

П.Д. НОВИКОВ, Д.К. НОВИКОВ
Витебский медицинский
университет, Беларусь

УДК 612.017.1.003.12

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ ЛИМФОЦИТОВ

Активированные частицы покрывали антителами против иммуноглобулинов мышей. Затем мышинные моноклональные антитела против антигенов CD3, CD4, CD8, T-лимфоцитов, CD22 B-лимфоцитов связывали с ними. В результате получили диагностикумы, которые использовали в тестах розеткообразования с лейкоцитами (лимфоцитами) крови человека. Результаты тестов розеткообразования коррелировали с проточной цитометрией и непрямой иммунофлюоресценцией.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лимфоциты, иммунофенотипирование.

COMPARATIVE EVALUATION OF CONTEMPORARY METHODS OF LYMPHOCYTES IMMUNOPHENOTYPING

P.D. NOVIKOV, D.K. NOVIKOV
Vitebsk Medical University, Belarus

Different ways of their activation for bounding the antibodies were tested. In the first stage, activated erythrocytes were covered with antibodies against mouse immunoglobulins. In the second stage, the mouse monoclonic antibodies against antigens of CD4, CD8, T-lymphocytes, CD22 B-lymphocytes were bounded with them. As a result an erythrocytic diagnosticum was obtained which was applied in the rosette building test with leukocytes of human blood. Results of rosetta binding tests correlated with flow cytometry.

KEY WORDS: lymphocytes, immunophenotyping.

За последние годы сведения о роли иммунопатогенетических механизмов в развитии аллергических, аутоиммунных, онкологических, инфекционных и многих других заболеваний значительно расширились. При них обнаруживаются различные изменения со стороны системы иммунитета: снижается фагоцитарная активность лейкоцитов, отмечаются дисиммуноглобулинемии, снижается уровень T-лимфоцитов и B-лимфоцитов с дисбалансом их субпопуляций.

Наиболее существенными показателями состояния иммунной системы являются количественная и/или

функциональная характеристики субпопуляций ее клеток. Определение этих параметров уже налажено в лечебно-профилактических учреждениях во многих странах.

К настоящему времени практически сформировался стандарт, в котором осуществляется идентификация иммунокомпетентных клеток и определение их функциональной способности. Он включает:

- выделение лейкоцитарной фракции крови;
- взаимодействие выделенных клеток с моноклональными антителами к рецепторам-маркерам клеточных популяций;

- обработку клеток моно- или поликлональным антимышиным антииммуноглобулиновым конъюгатом, меченным флюорохромом;

- идентификацию маркер-несущей субпопуляции при помощи метода проточной цитометрии или иммунофлюоресценции.

Данный подход получил широкое распространение в странах Западной Европы и США и СНГ [2, 4, 5-7, 8].

Основной недостаток такого подхода - необходимость использования для оценки проточного цитометра или иммунофлюоресцентного микроскопа.

Стоимость проточного цитометра составляет (в зависимости от фирмы-изготовителя) от 100 до 230 тыс. долларов США. Кроме того, в странах СНГ, серийно данные приборы вообще не производятся.

Несмотря на это, важность системы иммунологического мониторинга населения, и особенно - отдельных его контингентов (ликвидаторов аварии на ЧАЭС, детей, лиц с первичными и вторичными иммунодефицитами, аллергическими заболеваниями) не подлежит сомнению.

Мы считаем, что существует возможность отказа от использования дорогостоящего импортного оборудования и реактивов для определения субпопуляций клеток системы иммунитета.

Это возможно при изменении схемы определения иммуноцитов следующим образом (этапы определения):

- выделение лейкоцитарной фракции крови;
- взаимодействие иммунокомпетентных клеток с диагностикумами, включающими сферический носитель (латекс или эритроциты), покрытый моноклональными антителами к СД-антигенам лимфоцитов. Принципиальная возможность такого подхода подтверждена нашими предыдущими работами [3, 4].

- цитологический подсчет образующихся розеток.

Отсюда целью нашей работы является сравнительная характеристика иммунофенотипирования лимфоцитов методами проточной цитометрии, иммунофлюоресценции и стабильными диагностикумами на основе моноклональных антител (МАТ) с регистрацией результатов при обычной световой микроскопии.

Материал и методы исследования. *Обследовано 109 детей: с острым бронхитом (n=39), рецидивирующим бронхитом (n=37) и 33 здоровых детей в возрасте 8-14 лет.*

Материалом для исследования служили клетки периферической крови, взятые в период разгара заболевания.

Определение иммунофенотипа лимфоцитов проводилось методами:

- *проточной цитометрии (цитометр Bекson Dickenson);*

- *непрямой иммунофлюоресценции на микроскопе "Люмам-3";*

- *с помощью стабильных диагностикумов на основе моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD25, CD22 - антигенам лимфоцитов с регистрацией результатов при обычной световой микроскопии. Для получения диагностикума на основе МАТ использовали непрямой метод (3,4): фиксированные, активированные эритроциты крупного рогатого скота или частицы латекса покрывали антителами против иммуноглобулинов мыши. Затем на них сорбировали мышинные моноклональные антитела против CD3, CD4, CD8 антигенов Т-лимфоцитов и CD22 антигена В-лимфоцитов. Полученные МАТ-диагностикумы использовали в тестах розеткообразования с суспензией лейкоцитов крови. Подсчет розеткообразующих клеток проводили на фиксированных окрашенных мазках [3,4].*

Для сравнения средних значений использовался метод числовых характеристик (по критерию Стьюдента) с оценкой распределения переменных и расчетом доверительных интервалов. Связь показателей с помощью корреляционного анализа оценивали по методу Спирмана и Кендала.

Результаты:

При сравнении показателей фенотипа лимфоцитов здоровых детей (табл.1), оказалось, что имеется достоверная ($p < 0,05$) разница между уровнями CD3⁺ и CD25⁺-лимфоцитов, определенных с помощью анти-CD-диагностикумов и уровнями CD3⁺ и CD25⁺-лимфоцитов, определенных с помощью метода проточной цитометрии. Однако, если уровень CD3⁺-лимфоцитов был выше при определении на проточном цитометре, то уровень CD25⁺-лимфоцитов был достоверно выше ($p < 0,05$) при детекции с помощью анти-CD-диагностикума. Достоверной разницы между этими методами и методом непрямой иммунофлюоресценции у здоровых детей не было выявлено. Не различались уровни CD22⁺В-лимфоцитов у здоровых детей при определении разными методами (табл. 1)

Таблица 1

Имунофенотипирование лимфоцитов крови здоровых детей методами анти-CD-диагностикумов, иммунофлюоресценции, проточной цитометрии (n= 33)

Методы	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD25 ⁺	CD22 ⁺
МАТ – диагностикум	64,9±4,8	38,2±3,6	20,4±2,2	11,0± 2,1	22±2,3
Непрямая Иммунофлюоресценция	66,5±5,1	36,3±2,9	21,2±3,2	7,7±1,3	21,2±3,1
Проточная цитометрия	75,5±4,3 *	42,4±3,9	22,4±3,1	4,5±2,4 *	23±2,2

* — достоверная разница между относительным количеством лимфоцитов, определяемых анти-CD-диагностикумами и проточной цитометрией с $p < 0,05$.

При сравнении относительных показателей лимфоцитов детей больных острым бронхитом, определенных с помощью анти-CD-диагностикумов, непрямой иммунофлюоресценции и проточной цитометрии, как видно из табл. 2, есть различия между всеми вышеперечисленными методами, но только в отношении CD3 и CD25 антигена. Как и у здоровых детей, у детей с острым бронхитом, достоверно различались уровни CD3⁺ и CD25⁺-лимфоцитов, определенных с помощью

анти-CD-диагностикумов и методом проточной цитометрии, причем с большей значимостью ($p < 0,01$). Уровень CD25⁺-лимфоцитов, выявляемый анти-CD-диагностикумом был также выше уровня CD25⁺ лимфоцитов, определенных методом непрямой иммунофлюоресценции ($p < 0,05$). Кроме того, относительное содержание CD3⁺ лимфоцитов при проточной цитометрии было выше, чем при определении их методом непрямой иммунофлюоресценции ($p < 0,05$).

Таблица 2

Имунофенотипирование лимфоцитов крови детей больных острым бронхитом методами анти-CD-диагностикумов, иммунофлюоресценции, проточной цитометрии (n= 39)

Методы	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD25 ⁺
Диагностикум на основе МАТ	48,9±2,7	33,4±4,1	19,5±2,4	22,4 ± 2,8
Непрямая Иммунофлюоресценция	51,5±4,3 **	34,3±3,6	20,2±3,6	13,7±4,3 ***
Проточная цитометрия	61,5±3,2 *	39,1±2,8	21,7±4,6	7,4±3,2 *

* — достоверная разница между относительным количеством лимфоцитов, определяемых методами анти-CD-диагностикума и проточной цитометрии с $p < 0,01$;

** — недостоверная разница между относительным количеством лимфоцитов, определяемых методами непрямой иммунофлюоресценции и проточной цитометрии с $p > 0,1$;

*** — достоверная разница между относительным количеством лимфоцитов, определяемых методами анти-CD-диагностикума и непрямой иммунофлюоресценции с $p < 0,05$.

При сравнении показателей лимфоцитов детей больных рецидивирующим бронхитом (табл.3), сохранялись такие же различия между показателями, определяемыми разными методами. Уровень CD25 лимфоцитов, определяемый анти-CD-диагностикумом, был выше по сравнению с двумя другими методами. Обращает на себя внимание тот факт, что снижение уровней CD3 и CD4 Т-лимфоцитов и увеличение уровня CD25⁺-лимфоцитов при рецидивирующем бронхите по сравнению со здоровыми и больными острым бронхитом выявлялось всеми тремя методами в одинаковой степени. Различий в уровнях CD22⁺В-лимфоцитов у детей с рецидивирующим бронхитом при определении разными методами не обнаружено (табл. 3)

Обсуждение

При имунофенотипировании лимфоцитов разными методами получены как сходные, так и отличающиеся результаты. С одной стороны, метод проточной цитометрии выявлял достоверно большее количество лимфоцитов несущих на поверхности CD3 антиген, чем анти-CD3-диагностикум, что по всей вероятности связано с плотностью CD3-молекул на поверхности лимфоцита. Во время связывания лимфоцита с частицей покрытой МАТ против CD-антигена, по-видимому, необходимо более плотное распределение CD-молекул на поверхности клетки для образования стабильной розетки. Вследствие этого при фенотипировании анти-CD3-диагностикум выявляются только лимфоциты с достаточной для образования

розетки плотностью CD3-антигена на поверхности. Методом же проточной цитометрии типировались лимфоциты и с более низкой плотностью CD3-молекул на мембране - те у которых достаточно свечения люминесцентных меток МАТ для автоматического подсчета. Кстати, необходимо отметить, что это подтверждается результатами данного исследования: при остром бронхите методом непрямой флюорометрии выявлялось достоверно ($p < 0,05$) меньшее количество CD3⁺лимфоцитов, так как на микроскопе "Люмам-3" подсчет светящихся клеток идет визуально. Интерес-

но то, что у детей, больных рецидивирующим бронхитом, такого различия не наблюдалось, по-видимому, вследствие того, что при рецидивирующем бронхите относительное количество Т-общих лимфоцитов с менее плотным распределением CD3-антигена на мембране уменьшено по сравнению с острым бронхитом настолько, что разница между автоматическим подсчетом проточной цитометрии и визуальным на люминесцентном микроскопе нивелируется. Такие результаты, несомненно, оставляют поле деятельности для дальнейшего изучения.

Таблица 3

Иммунофенотипирование лимфоцитов крови детей больных рецидивирующим бронхитом методами анти-CD-диагностикумов, иммунофлюоресценции, проточной цитометрии (n= 37)

Методы	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD25 ⁺	CD22 ⁺
Диагностикум МАТ	42,5±3,7	29,8±4,1	19,8±1,9	26,3 ±3,5	23,4±2,4
Непрямая Иммунофлюоресценция	47,5±5,3	30,2±5,6	21,0±3,3	14,8±3,7 ***	21,1±3,2
Проточная цитометрия	56,2±4,4 *	35,7±3,1	21,4±2,8	9,6±2,5 *	23,5±2,7

* — достоверная разница между относительным количеством лимфоцитов, определяемых методами анти-CD-диагностикума и проточной цитометрии с $p < 0,01$;

** — достоверная разница между относительным количеством лимфоцитов, определяемых методами непрямой иммунофлюоресценции и проточной цитометрии с $p < 0,05$;

*** — достоверная разница между относительным количеством лимфоцитов, определяемых методами анти-CD-диагностикума и непрямой иммунофлюоресценции с $p < 0,05$.

Вышесказанное, однако, характерно только в отношении CD3-антигена, что связано с его сложной структурой и функциональным значением. В отношении CD4, CD8 и CD22- антигенов достоверных различий между уровнями несущих их лимфоцитов, выявляемыми разными методами, не наблюдалось.

В случае же исследования активационного рецептора к ИЛ-2, CD25-антигена получены обратные результаты. Обнаружен более высокий уровень CD25⁺лимфоцитов, выявляемый методом анти-CD-диагностикумов по сравнению с непрямой иммунофлюоресценцией и проточной цитометрией, что было наиболее выражено при остром и рецидивирующем бронхитах. Возможно это обусловлено особенностью функционирования рецептора к ИЛ-2. Данный рецептор не является такой стабильной структурой как, например, CD3 или CD4-антиген. Его а-цепь после взаимодействия с б-цепью или с с-цепью сбрасывается с мембраны клетки. По-нашему мнению, при проточной цитометрии и непрямой иммунофлюоресценции происходит такой сброс вследствие взаимодействия а-цепи рецептора с Fab-фрагментом моноклонального антитела, по-

тому что такое связывание не препятствует движению молекул в полюс клетки, где собственно и происходит сброс рецепторов. В результате определяется более низкий уровень CD25⁺лимфоцитов. При взаимодействии же а-цепей рецепторов с Fab-фрагментами моноклональных антител Fc-фрагменты которых ковалентно связаны с носителем (эритроцит, латекс) движение такого комплекса существенно ограничено, вследствие чего затруднен сброс молекулы с мембраны. Поэтому методом анти-CD-диагностикумов выявляется большее количество CD25⁺лимфоцитов.

В заключение необходимо отметить, что метод розеткообразования весьма активно применялся на первых этапах изучения клеток иммунной системы. Вся базовая информация о клеточном иммунитете была получена при помощи данного метода [3]. Однако в связи с появлением широкой панели моноклональных антител, используемых в проточной цитометрии, для клеточного типирования интерес к методу розеткообразования несколько снизился. Учитывая, что к настоящему времени уже существуют коммерческие панели моноклональных АТ к маркерам клеточной поверхности, выпускаемые в

СНГ, а также разработаны синтетические носители для конъюгации с моноклональными антителами, представляется необходимым продолжить разработку данного подхода. Достоинствами способа оценки клеточных показателей иммунной системы с помощью анти-CD-диагностикумов являются следующие:

1) удешевление стоимости анализа за счет исключения дорогостоящей аппаратуры этапа использования меченого конъюгата при маркировке клеток, уменьшение количества антител;

2) возможность применения метода в недостаточно оснащенных лабораториях, включая районное звено.

Литература

1. Алиев М.А., Писанко В.А., Зумеров Е.Л., Федотовских Г.В. Способ подготовки Т-розеткообразующих клеток крови для светового и электронно-микроскопического исследования на цитологических мазках-блоках. А.с. 1807308 СССР, МКИ G01N 33/48.
2. Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Соловьева Е.А. Метод проточной цитометрии с применением отечественных моноклональных антител //Клин.лаб.диагностика. - 1994. - N2. - С.49-51.
3. Новиков Д.К. Справочник по клинической иммунологии и аллергологии. Минск, "Беларусь", 1987.
4. Новиков Д.К., Новикова В.И. Оценка иммунного статуса, М. 1996.
5. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Фролова А.В. Стабильные иммунодиагностикумы на основе моноклональных антител для оценки иммунного статуса Сб.: "Иммунодиагностика и иммунотерапия", Труды 1й международной конференции. Витебск – 1995, - с.116-118
6. Bryson G.J., Harmon B.V., Collins R.J. A flow cytometric study of cell death: failure of some models to correlate with morphological assessment //J.Immunol.Cell.Biol. - 1994. - Vol.72, N1. - P.35-41.
7. Lambert P.H., Metzger H., Mayamoto T. Clinical immunology: Guidelines for its organisation, training and certification; Relationships with allergology and other medical disciplines. A WHO/IUIS/IAACI Report. //Clin.Exp.Immunol. - 1993. - Vol.93, N3. - P.484-491.
8. Zlatev S., Dimitrov I. A methodological approach for integral assessment of the immune status.// Folia med. - 1993. - Vol.35, N1-2. - P.45-51.