свет не вызывает насыщения в ПЗС-матрице. Используемая нами телекамера DS-5Mc (Nikon) обладает высокой чувствительностью, но диапазон, в котором соблюдается пропорциональность, у нее ограничен. Для устранения этого источника ошибок рекомендуется в процессе съемки следить за тем, чтобы интенсивность флуоресценции наиболее ярких клеточных ядер не достигала максимального уровня, задаваемого в настройках телекамеры.

**Равномерность распределения клеточных ядер в суспензии.** Третьим и, пожалуй, наиболее важным источником систематических ошибок оказалось неравномерное оседание клеточных ядер в пробирке. Для устранения этого эффекта необходимо непосредственно перед приготовлением препарата тщательно перемешивать суспензию с помощью вортекса.

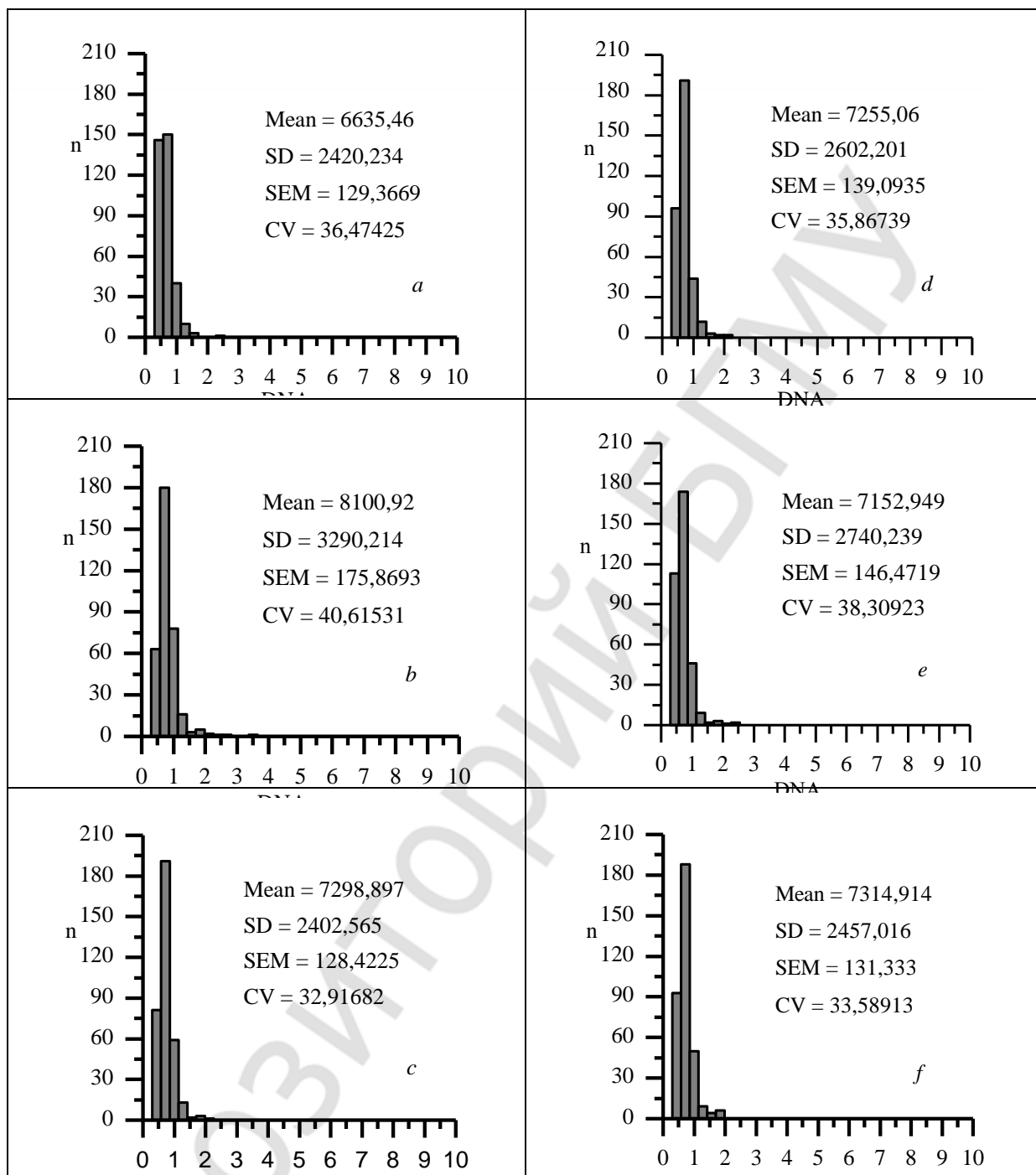


Рис 3. Воспроизводимость ДНК-цитогрaмм, полученных без применения вортекса (*a, b, c*) и с ним (*d, e, f*). Mean – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение, SEM – стандартная ошибка среднего, CV – коэффициент вариации.

Как следует из представленных на рис. 3 данных при контроле равномерности клеточных ядер в суспензии оценки относительного содержания ДНК в последовательно проведенных анализах трех препаратов одной пробы совпадают на уровне вероятности ошибки менее 5%.

На основании полученных результатов были сделаны следующие выводы:

1. Оптимальная величина выборки для измерения относительного содержания ДНК в клеточных ядрах и построения ДНК-цитограмм в наших условиях составила 300-350 клеточных ядер. При этом ошибка определения относительного содержания ДНК не превысила 2%.

2. Применение закрытой камеры в препарате, контроль динамического диапазона телекамеры и равномерное распределение клеточных ядер в пробе обеспечивают в совокупности повторяемость данных на уровне  $p < 0,05$ .

Таким образом, можно надеяться, что при соблюдении указанных выше условий, качество измерений ДНК в клеточных ядрах, проводимых с помощью статической цитометрии, позволит решать задачи количественной цитологии на современном научно-методическом уровне.

#### Литература

1. Пичугин Ю.Г., Семьянов К.А., Чернышев А.В. [и др.]. Особенности цитометрических методов определения содержания ДНК в ядре // Цитология. – 2012, Т.54, № 2. – С. 185–190.
2. Коломиец О.О., Павлова И.В., Глушен С.В. Цитометрический анализ плоидности и пролиферации клеток у растущих *in vitro* линий овощных культур // Труды БГУ. – 2015, Т.10, Ч. 1. – С. 116–121.