

## ОПЫТ ИЗМЕРЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ ИММУННОГО СТАТУСА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШЕСТИЦВЕТНОГО ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Кудрявцев И.В.<sup>1,2</sup>, Субботовская А.И.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

<sup>3</sup> ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» МЗ РФ, г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** В статье рассматриваются вопросы использования 6-цветного анализа для исследования параметров иммунного статуса методом проточной цитометрии. Цельная кровь условно здоровых доноров окрашивалась комбинацией моноклональных антител HLA-DR-FITC, CD16<sup>+</sup>56-PE, CD4-ECD, CD19-ECD, CD8-PC5.5, CD3-PC7, CD45-APC (Beckman Coulter, США) по безотмывочной технологии. Для настройки напряжения ФЭУ проточного цитометра использовали пробирки, окрашенные каждым моноклональным антителом по отдельности, оптимальным считали напряжение при нахождении негативной популяции по центру первой декады логарифмической шкалы. Настройка компенсаций осуществлялась в автоматическом режиме программного обеспечения проточного цитометра Navios (Beckman Coulter, США). Также рассматривается оптимальная «стратегия гейтирования» для получения искомым популяций Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>), Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), В-клеток (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>), НК-клеток (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), NKT-клеток (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), активированных Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>).

**Ключевые слова:** проточная цитометрия, многоцветный анализ, иммунофенотипирование лимфоцитов

## APPLICATION OF SIX-COLOR FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS FOR IMMUNE PROFILE MONITORING

Kudryavtsev I.V.<sup>a, b</sup>, Subbotovskaya A.I.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Experimental Medicine, North-West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

<sup>c</sup> E.N.Meshalkin Research Institute of Circulation Pathology, Russian Ministry of Health Care, Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** The article deals with applications of six-color flow analysis for studying the immune state parameters by means of flow cytometry. Whole blood from healthy donors was stained with combination of monoclonal

### Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович  
ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.  
Тел.: 8 (812) 234-16-69  
Факс: 8 (812) 234-94-89  
E-mail: igorek1981@yandex.ru

### Address for correspondence:

Kudryavtsev Igor V.  
Research Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences  
197376, Russian Federation, St. Petersburg, I. Pavlov str., 12.  
Phone: 7 (812) 234-16-69  
Fax: 7 (812) 234-94-89  
E-mail: igorek1981@yandex.ru

### Образец цитирования:

И.В. Кудрявцев, А.И. Субботовская, «Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26.  
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26

© Кудрявцев И.В. и соавт., 2015

### For citation:

I.V. Kudryavtsev, A.I. Subbotovskaya, "Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26.  
doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-19-26>

antibodies, i.e., HLA-DR-FITC, CD16<sup>+</sup>56-PE, CD4-ECD, CD19-ECD, CD8-PC5.5, CD3-PC7, CD45-APC (Beckman Coulter, USA) using a “no-wash” technology. To adjust the photomultiplier (PMT) voltage, we used the tubes with each of the tested monoclonal antibodies, PMT voltage was considered optimal when the negative population was located in the middle of the first decade at the logarithmic scale. The compensatory adjustment was performed in automatic mode, using Navios software (Beckman Coulter, USA). We discuss an optimal gating strategy in order to assess the populations of interest: total T cells (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>), T helper cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), cytotoxic T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), B cells (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>), NK cells (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), NKT cells (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), activated T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>).

*Keywords: flow cytometry, multicolor analysis, immunophenotyping*

Поддержано Министерством образования и науки РФ, проект № 1326.

## Введение

В настоящее время метод проточной цитометрии широко применяется для анализа клеточного состава периферической крови. Существенными преимуществами данного метода перед микроскопией является высокая скорость и точность проводимых исследований, а также статистическая достоверность получаемых результатов. Первые исследования, проведенные на проточных цитофлуориметрах с использованием препаратов моноклональных антител, датируются началом 70-х годов XX века, когда появились первые цитофлуориметры, оснащенные аргоновыми и криптоновыми лазерами, что позволило одновременно детектировать красители, содержащие флуоресцеин и родамин [17]. Однако уже в начале 80-х годов с появлением твердотельных лазеров к спектру применяемых флуорохромов был добавлен абсолютно новый класс соединений – фикобилины [18]. К этой группе соединений относятся фикоэритрин (PE) и аллофикоцианин (APC). Уже в конце 80-х годов на основе PE были созданы новые красители, состоящие из двух соединенных вместе флуоресцентных молекул и получившие наименование «тандемных» красителей. К их числу относятся PE-Texas Red, PE-Cy5, PE-Cy5.5, PE-Cy7 и некоторые другие [9]. Появление этих красителей позволило на приборах, оснащенных только голубым лазером, анализировать до 5 флуоресцентных параметров одновременно. В 90-е годы появляются новые тандемные красители для красного лазера, синтезированные на основе APC, и первые синтетические красители семейства Alexa Fluor [14]. Благодаря этому широкому кругу исследователей становится доступным многоцветный анализ с использованием антител, конъюгированных с флуорохромами, для которых применяются лазеры с длинами волн 407, 488 и 595 нм [13], что позволяет, помимо параметров прямого и бокового светорассеяния, оценивать уровень связывания восьми

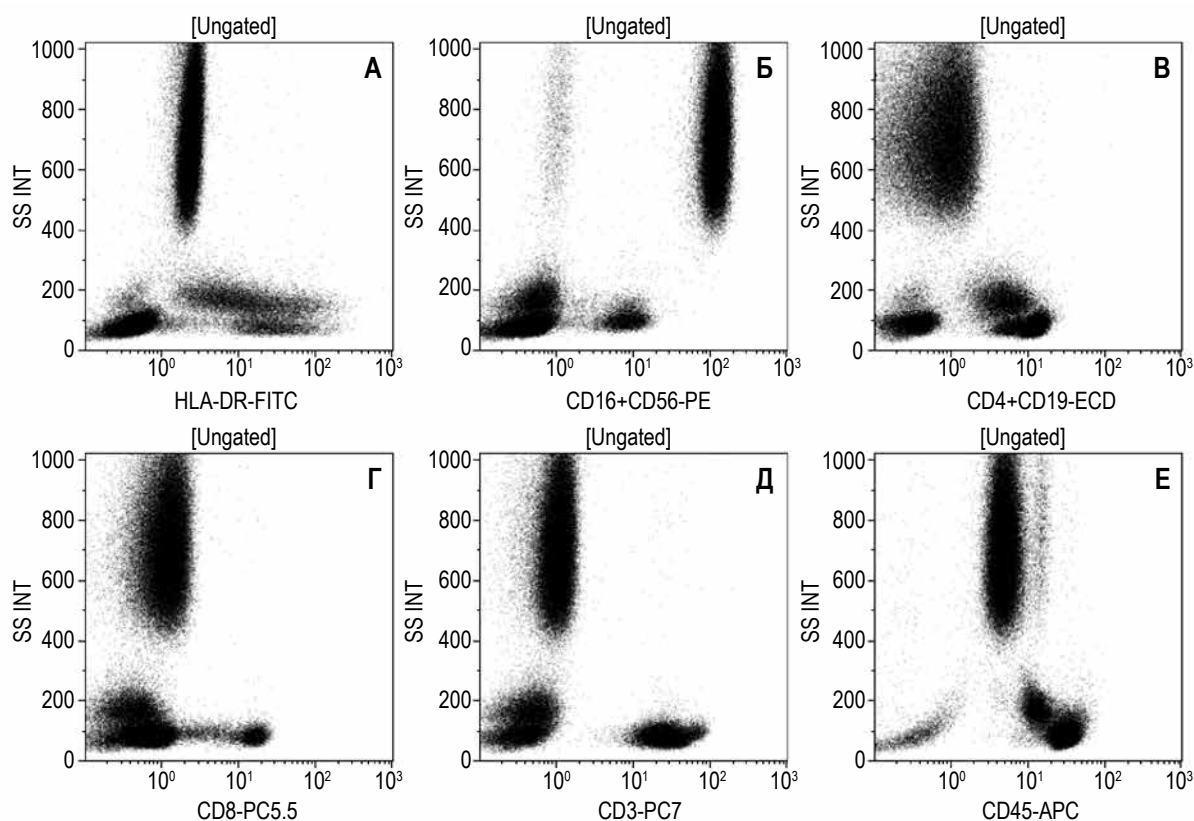
антител в одной пробирке. Дальнейшее развитие технологий привело к появлению работ, в которых число одновременно оцениваемых параметров флуоресценции достигло одиннадцати [7]. Следующим шагом стало изобретение красителей на основе флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов, или «квантовых точек» (Qdots или Quantum Dots), а также сравнительно недавно появившихся на рынке флуорохромов семейства Brilliant Violet™, первые упоминания о которых в литературе датируются началом 2012 года [16]. Развитие приборной базы и появление широкого спектра новых синтетических флуоресцентных красителей привели к тому, что в научно-исследовательской практике появился 18-цветный анализ, позволяющий не только детально описать фенотип клеток интереса, но исследовать их функциональную активность – например, способность к пролиферации, синтезу различных цитокинов и экспрессии сразу нескольких активационных маркеров [5, 6]. Именно подобного рода исследования в настоящее время считаются апогеем развития проточной цитометрии, так как для дальнейшего развития необходимы принципиальные изменения как в самих проточных цитофлуориметрах (например, развитие «масс-цитометрии»), так и в флуорохромах, применяемых для мечения моноклональных антител [4]. Вместе с тем, в нашей стране самыми распространенными остаются проточные цитофлуориметры, предназначенные для определения четырех, пяти или шести флуоресцентных красителей одновременно. Именно поэтому **целью данного исследования** была разработка стандартных подходов для решения задачи по оценке иммунного статуса на одном из таких приборов.

## Материалы и методы

В рамках проведения данного исследования использовали периферическую кровь условно здоровых доноров, полученную путем пункции локтевой вены. 50 мкл цельной ЭДТА-стаби-

лизированной крови окрашивали следующими моноклональными антителами (все антитела производства Beckman Coulter, США) в соответствии с рекомендациями производителя: HLA-DR-FITC (кат. № IM1638U), CD16-PE (кат. № A07766), CD56-PE (кат. № A07788), CD4-ECD (кат. № 6604727), CD19-ECD (кат. № A07770), CD8-PC5.5 (кат. № A07758), CD3-PC7 (кат. № 737657), CD45-APC (кат. № IM2473). После внесения антител образцы тщательно перемешивали, затем инкубировали при комнатной температуре 15 минут в защищенном от света месте. По завершении инкубации при постоянном перемешивании добавляли 500 мкл лизирующего раствора VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter, США), инкубировали еще 10 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Анализ образцов проводили на проточном цитометре Navios™ (Beckman Coulter, США). Для каждого из образцов набирали не менее 5000 лимфоцитов.

Для настройки напряжения по каналам флуоресценции использовали образцы крови, окрашенные каждым из антител по отдельности. Напряжение выставляли таким образом, чтобы популяции лимфоцитов, не связавшие то или иное антитело, находились ровно по центру первой декады логарифмической шкалы (рис. 1, А-Д). Напряжение по APC – флуорохрому, с которым были конъюгированы антитела против CD45 – выставляли так, чтобы лимфоциты, обладающие самой высокой среди всех лейкоцитов периферической крови плотностью CD45 на своей поверхности, находились по центру третьей декады логарифмической шкалы (рис. 1Е). По завершении настройки напряжения на каналах флуоресценции проводили настройку цветовой компенсации. Для данной процедуры также использовали указанные выше образцы периферической крови, окрашенные каждым из антител по отдельности, и частицы Flow Set Pro (кат. № A63492, Beckman Coulter, США). Настройку проводили в автоматическом режиме с исполь-



**Рисунок 1. Настройка напряжения по каналам флуоресценции**

**Примечание.** По оси абсцисс – боковое светорассеяние (SS), по оси ординат – интенсивность флуоресценции антител против HLA-DR, конъюгированных с ФИТЦ (гистограмма А), против CD16 и CD56, конъюгированных с РЕ (гистограмма Б), против CD4 и CD19, конъюгированных с ECD (гистограмма В), против CD8, конъюгированных с PC5.5 (гистограмма Г), против CD3, конъюгированных с PC7 (гистограмма Д), и против CD45, конъюгированных с APC (гистограмма Е). На гистограммах А-Д напряжение выставлено таким образом, чтобы лимфоциты, не несущие соответствующих антигенов, находились в пределах первой декады логарифмической шкалы; для CD45-APC напряжение установлено так, чтобы популяция лимфоцитов – клеток, обладающих слабым боковым светорассеянием и имеющих высокую плотность CD45 – находилась в третьей декаде логарифмической шкалы флуоресценции.

зованием приложения «AutoSetup Application Definition...» программного обеспечения Navios™ Software v1.2. Проверку корректности настройки параметров цветовой компенсации осуществляли по образцам периферической крови условно здоровых доноров и реагентам Immuno-Trol Cells (кат. № 6607077, Beckman Coulter, США), окрашенными всеми антителами одновременно. Анализ полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения Navios™ Software v1.2 и Kaluza™ v1.2 (Beckman Coulter, США).

## Результаты и обсуждение

В понятие оценки «иммунного статуса» или «исследования субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови» [1] при помощи проточной цитофлуориметрии включено определение абсолютного и относительного количества Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>), Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), В-клеток (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>), НК-клеток (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>), NKT-клеток (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>).

Однако, любой протокол измерения в проточной цитометрии начинается с выделения популяции «интереса», в нашем случае — это лимфоциты. Существует несколько способов выделить популяцию лимфоцитов. Во-первых, при помощи параметров светорассеяния. Преимуществом данного метода является то, что любой проточный цитометр оснащен детекторами для регистрации параметров прямого и бокового светорассеивания, и подобного рода выделение лимфоцитов не требует дополнительных финансовых затрат. В то же время существует ряд ограничений по использованию данного метода — при некачественном лизисе эритроцитов существуют сложности с отделением популяции лимфоцитов от популяции дебриса [2]. Во-вторых, это применение антител против молекулы CD45, которая является «пан-лейкоцитарным» маркером и представлена на всех лейкоцитах, но с разной интенсивностью мембранной экспрессии. При использовании этой стратегии по гистограмме «боковое светорассеяние против флуоресценции CD45» лимфоцитами является популяция клеток, обладающая самой яркой экспрессией CD45 и наименьшими параметрами бокового светорассеивания. Основным недостатком этого метода является необходимость использования дополнительного моноклонального антитела, что в целом способно увеличить стоимость исследования. Кроме того, это требует задействовать отдельный флуоресцентный канал для измерения интенсивности флуоресценции CD45, что накладывает определенные ограничения в случае работы приборов с малым количеством одновременно анализируе-

мых флуоресцентных сигналов. Преимуществом же является независимость от качества лизиса, так как практически всегда можно выделить популяцию интереса, что и послужило причиной внесения данного подхода выделения лимфоцитов в международные рекомендации по клеточному анализу [12].

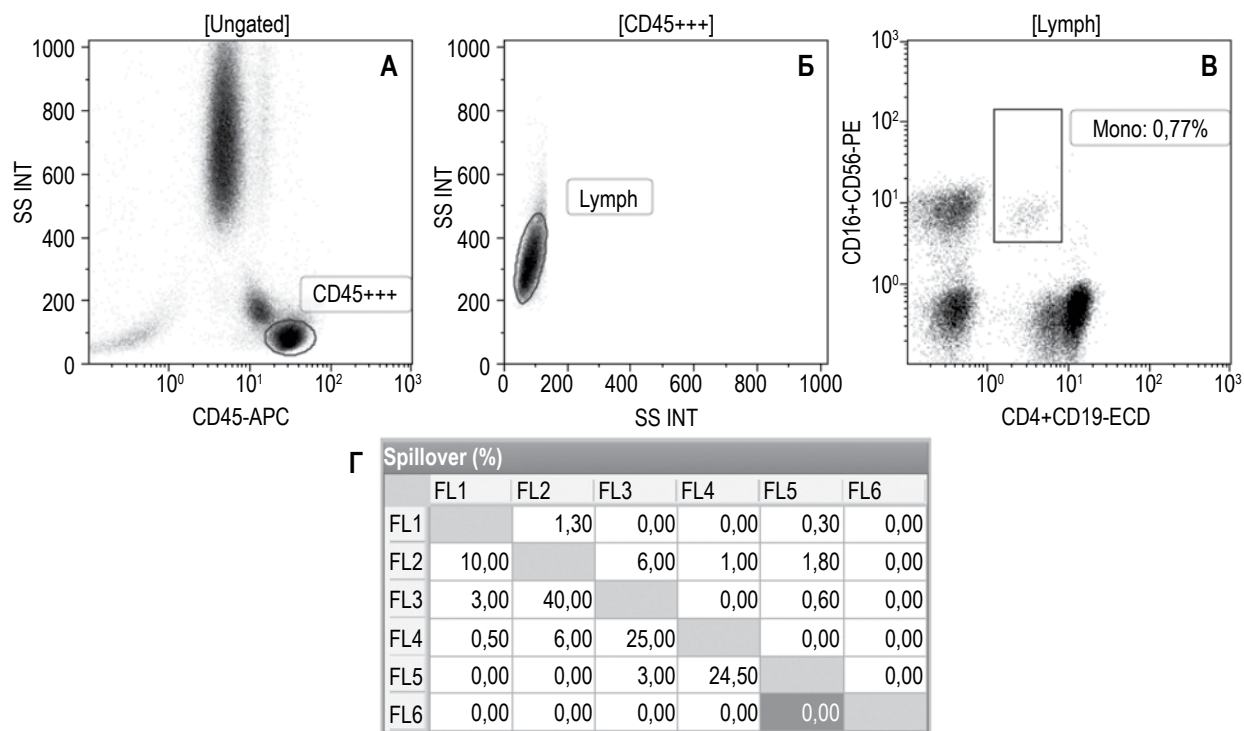
Отдельного внимания заслуживает возможность применения антител против CD45 для исключения примеси моноцитов из зоны анализа. Появление в периферической крови большого количества «провоспалительных» моноцитов способно существенно влиять на качество выявления популяции лимфоцитов. Для исключения моноцитов из популяции лимфоцитов необходимо использовать дополнительные моноцитарные маркеры, такие как CD14. Для решения этой проблемы проводилось выделение лимфоцитов в два этапа. Первым этапом было выделение области «CD45<sup>+++</sup>» на диаграмме «боковое светорассеяние против флуоресценции CD45» (рис. 2А). Второй этап заключался в удалении моноцитов из зоны анализа по двухпараметрической диаграмме «флуоресценция CD16<sup>+</sup>CD56 против флуоресценции CD4<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>». Данный способ основан на том, что на поверхности моноцитов, как «классических», так и «провоспалительных», представлен CD4, а в случае последних — еще и CD16, тогда как среди лимфоцитов не встречаются клетки, способные одновременно экспрессировать оба этих маркера. В дальнейшем был сделан «логический» гейт, включающий в себя клетки, наиболее ярко экспрессирующие CD45 и при этом не экспрессирующие на своей поверхности CD4 и CD16 одновременно. В стандартном программном обеспечении цитометра Navios это выглядит следующим образом: «LY = CD45<sup>+++</sup> AND Lymphocyte AND (NOT Mono)». В дальнейшем клетки, отвечающие указанным выше условиям, рассматриваются в качестве популяции лимфоцитов (рис. 2, А-В).

После того, как популяция клеток интереса — лимфоцитов — получена, имеет смысл переходить к ее анализу. На качество анализа или чистоту выделения популяций лимфоцитов в этом случае существенное влияние может оказывать выбор флуорохромов, с которыми конъюгированы антитела. На сайтах производителей антител и в зарубежной литературе приведены основные принципы формирования панелей для исследований [10, 11], на основании которых и была сформирована приводимая в данной статье комбинация антител. Во-первых, антитела для «пан-лейкоцитарных» маркеров (CD45) и маркеров, применяемых для выделения отдельных субпопуляций клеток (CD3), были конъюгированы с флуорохромами (APC и PC7 соответственно),

которые не обладают какой-либо значимой засветкой на остальные каналы флуоресценции, то есть коэффициенты компенсации равны нулю (рис. 2Г). Во-вторых, пары взаимоисключающих маркеров, ко-экспрессия которых в норме на клетках не наблюдается или крайне незначительна (например, CD56 и CD19 или CD4 и CD8), помещены на соседние каналы с сильной перекрестной засветкой (PE и ECD или ECD и PC5.5 соответственно). В-третьих, активационный маркер с низким и к тому же переменным уровнем экспрессии, как это характерно для HLA-DR на Т-клетках, помещен на канал (FL1 для регистрации флуоресценции ФИТЦ), который не подвергается неспецифическому влиянию со стороны флуорохромов с других каналов. Данное обстоятельство позволяет получать наиболее адекватные данные об уровне экспрессии данного маркера на клетках интереса вне зависимо-

сти от настроек цветовой компенсации и уровня экспрессии антигенов, расположенных на соседних каналах. Кроме того, для FL1 (антитела против HLA-DR, конъюгированные с ФИТЦ) и FL2 (антитела против CD16 и CD56, конъюгированные с PE) также учитывается принцип взаимоисключающей экспрессии маркеров, детектируемых на соседних каналах флуоресценции. Соблюдение указанных выше принципов создания комбинаций антител для анализа позволяет существенно упростить как настройку цветовой компенсации, так и дальнейший контроль за стабильностью данных параметров настройки прибора при проведении серий исследований.

Для выделения основных популяций лимфоцитов периферической крови был использован следующий алгоритм («тактика гейтирования»), основанный на применении двухпараметрических гистограмм «флуоресценция-против-флу-



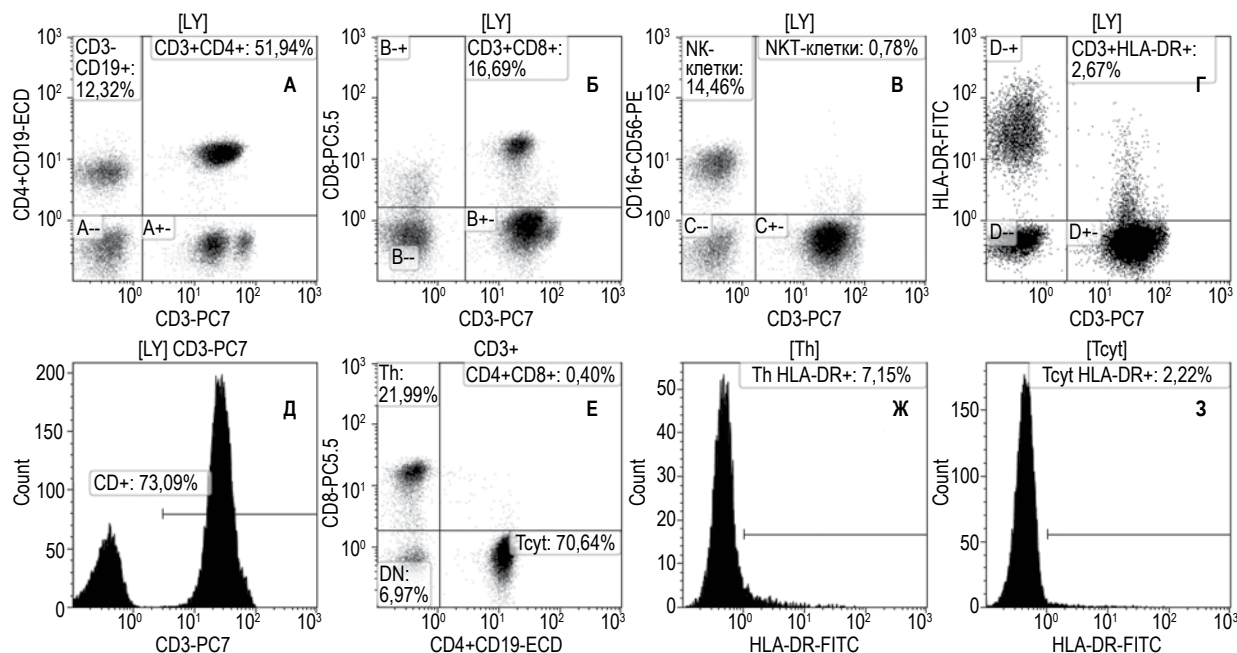
**Рисунок 2. «Тактика гейтирования» лимфоцитов и пример матрицы цветовой компенсации**

**Примечание.** Гистограмма А: выделение популяции лимфоцитов по параметрам бокового светорассеяния (ось ординат) и уровню экспрессии CD45 (ось абсцисс), выделенная область «CD45+++» содержит лимфоциты. Гистограмма Б: по оси абсцисс – боковое светорассеяние, по оси ординат – прямое светорассеяние; показаны только клетки из области «CD45+++» гистограммы А; в области «Lymph» находятся клетки с низкой интенсивностью флуоресценции по FS и SS (при помощи этого региона из зоны анализа исключаются разрушенные и слипшиеся лимфоциты, а также большинство моноцитов). Гистограмма В: по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD4 и CD19, по оси ординат – интенсивность флуоресценции антител против CD16 и CD56; на гистограммы показаны клетки, находящиеся в областях «CD45+++» гистограммы А и области «Lymph» гистограммы Б; область «Моно» – «провоспалительные» моноциты с фенотипом CD4<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>, которые не удалось исключить из зоны анализа при помощи последовательного иммунологического гейтирования, показанного на гистограммах А и Б. Г – пример матрицы цветовой компенсации, полученной при настройке проточного цитофлуориметра: каналы FL1, FL2, FL3, FL4, FL5 и FL6 предназначены для регистрации флуоресценции антител, конъюгированных с ФИТЦ, PE, ECD, PC5.5, PC7 и APC соответственно. По горизонтали в процентах показаны коэффициенты компенсации засветки флуорохромов из вертикальных столбцов в данный канал.

оресценции». В первую очередь была построена диаграмма, где по оси абсцисс приведена флуоресценция антител против CD3, а по оси ординат – флуоресценция антител против CD19 и CD4 (рис. 3А). Использование данной гистограммы позволяет идентифицировать популяции В-лимфоцитов как CD3 негативные, но позитивные по CD4<sup>+</sup>19 клетки (12,32% от общего числа лимфоцитов в приведенном примере исследования), а также популяцию Т-хелперов как дважды позитивные клетки (51,94% от общего числа лимфоцитов). Использование антител против поверхностных антигенов, характерных для разных популяций клеток (никогда не ко-экспрессирующихся ни в норме, ни при большинстве патологических состояний – CD4 для Т-хелперов и CD19 для В-лимфоцитов), но конъюгированных с одним и тем же флуорохромом (в нашем случае – ECD, для регистрации которого используется канал FL3), возможно лишь в том случае, когда для разделения данных популяций клеток применяется как минимум еще одно антитело (CD3 как маркер для выделения популяции Т-хелперов). Причем для детектирования последнего используется отдельный канал флуоресценции (в нашем случае – канал FL5 для регистрации флуоресценции PC7). Примеры подобного рода исследований встречаются как на старых «малоцветных» приборах [8], для кото-

рых они, собственно, и были разработаны, так и не потеряли своей актуальности и в настоящее время при десяти- и более многоцветном анализе [3]. Хотя в нашей стране такой подход не получил должного распространения, особенно если принять во внимание приборную базу отечественных лабораторий. Особое внимание следует уделить тому, что при использовании на одном флуоресцентном канале антител против CD4 и CD19 крайне важно провести «логическое» гейтирование лимфоцитов с исключением примеси популяции моноцитов. Если этого сделано не будет, то примесь моноцитов, которые слабо позитивны по CD4 и не несут CD3, будет ложно отнесена к В-клеткам, что скажется на качестве получаемых результатов.

На рисунке 3 также приведены примеры остальных гистограмм, которые используются для выделения основных популяций лимфоцитов периферической крови. На гистограмме Б (флуоресценция CD3 против флуоресценции CD8) выделяются цитотоксические Т-клетки с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, содержание которых в данном образце составляет 16,69% от общего числа лимфоцитов. Далее на гистограмме В выделяют популяции натуральных киллеров (14,46% от общего числа лимфоцитов), негативных по CD3 и позитивных по CD16 и CD56, а также NKT-клетки, экспрессирующие одновременно CD3



**Рисунок 3. Гистограммы, необходимые для выделения основных популяций лимфоцитов периферической крови**

**Примечание.** На гистограммах А-Д в процентах приведено содержание основных популяций лимфоцитов периферической крови от общего числа лимфоцитов, выделенных при помощи последовательного гейтирования, приведенного на рисунке 2 (гистограммы А-В). Гистограмма Е – распределение Т-лимфоцитов (показаны только CD3-позитивные клетки, выделенные на гистограмме Д) по уровню экспрессии CD4 и CD8. Гистограммы Ж и З – экспрессия HLA-DR Т-хелперами (область «Th» гистограммы Е) и цитотоксическими Т-клетками (область «Tcyt» гистограммы Е) соответственно. Комментарии в тексте.

и маркеры, характерные для НК-клеток. Кроме того, наличие в составе панели антител против HLA-DR, рассматриваемого в качестве маркера «поздней активации» Т-лимфоцитов, позволяет определить процент активированных Т-клеток, который в данном образце равен 2,67% от общего числа лимфоцитов. Для определения общего числа Т-клеток в проанализированном образце можно использовать однопараметрическую гистограмму (рис. 3Д), где по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции антител против CD3, а на оси ординат – количество клеток, обладающих тем или иным уровнем экспрессии CD3. Как уже отмечалось выше, при настройке напряжения негативные клетки помещались в пределы первой декады логарифмической шкалы, поэтому особого труда выделить CD3-позитивные клетки не составляет (73,09% от лимфоцитов).

Особое внимание при проведении иммунофенотипирования следует уделить подсчету контрольных сумм, характеризующих качество и достоверность проведенного исследования. Пожалуй, главной из них является сумма Т-, В- и НК-клеток [15], которая должна находиться в пределах 100% ( $100\% \pm 5\%$ ). В приведенном на рисунке 3 примере Т-лимфоциты составляют 73,09%, В-лимфоциты – 12,32%, натуральные киллеры – 14,46%. При помощи нехитрых подсчетов контрольная сумма будет равна 99,87%, что полностью соответствует нормативным значениям. Еще одним «внутренним» контролем может являться то положение, что сумма Т-хелперов, выделенных при помощи CD3 и CD4, и цитотоксических Т-клеток с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> должна равняться общему числу CD3-позитивных клеток  $\pm 5\%$  [12]. Хотя даже в рамках приведенных выше рекомендаций допускаются расхождения не более 10% из-за при-

сутствия в образце  $\gamma\delta$ Т-клеток (увеличение числа дважды-негативных клеток в образце, что сопровождается уменьшением суммарного показателя Т-лимфоцитов) или наличия большого числа клеток, одновременно экспрессирующих CD4 и CD8. В последнем случае сумма CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> может существенно превосходить общее число CD3<sup>+</sup> клеток и выходить за прописанные в рекомендациях нормативы. Поэтому при помощи дополнительной гистограммы распределения Т-клеток по уровню экспрессии CD4 и CD8 можно более точно выделить не только Т-хелперы (рис. 3Е, область «Th») и цитотоксические Т-клетки (рис. 3Е, область «Тсyt»), но и популяции Т-лимфоцитов, несущие как оба антигена одновременно (область «CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>»), так и лишенные их обоих (область «DN»). Клиническая значимость этих параметров в настоящее время обсуждается при широком круге патологических состояний [2]. Кроме того, с использованием гистограмм распределения Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток по уровню экспрессии HLA-DR (рис. 3Ж и 3 соответственно) можно оценить процент активированных клеток среди данных популяций Т-лимфоцитов.

Таким образом, применение шестицветного цитофлуориметрического анализа не только способно сократить время и себестоимость постановки реакции, увеличить пропускную способность прибора, но и существенно расширить спектр результатов, получаемых при анализе одного образца. При этом в данной работе не рассматриваются такие показатели, как экспрессия CD56 на Т-хелперах и цитотоксических Т-клетках, равно как и экспрессия CD8 натуральными киллерами, имеющие в настоящее время больше научное, чем клинико-диагностическое значение.

## Список литературы / References

1. Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А., Хайдуков С.В. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С.255-268. [Bađun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A., Khaidukov S.V. Stadartizovannaya tekhnologiya "issledovanie subpopuliasionnogo soslava limphocytov pirifericheskoy krovi s primeneniem protochnih cytophluorimetrov-analizatorov" (proekt). *Meditinskaya immunologia = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no.3. pp. 255-268. (In Russ.)]
2. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А.. Проточная цитометрия в медицине и биологии. Екатеринбург: РИО УрОРАН, 2013. 552 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshevnev V.A. Flow cytometry in medicine and biology]. Екатеринбург: RIO UrORAN, 2013. 552 p.
3. Autissier P., Soulas C., Burdo T.H., Williams K.C. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry A*, 2010, Vol. 77. pp. 410-419.
4. Bendall S.C., Nolan G.P., Roederer M., Chattopadhyay P.K. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends Immunol.*, 2012, Vol. 33, pp. 323-332.
5. Chattopadhyay P.K., Price D.A., Harper T.F., Betts M.R., Yu J., Gostick E., Perfetto S.P., Goepfert P., Koup R.A., De Rosa S.C., Bruchez M.P., Roederer M. Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. *Nat. Med.*, 2006, Vol. 12, pp. 972-977.

6. Chattopadhyay P.K., Roederer M. Cytometry: today's technology and tomorrow's horizons. *Methods*, 2012, Vol. 57, pp. 251-258.
7. De Rosa S.C., Herzenberg L.A., Herzenberg L.A., Roederer M. 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat. Med.*, 2001, Vol. 7, pp. 245-248.
8. Horvatinovich J.M., Sparks S.D., Mann K.P. Establishing a pure lymphocyte gate for subset analysis by flow cytometry. *Cytometry*, 1996, Vol. 26, pp. 172-177.
9. Lansdorp P.M., Smith C., Safford M., Terstappen L.W., Thomas T.E. Single laser three color immunofluorescence staining procedures based on energy transfer between phycoerythrin and cyanine 5. *Cytometry*, 1991, Vol. 12, pp. 723-730.
10. Maecker H.T., Frey T., Nomura L.E., Trotter J. Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. *Cytometry A*, 2004, Vol. 62, pp. 169-173.
11. Mahnke Y.D., Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin. Lab. Med.*, 2007, Vol. 27, pp. 469-485.
12. Mandy F.F., Nicholson J.K., McDougal J.S.; CDC. Guidelines for performing single-platform absolute CD4<sup>+</sup> T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm. Rep.*, 2003, Vol. 52, RR-2, pp. 1-13.
13. Roederer M., De Rosa S., Gerstein R., Anderson M., Bigos M., Stovel R., Nozaki T., Parks D., Herzenberg L., Herzenberg L. 8 color, 10-parameter flow cytometry to elucidate complex leukocyte heterogeneity. *Cytometry*, 1997, Vol. 29, pp. 328-339.
14. Roederer M., Kantor A.B., Parks D.R., Herzenberg L.A. Cy7PE and Cy7APC: bright new probes for immunofluorescence. *Cytometry*, 1996, Vol. 24, pp. 191-197.
15. Schenker E.L., Hultin L.E., Bauer K.D., Ferbas J., Margolick J.B., Giorgi J.V. Evaluation of a dual-color flow cytometry immunophenotyping panel in a multicenter quality assurance program. *Cytometry*, 1993, Vol. 14, pp. 307-317.
16. Soghoian D.Z., Jessen H., Flanders M., Sierra-Davidson K., Cutler S., Pertel T., Ranasinghe S., Lindqvist M., Davis I., Lane K., Rychert J., Rosenberg E.S., Piechocka-Trocha A., Brass A.L., Brenchley J.M., Walker B.D., Streeck H. HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. *Sci. Transl. Med.*, 2012, Vol. 4, pp. 123-125.
17. Steinkamp J.A., Orlicky D.A., Crissman H.A. Dual-laser flow cytometry of single mammalian cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 1979, Vol. 27, pp. 273-276.
18. Telford W.G. Lasers in flow cytometry. *Methods Cell. Biol.*, 2011, Vol. 102, pp. 375-409.

---

**Авторы:**

**Кудрявцев И.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник, отдел иммунологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург; доцент школы биомедицины, Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

**Субботовская А.И.** — к.м.н., младший научный сотрудник, ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Authors:**

**Kudryavtsev I.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, North-West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg; Associate Professor, School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

**Subbotovskaya A.I.**, PhD (Medicine), Junior Research Associate, E.N. Meshalkin Research Institute of Circulation Pathology, Russian Ministry of Health Care, Novosibirsk, Russian Federation

---

Поступила 29.04.2014  
Принята к печати 10.06.2014

Received 29.04.2014  
Accepted 10.06.2014