

**Многоцветный
цитометрический анализ
для идентификации малых
популяций лимфоцитов
периферической крови
условно здоровых доноров.**

Хайдуков С.В., д.б.н.

Иммунофенотипирование это характеристика клеток при помощи **моноклональных антител или **других зондов**, позволяющая судить об их типе и функциональном состоянии по наличию того или иного набора **клеточных маркеров**.**

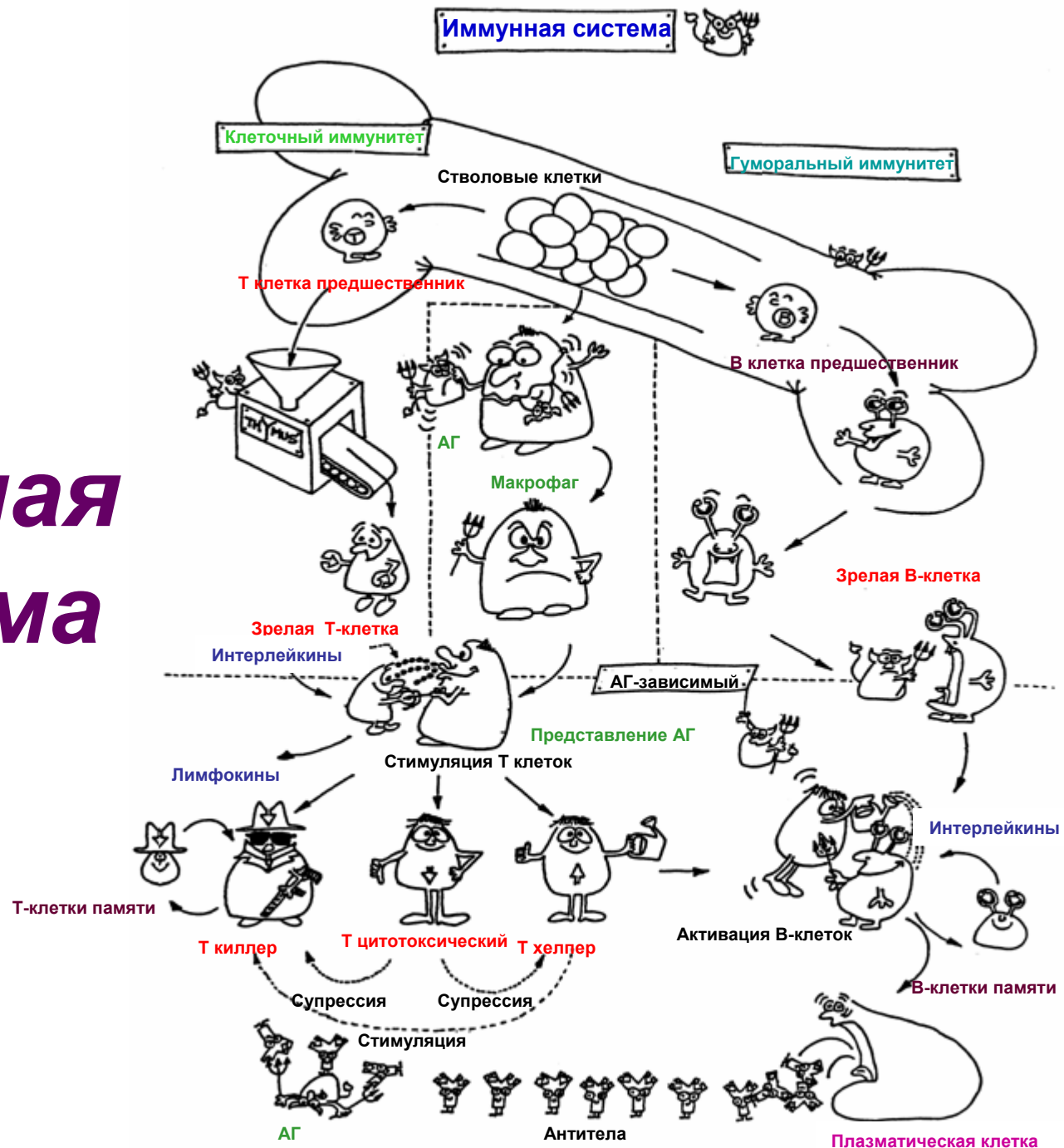
Моноклональные антитела



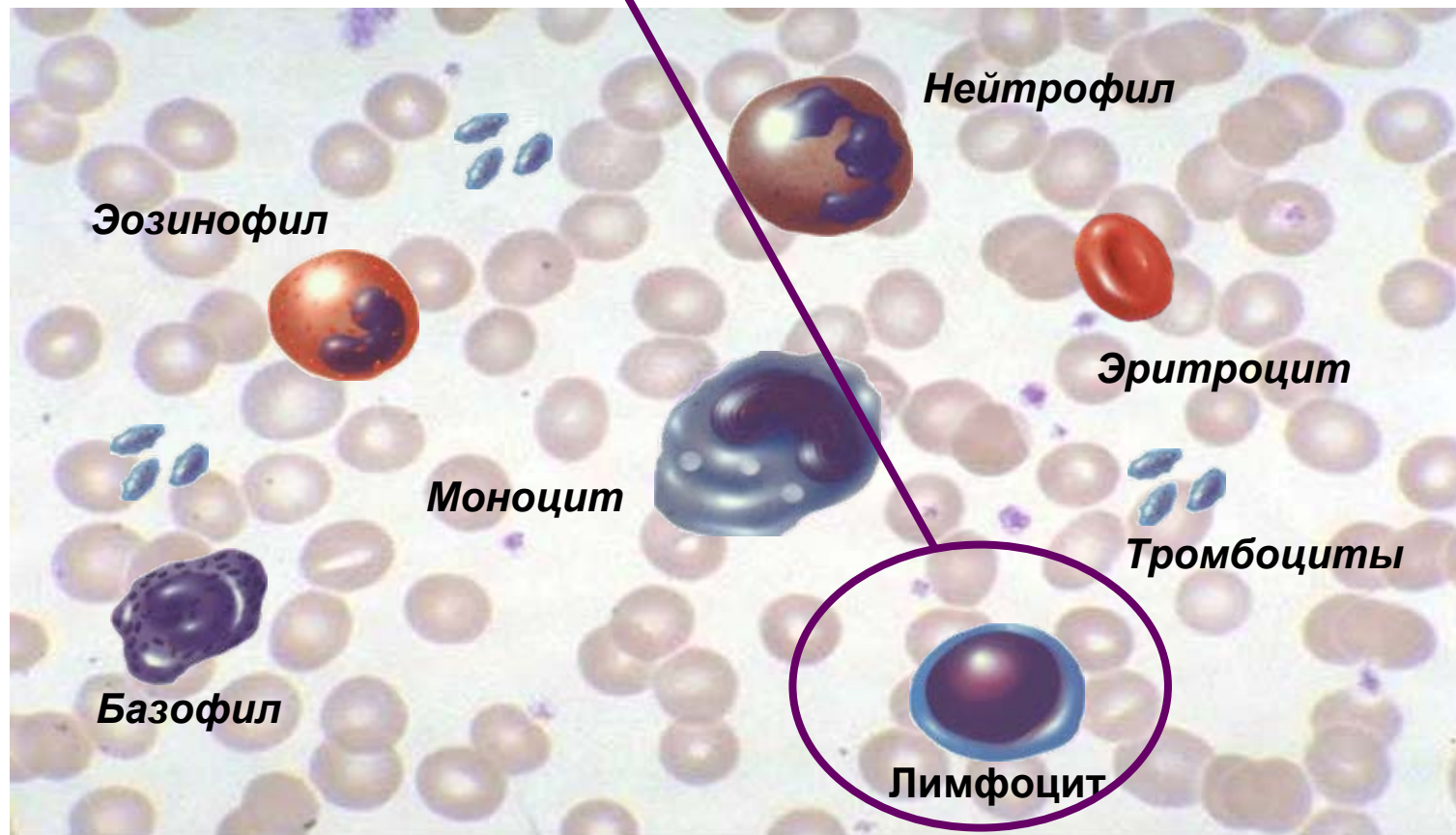
CD = Cluster of Differentiation

Система классификации всех антител против антигенов лейкоцитов человека. Определяется на рабочих совещаниях (HLDA VIII, следующая IX в 2010 г.) CD включает все клоны антител распознающих одни и те же антигены человека - но не эпитопную специфичность (сейчас 339 CD)

Иммунная система



Анализ лимфоцитов периферической крови



CDC
U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

January 10, 1997 / Vol. 46 / No. RR-2

MMWR[™]

*Recommendations
and
Reports*

MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT

***Рекомендации по
иммунофенотипированию
лимфоцитов
периферической крови
методом проточной
цитометрии***

**1997 Revised Guidelines for
Performing CD4+ T-Cell Determinations
in Persons Infected with
Human Immunodeficiency Virus (HIV)**

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
Public Health Service
Centers for Disease Control
and Prevention (CDC)
Atlanta, Georgia 30333



CDC-панель

FITC

IgG

CD45

CD3

CD3

CD3

CD3

PE

IgG

CD14

CD19

CD4

CD8

CD56 (+/-CD16)

Контроль

Гэйт

T/B-клетки

T-хелперы

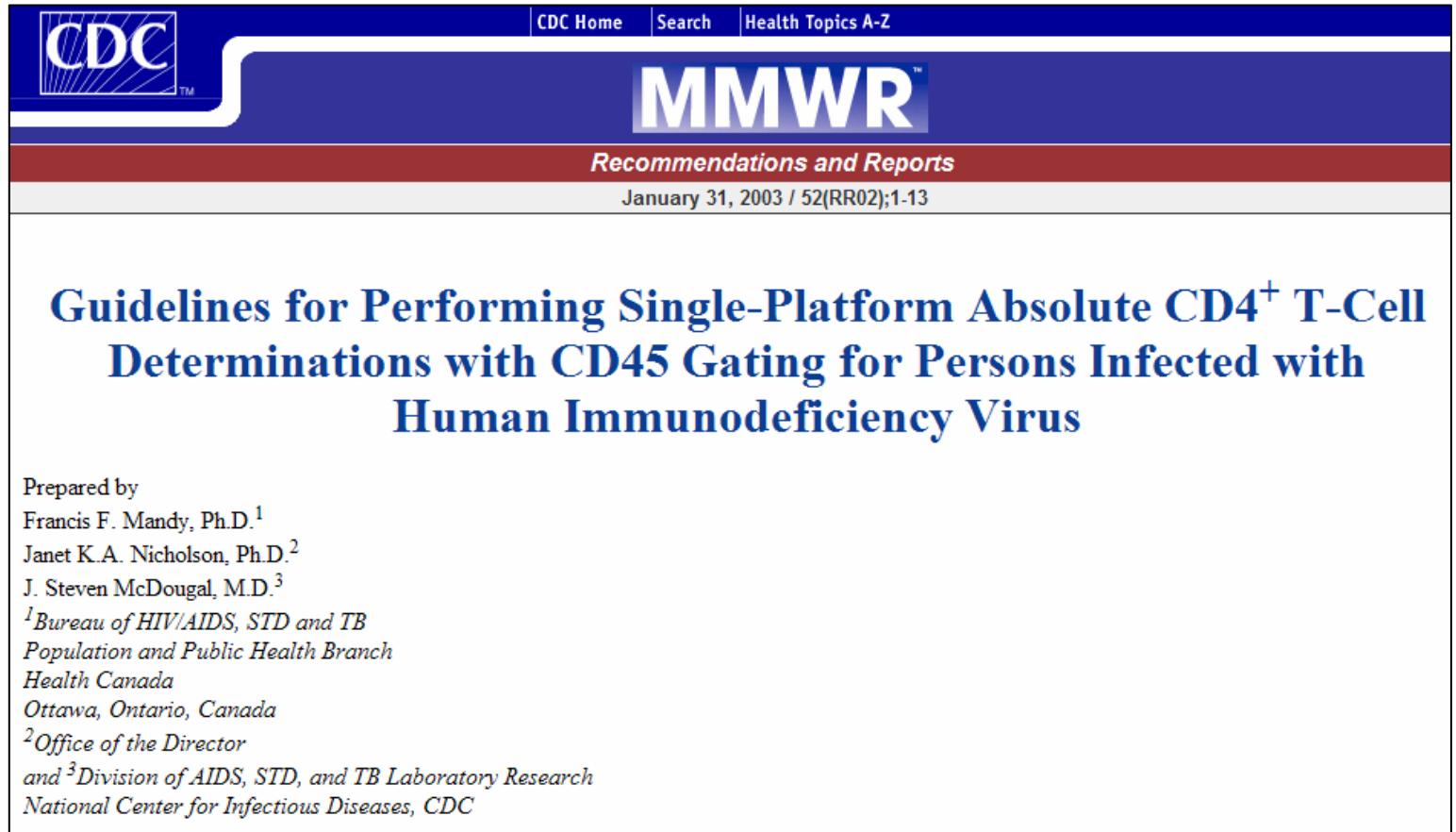
T-цитотоксические

НК-клетки

Наиболее часто используемая панель для определения иммунного статуса

FITC	PE	
IgG	IgG	Контроль
CD45	CD14	Гэйт
CD3	CD19	T/B-клетки
CD3	CD4	T-хелперы
CD3	CD8	T- цитотоксические
CD3	CD56 (+/-CD16)	NK-клетки
CD3	HLA-DR	актив. T-кл.

Рекомендации CDC для гейтирования по CD45



The image is a screenshot of the CDC MMWR website. At the top left is the CDC logo. To its right are navigation links: "CDC Home", "Search", and "Health Topics A-Z". Below these is a large blue banner with the "MMWR" logo in white. Underneath the banner is a red bar with the text "Recommendations and Reports". Below that is a grey bar with the date "January 31, 2003 / 52(RR02);1-13". The main content area has a white background with a black border. The title "Guidelines for Performing Single-Platform Absolute CD4⁺ T-Cell Determinations with CD45 Gating for Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus" is centered in blue. Below the title, the authors are listed: "Prepared by Francis F. Mandy, Ph.D.¹, Janet K.A. Nicholson, Ph.D.², and J. Steven McDougal, M.D.³". Footnotes provide the affiliations for each author: ¹Bureau of HIV/AIDS, STD and TB, Population and Public Health Branch, Health Canada, Ottawa, Ontario, Canada; ²Office of the Director; and ³Division of AIDS, STD, and TB Laboratory Research, National Center for Infectious Diseases, CDC.

CDC Home Search Health Topics A-Z

MMWRTM

Recommendations and Reports

January 31, 2003 / 52(RR02);1-13

Guidelines for Performing Single-Platform Absolute CD4⁺ T-Cell Determinations with CD45 Gating for Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus

Prepared by
Francis F. Mandy, Ph.D.¹
Janet K.A. Nicholson, Ph.D.²
J. Steven McDougal, M.D.³

¹*Bureau of HIV/AIDS, STD and TB
Population and Public Health Branch
Health Canada
Ottawa, Ontario, Canada*

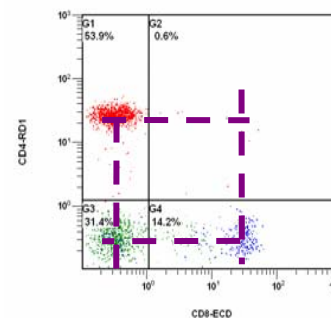
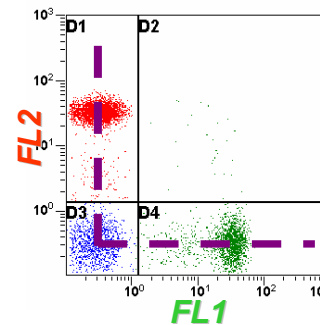
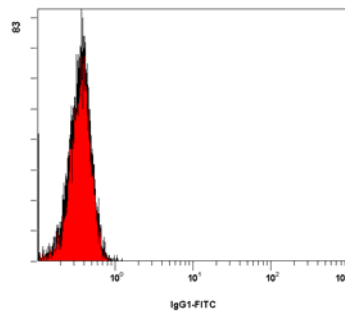
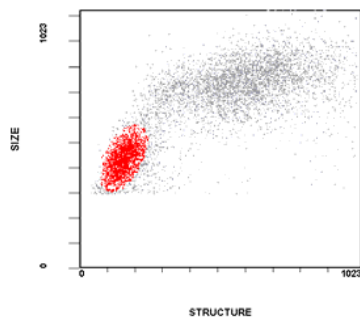
²*Office of the Director*
and ³*Division of AIDS, STD, and TB Laboratory Research
National Center for Infectious Diseases, CDC*

Необходимо для стандартизации анализа иммунофенотипа пациента.

- Стандартная настройка проточного цитометра и протоколов анализа.**
- Стандартный набор анализируемых маркеров (допускается расширение панели моноклональных антител для более полной характеристики исследуемого образца).**
- Стандартный анализ с использованием контроля качества и контрольных сумм.**

Алгоритм оптимизации настройки проточных цитометров и протоколов анализа для стандартизации метода.

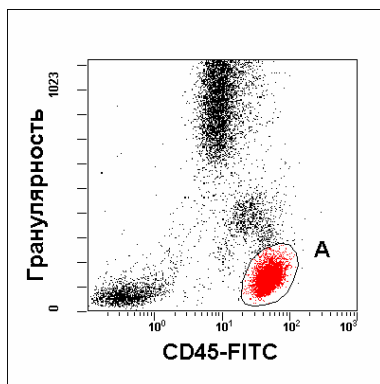
1. Оптимизация установки дискриминатор: *Оптимальное значение дискриминатора.*
2. Оптимизация установки и настройка каналов светорассеяния: *Оптимальное размещение на гистограмме всех основных популяций лейкоцитов периферической крови.*
3. Оптимизация установки и настройки каналов флуоресценции: *Оптимальное напряжения на фотоэлектронных умножителях (негативные клетки должны находиться в первой декаде гистограммы)*
4. Оптимизация установки и настройка компенсаций между каналами флуоресценции: *Первое и второе правило компенсации. Взаимосвязь между усилением напряжения на ФЭУ и компенсацией. Взаимосвязь между плотностью экспрессии маркеров и компенсацией.*



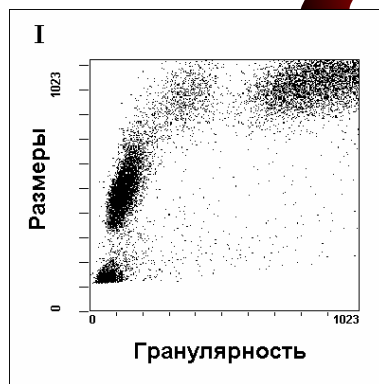
Алгоритм выбора зоны анализа лимфоцитов при использовании логических ограничений по CD45 и морфологическим параметрам.

Последовательное внесение логических ограничений в морфологическую гистограмму I.

Выделение зоны лимфоцитов по CD45



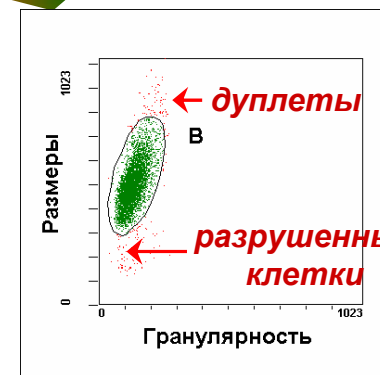
Первое логическое ограничение A



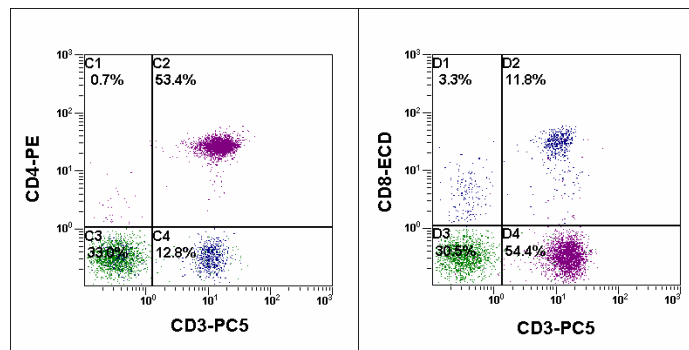
Лимфоциты CD45^{bright}



Второе логическое ограничение B



Анализ клеток одновременно попадающих в зоны A и B



Четырехцветная панель моноклональных антител для определения иммунного статуса

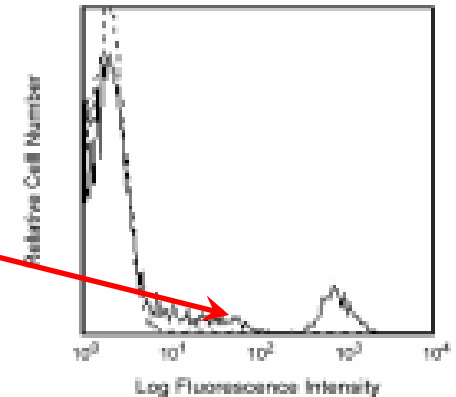
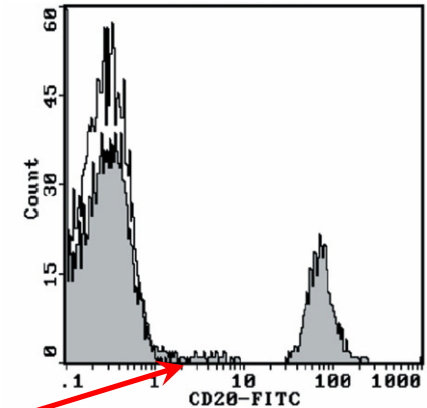
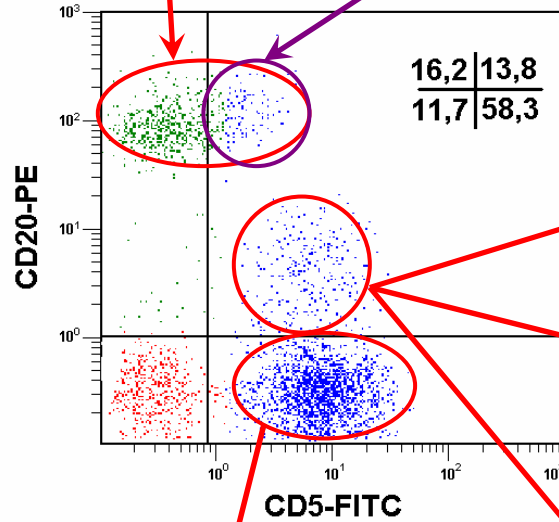
FITC	PE	ECD (или APC)	PC5 (или PerCP)
1. IgG	IgG изотипический контроль	IgG	CD45
2. CD19	CD5 B1, B2, B-клетки памяти	CD27	CD45
3. CD16	CD56 T-НК-клетки и субпопуляции НК-клеток	CD3	CD45
4. CD8	CD4 субпопуляции T-клеток	CD3	CD45
5. CD4	CD25 активированные T хелперы	HLA-DR	CD45
7. CD45RA	CD45RO наивные и активированные T хелперы, T-клетки памяти	CD4	CD45
8. TcR-$\alpha\beta$	TcR-$\gamma\delta$ $\alpha\beta$ - и $\gamma\delta$ -T-клетки	CD3	CD45
9. CD4	CD25 регуляторные T-клетки	CD127	CD45

Опубликовано в: Хайдуков С.В., и др. *Российский Иммунологический Журнал*, 2007, 1(10), 3-4, С. 20–30.
 Хайдуков С.В., и др. *Российский Иммунологический Журнал*, 2008, 2(11), 1, С. 20–30.
 Хайдуков С.В., и др. *Медицинская иммунология*, 2008, 10(2-3), С. 113-121
 Хайдуков С.В., и др. *Мед. иммунол.*, 2009 Т. 11, № 2-3, стр. 227-238

В-клетки

В-клетки

Аутореактивный
клон В клеток

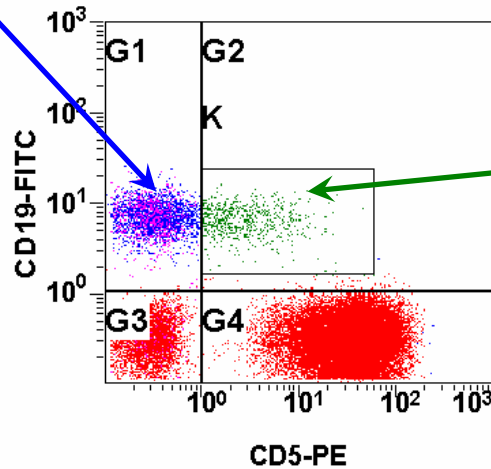


CD5 на Т клетках

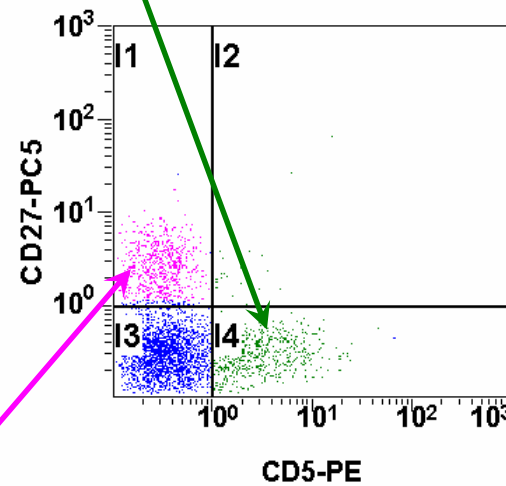
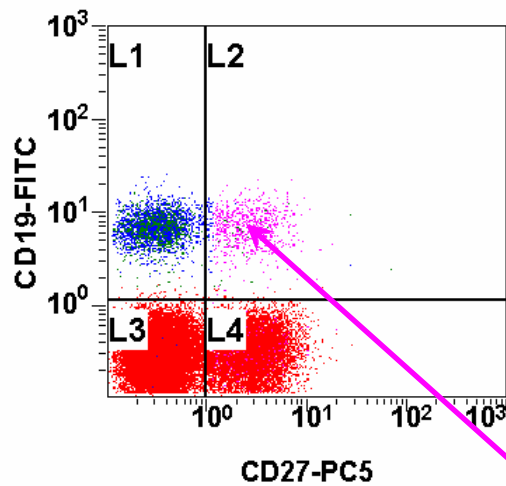
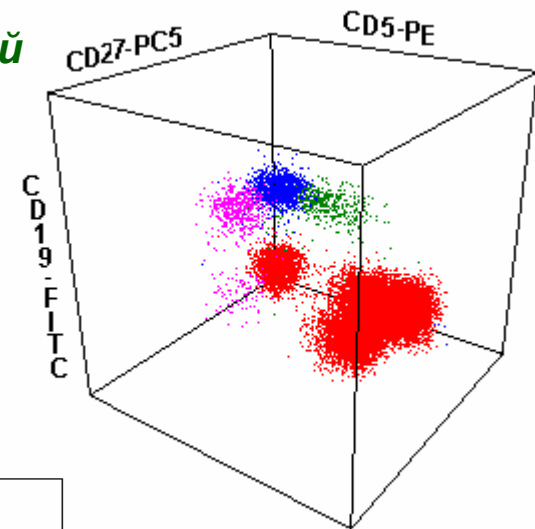
CD20 может экспрессироваться в
низкой плотности на Т клетках
(Leandro MJ, et al., Arthritis Rheum.
2006 Sep;54(2):3062-3; Katopodis O,
et al., Br J Haematol. 2003
Feb;120(3):478-81;)

B-2 (CD19⁺CD5⁻)

Анализ В-клеток



B-1 – аутореактивный клон (CD19⁺CD5⁺)



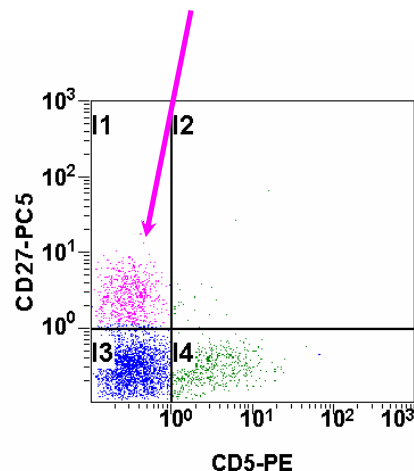
В-клетки памяти (CD19⁺CD27⁺CD5⁻)

Опубликовано в: Хайдуков С.В., и др. Росс. Иммунол. Журнал, 2007, 1(10), 3-4, С. 20–30.

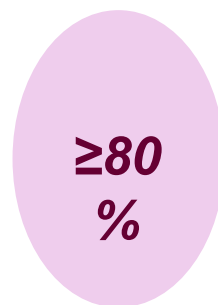
Анализ В-клеток - В-клетки памяти

Субпопуляции	Содержание		
	Относительно лимфоцитов (%)	Относительно общих В-клеток (%)	Абсолютное количество (кл/л)
Общие В-клетки	$12 \pm 5,0$		$0,099-0,336 \times 10^9$
В-клетки памяти	$4,3 \pm 2,5$	$31,25 \pm 8,45$	$0,012-0,140 \times 10^9$

В-клетки памяти

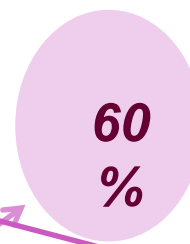


Синдром Шегрена

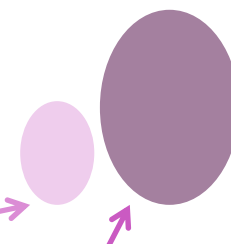


Наивные В-клетки

Норма



Системная красная волчанка

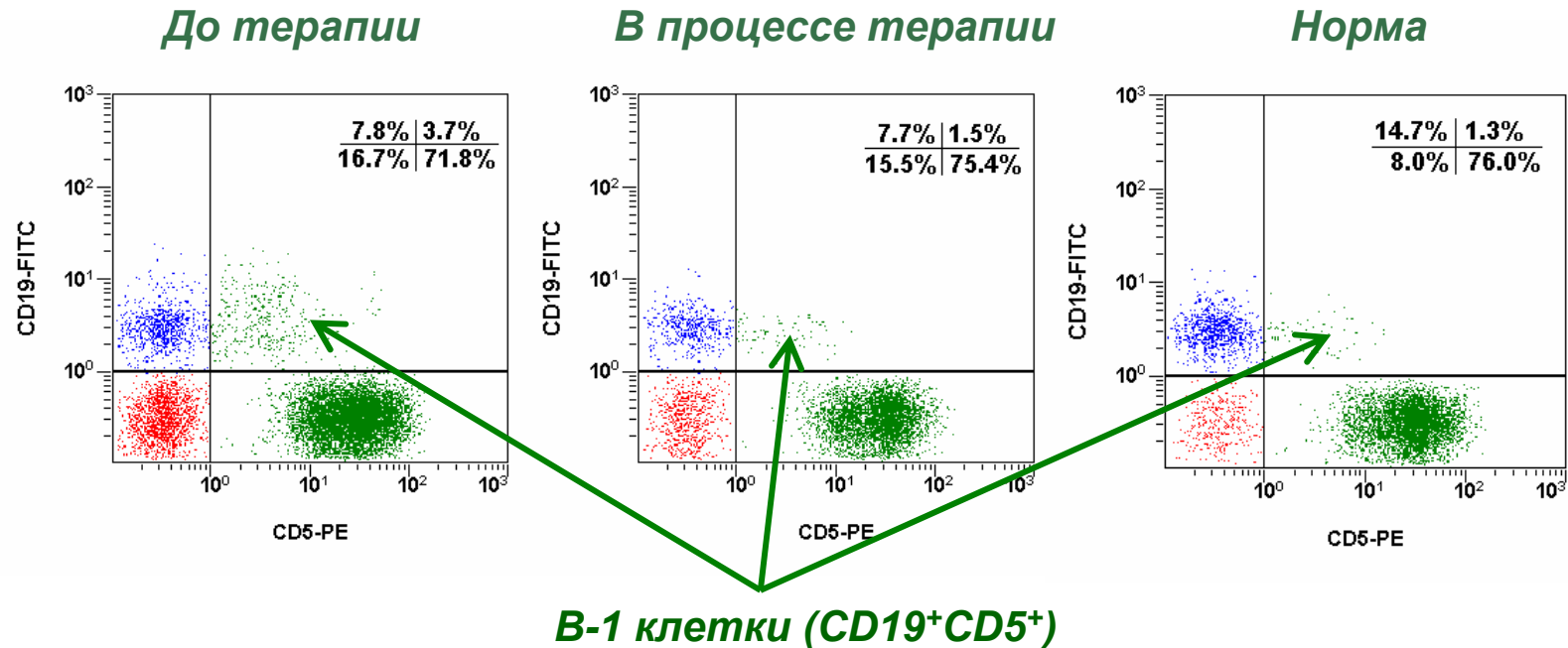


В-клетки памяти

Плотность экспрессии CD27

Анализ В-клеток – В-1

Пример: Аутоиммунный тиреоидит



Субпопуляции	Содержание		
	Относительно лимфоцитов (%)	Относительно общих В-клеток (%)	Абсолютное количество (кл/л)
Общие В-клетки	7 - 17		0,099-0,336 x 10 ⁹
В-1 клетки	0,5 – 2,1	4,1 - 17,5	0,022-0,115 x 10 ⁹
В-2 клетки	6,5 – 15,9	82,1 - 96,3	0,081-0,323 x 10 ⁹

Опубликовано в: Хайдуков С.В., и др. Росс. Иммунол. Журнал, 2007, 1(10), 3-4, С. 20–30.

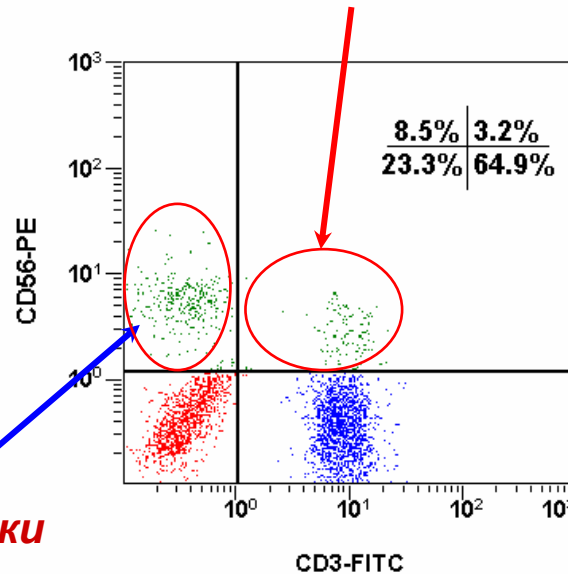
Заболевания, при которых определение относительного уровня В-1 клеток является диагностически значимым.

Заболевание	Повышение относительного уровня В1 клеток
1. Системная красная волчанка (СКВ)	++++
2. Синдром Шегрена	++++
3. Ревматоидный артрит	+++
4. Инсулин-зависимый диабет	+++
5. Аутоиммунный тиреоидит	++++
6. Миастения	+++
7. Неспецифический язвенный колит	+++
8. Аутоиммунные поражения при инфекционных заболеваниях (хламидиоз, синдром Рейтера, бруцеллез и др.)	+++
9. Другие заболевания, имеющие в своей основе аутоиммунные механизмы	+?

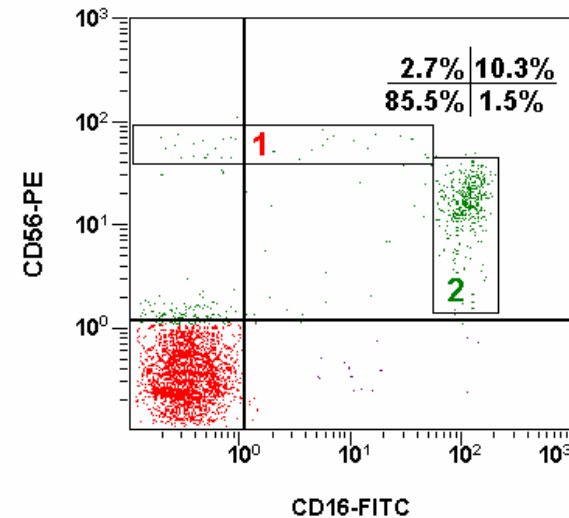
Анализ НК-клеток

T-НК клетки

Анализ по зоне CD45



НК-клетки

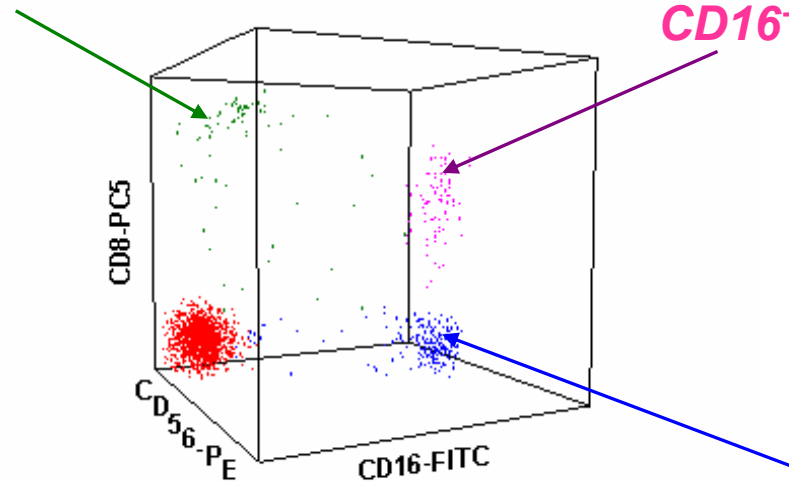


1 - CD16^{dim-to-neg}CD56^{bright} - секретируют IFN-γ и другие цитокины, имеют меньшую цитолитическую активность.

2 - CD16^{bright}CD56^{dim} - слабо секретируют цитокины, но обладают высокой цитолитической активностью.

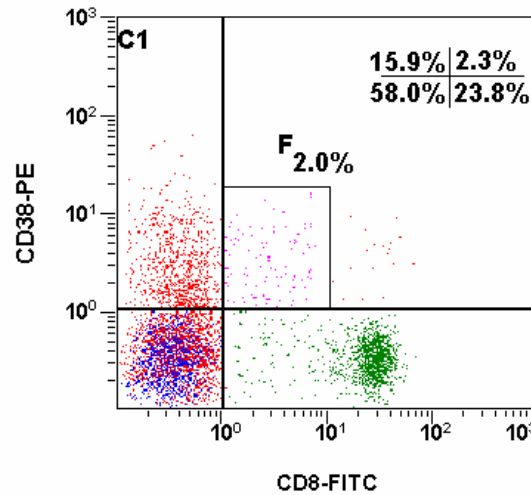
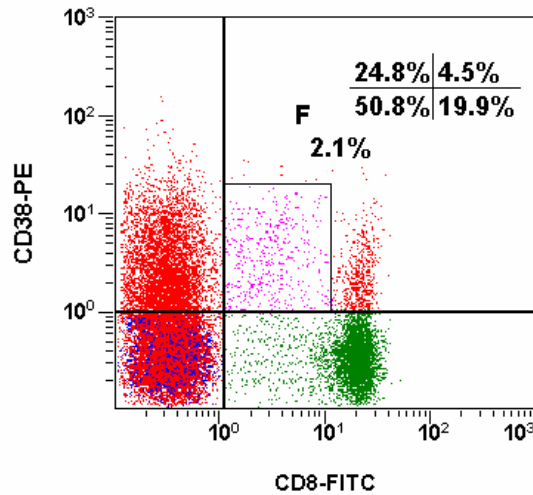
Субпопуляции	Содержание клеток (%)	Содержание клеток/л
CD16 ^(or high) CD56 ^{dim} НК-клетки цитолитические (относительно общих НК-клеток)	2,5 – 6,25	0,003 - 0,022 x 10 ⁹
CD16 ^(or low) CD56 ^{bright} НК-клетки цитокин-продуцирующие (относительно общих НК-клеток)	93,75 – 97,5	0,120 - 0,347 x 10 ⁹

CD16-CD56-CD8^{bright}



CD16⁺CD56⁺CD8^{dim}

CD16⁺CD56⁺CD8⁻



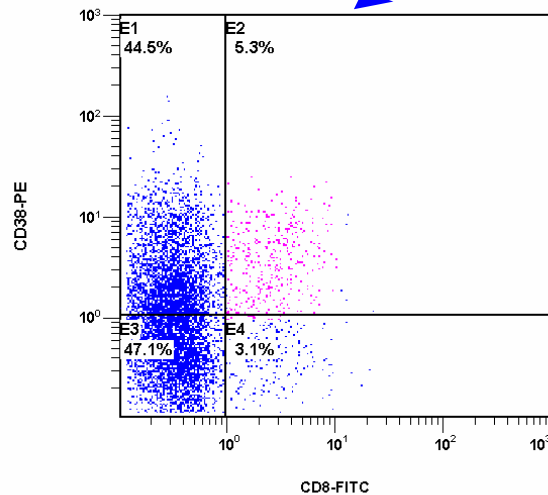
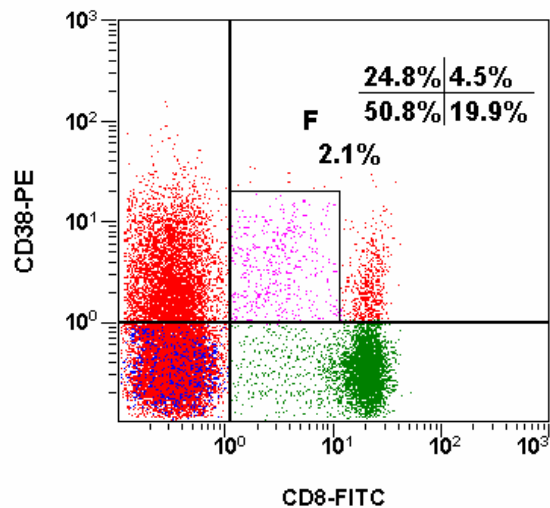
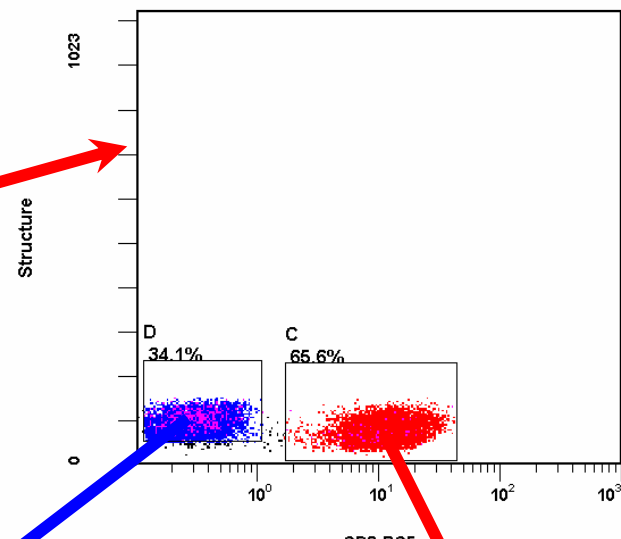
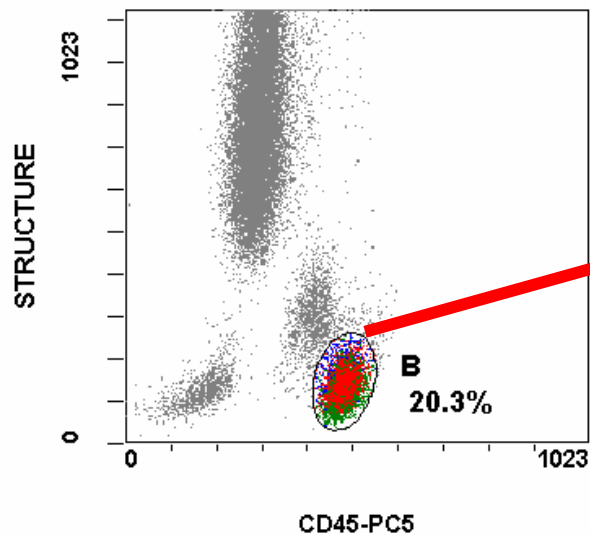
Активированные
NK клетки

Активированные
цитотоксические
Т клетки

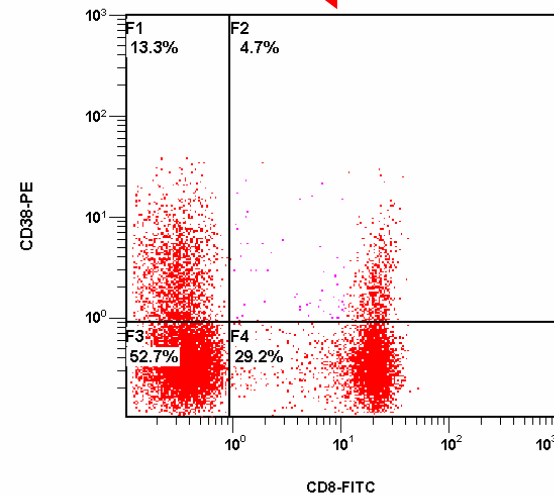
Покоящиеся CD8
позитивные Т
клетки

НК-клетки

Анализ по зоне В



Анализ по зоне D



Анализ по зоне C

Постоянно низкие активность и количество НК-клеток

Патологическое состояние	Ассоциированные симптомы и риски
<p>Приобретенный или врожденный иммунодефицит включая СПИД.</p> <p>Синдром Чедиака-Хигасси.</p> <p>Дефицит CD11/CD18 молекул семейства клеточной адгезии.</p> <p>Онкологические заболевания</p> <p>Онкологические заболевания связанные с наследственностью.</p> <p>Лейкемия.</p> <p>X-связанный лимфопролиферативный синдром.</p> <p>Рак молочной железы (при диагнозе).</p> <p>Рак шеи и головы (до терапии).</p> <p>Терапия цитостатиками.</p> <p>Вирусная инфекция (цитомегаловирус, Эпштейна-Бар, герпес).</p> <p>Другие вирусные и бактериальные инфекции.</p> <p>Аутоиммунные заболевания.</p>	<p>Высокий риск возникновения онкологии и достаточно частые инфекционные заболевания.</p> <p>Повышенный риск образования лимфом.</p> <p>Увеличенная восприимчивость к вирусным инфекциям.</p> <p>Распространение метастазов.</p> <p>Вероятность появления злокачественного образования выше нормального.</p> <p>Предшествует рецидиву.</p> <p>Повышенная чувствительность к вирусу Эпштейна-Бар.</p> <p>Неблагоприятный прогноз.</p> <p>Неблагоприятный прогноз.</p> <p>Более высокая вероятность рецидива.</p> <p>Более высокая частота, серьезность и продолжительность заболевания.</p> <p>Более высокая частота, серьезность, и продолжительность заболевания.</p> <p>Возможно более активное течение болезни, увеличенная частота инфекций.</p>
<p><u>Психические расстройства</u></p> <p>Синдром дефицита НК-клеток.</p> <p>Синдром хронической усталости.</p> <p>Депрессия.</p> <p>Хронический стресс.</p>	<p>Усталость, сниженная восприимчивость, лихорадка.</p> <p>Повышенная утомляемость, апатичность, увеличенная частота вирусных заболеваний.</p> <p>Более серьезные признаки.</p> <p>Неспособность справляться с ежедневными проблемами, усталость .</p>

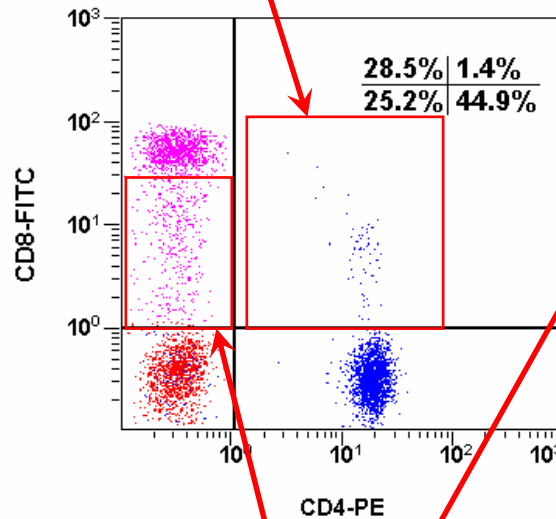
Постоянно высокие активность и количество НК-клеток

Патологическое состояние	Ассоциированные симптомы и риски
<p data-bbox="208 615 915 658">Лимфопролиферация НК-клеток</p> <p data-bbox="208 715 923 843">Хроническая пролиферация больших гранулярных лимфоцитов (LGL-пролиферация)</p> <p data-bbox="208 893 819 1022">Острая пролиферация больших гранулярных лимфоцитов (LGL-пролиферация)</p> <p data-bbox="208 1072 355 1108">Гепатит</p>	<p data-bbox="1000 715 1553 793">LGL-лимфоцитоз, цитопения, спленомегалия</p> <p data-bbox="1000 893 1657 972">Встречается совместно с активной лейкемией/лимфомой</p> <p data-bbox="1000 1072 1224 1108">Нет данных</p>

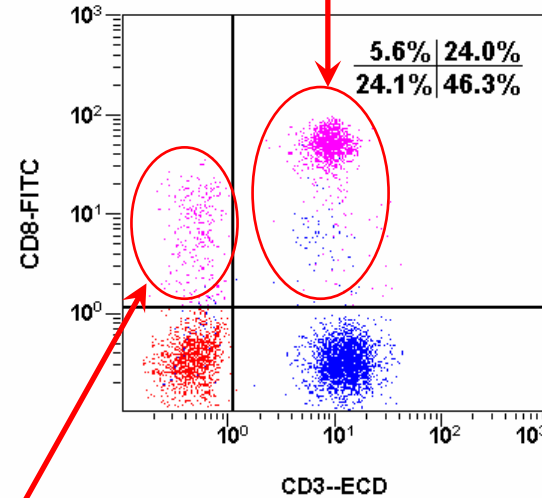
Цитотоксические Т-клетки

Анализ Т-клеток

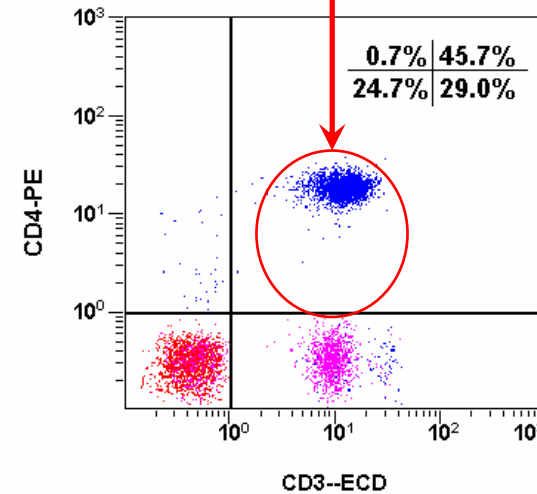
**CD4+CD8+ Т-клетки
(вышедшие из тимуса
недифференцированные
Т-клетки)**



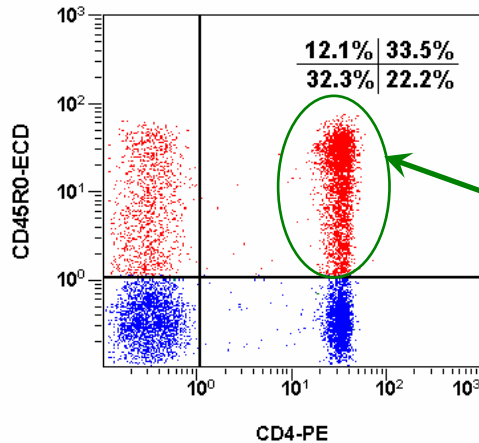
**Экспрессия CD8
на NK-клетках**



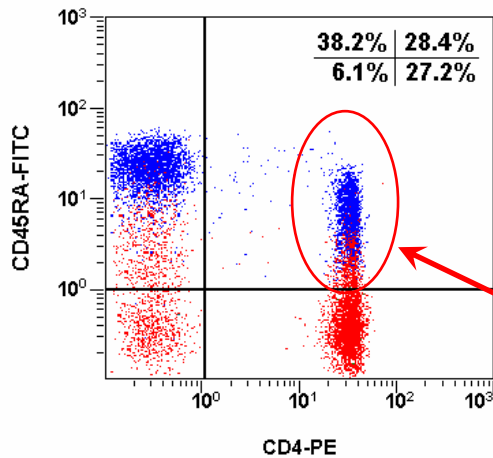
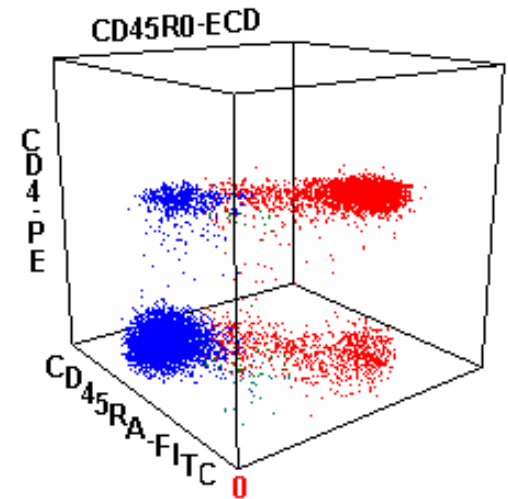
Т-клетки хелперы



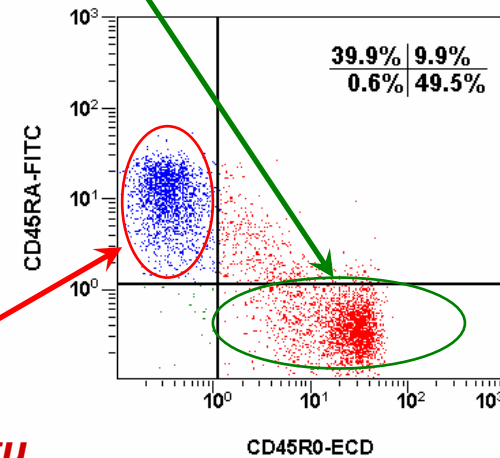
Анализ Т-клеток



**Т-клетки памяти.
активированные Т-
клетки, Treg и T17**

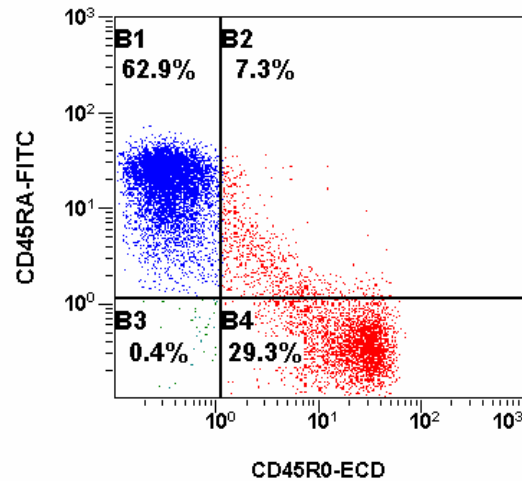


Наивные Т клетки

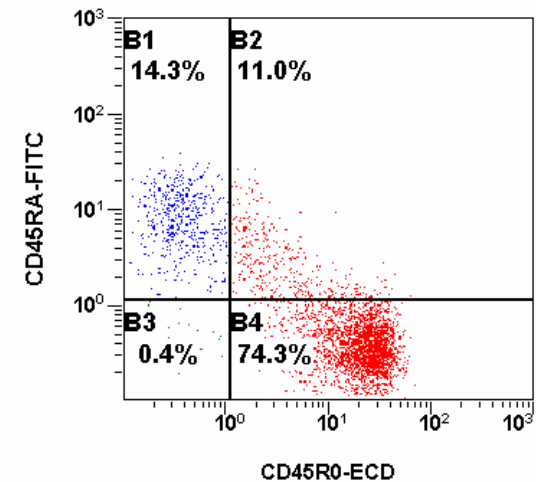
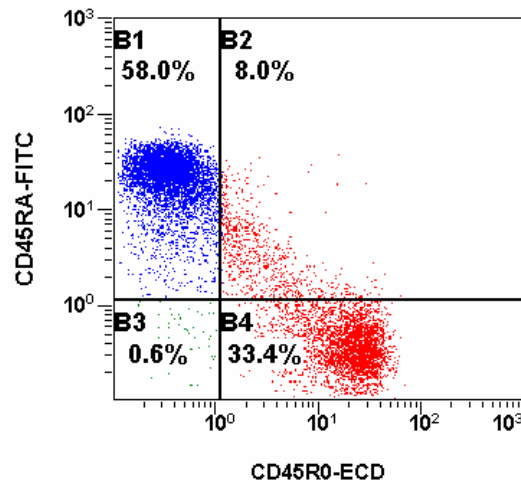
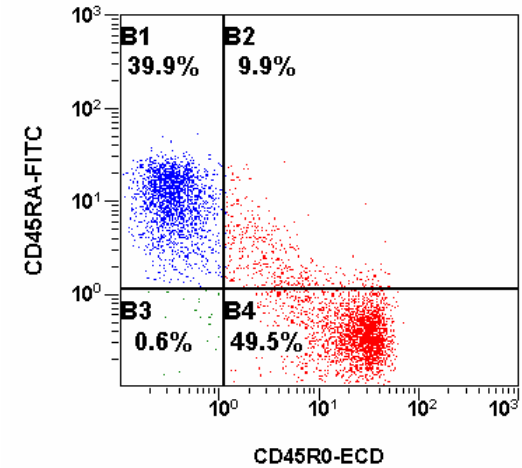


Анализ Т-клеток

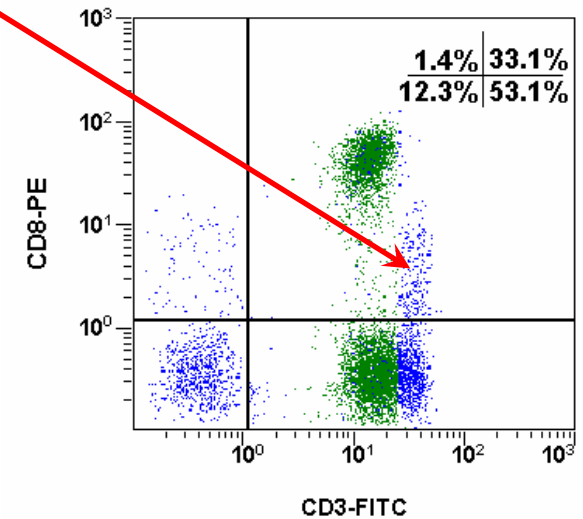
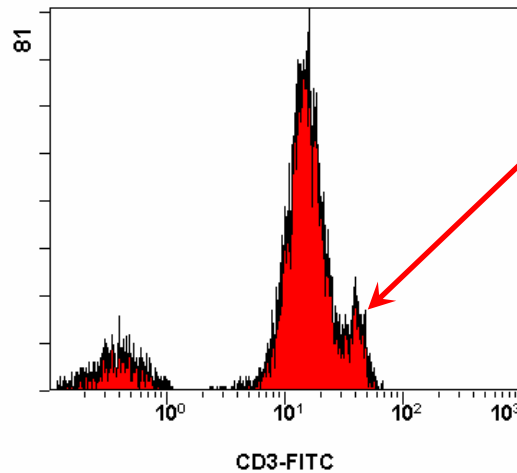
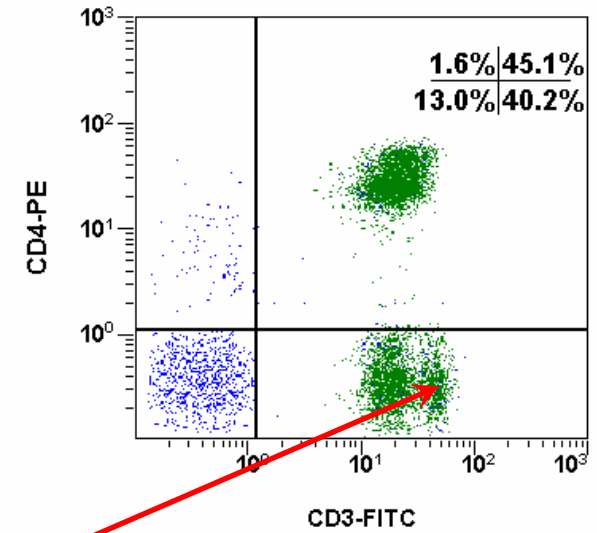
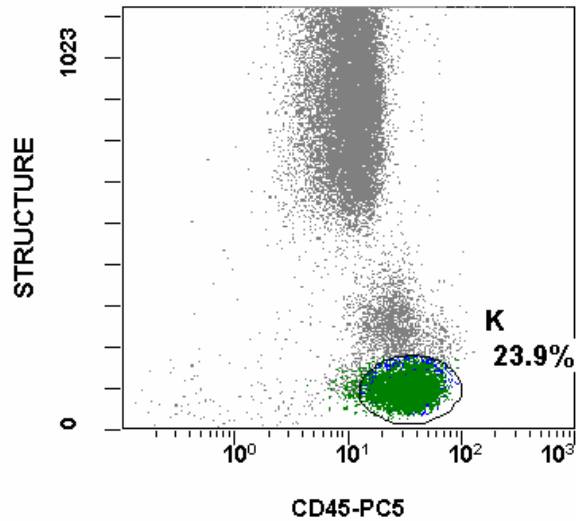
Анализ только по CD45⁺



Анализ по CD4⁺ и CD45⁺

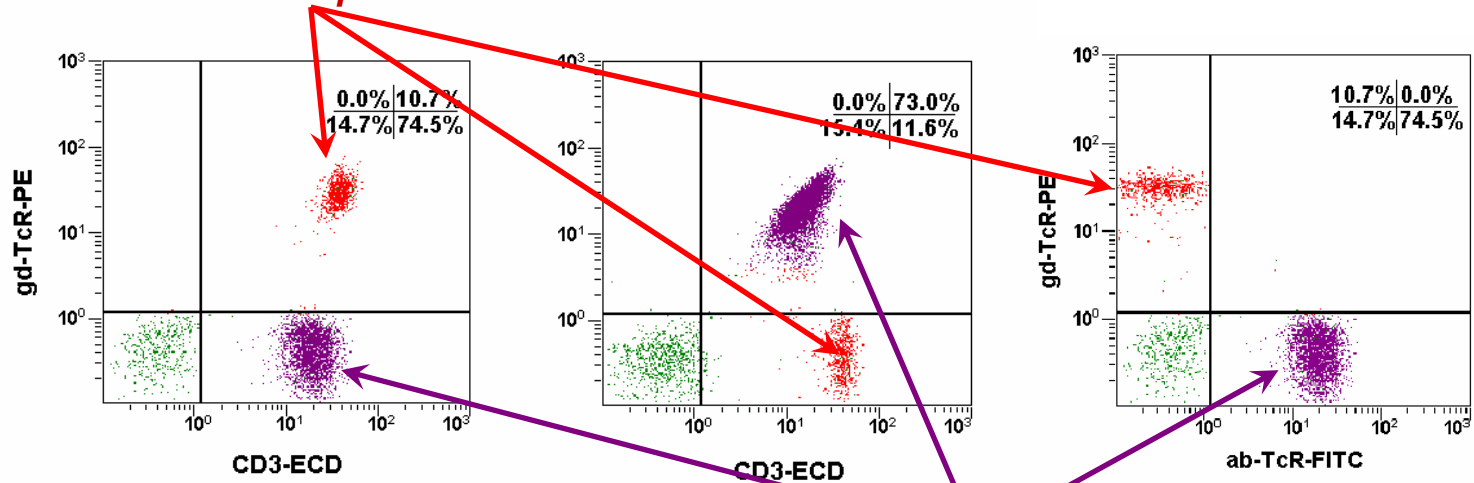


Анализ Т-клеток



Анализ Т-клеток

CD3^{high}CD8^{dim}TcR- $\gamma\delta$ ⁺ Т-клетки



CD3⁺CD8^{bright}TcR- $\alpha\beta$ ⁺ Т-клетки

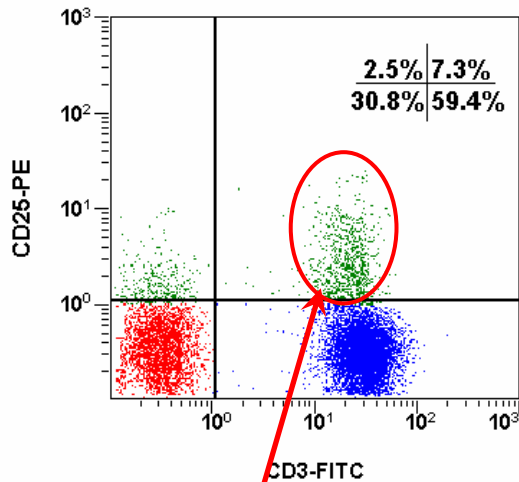
Субпопуляции	Относительно лимфоцитов (%)	Относительно общих Т-клеток (%)	Абсолютное количество (к/л)
Общие Т-клетки	61 - 85		0,946-2,079 x 10 ⁹
$\gamma\delta$ -Т клетки	1,8 - 7,4	1,7 - 8,9	0,022-0,115 x 10 ⁹
$\alpha\beta$ -Т клетки	60,8 - 71,5	87,2 - 98,3	0,924-1,964 x 10 ⁹

Опубликовано в: Хайдуков С.В., и др. Мед. иммунол., 2008, 10(2-3), С. 113-121

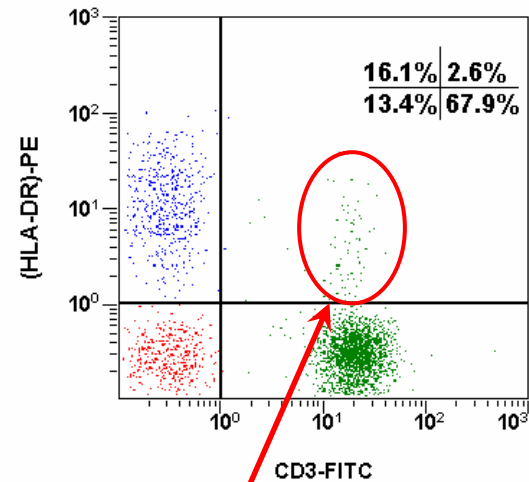
Изменения относительного количества $\gamma\delta$ -Т-клеток при различных заболеваниях и патологиях.

Изменение относительного количества $\gamma\delta$ -Т-клеток	Заболевание
Повышение относительного уровня $\gamma\delta$ -Т-клеток	<p>Вирусные инфекции: ВИЧ Цитомегаловирус Вирус Эпштейн-Бара</p> <p>Бактериальные инфекции: Туберкулез легких <i>Mycobacterium</i> Легионеллез <i>Legionella</i> Туляриемия <i>Francisella tularensis</i> Сальмонеллез <i>Salmonella</i> Боррелиоз (болезнь Лайма) <i>Borellia</i> Атопический дерматит (у детей) Болезнь Крона Болезнь Бехчета</p> <p>Первичные иммунодефициты</p>
Понижение относительного уровня $\gamma\delta$ -Т-клеток	<p>Атопический дерматит (у взрослых) Возрастное снижение относительного уровня $\gamma\delta$-Т-клеток</p>

Анализ активированных Т-клеток

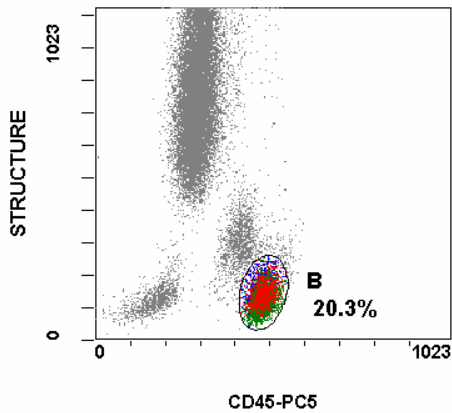


**Активированные Т-клетки
(ранняя активация)**



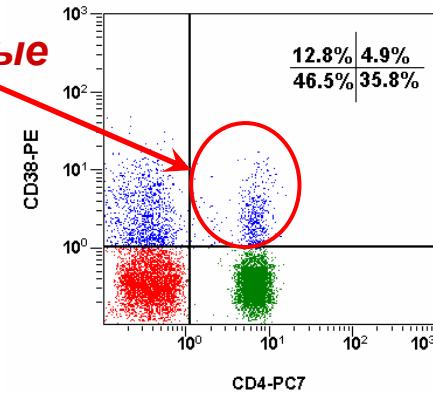
**Активированные Т-клетки
(поздняя активация)**

Анализ активированных Т хелперов и цитотоксических Т-клеток



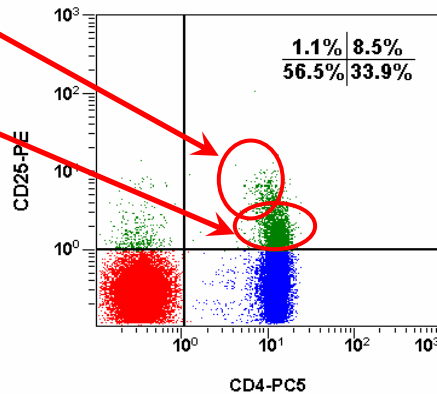
Анализ по зоне В

Активированные

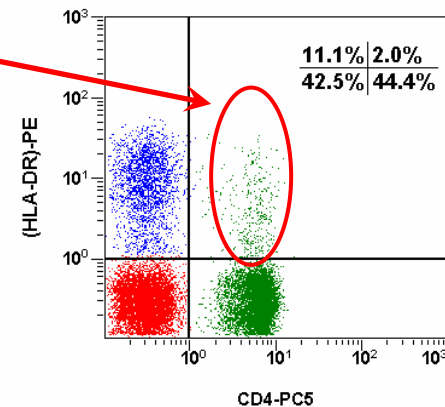


Регуляторные Т-клетки

Ранняя активация



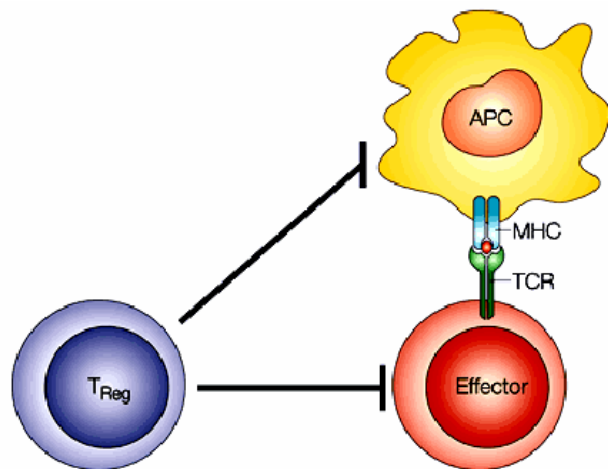
Поздняя активация



Почему такой интерес к Treg?

- Treg играют важную роль в иммуносупрессии и их изучают в таких областях как:
 - Аутоиммунные заболевания,
 - Трансплантационная иммунология,
 - Противоопухолевый ответ и
 - Иммуногомеостаз

Treg понижающие регуляторы



ПОЛЬЗА

- Регулируют T клеточный гомеостаз
- Предотвращают аутоиммунные заболевания
- Предотвращают аллергии
- Предотвращают гиперчувствительность
- Толерантность после трансплантации
- Предотвращают РТПХ

С ДРУГОЙ СТОРОНЫ

- Снижают противоопухолевый иммунитет
- Снижают иммунитет к инфекциям

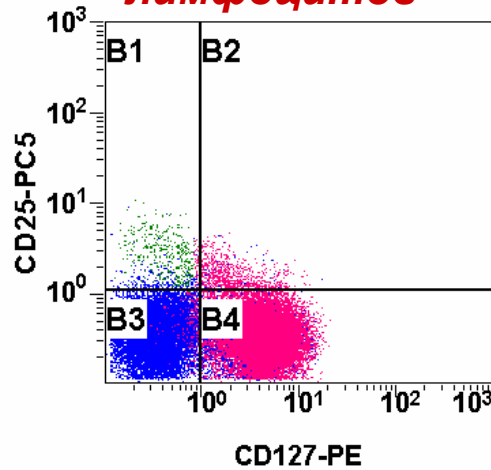
Поверхностный маркер регуляторных Т-клеток!

- Самый точный маркер для идентификации Трег клеток - **FoxP3**
 - Однако, это требует пермеабелизации клеток
- Недавно опубликованные данные продемонстрировали, что экспрессия **CD127 (IL-7 рецептор)** снижается на Трег клетках

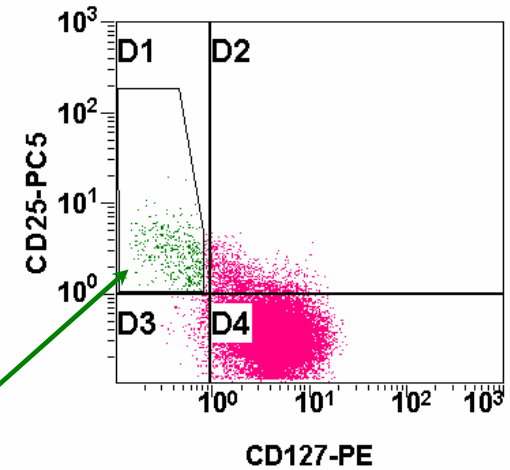
Анализ регуляторных T-клеток

Идентификация Treg - $CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD127^{neg}$

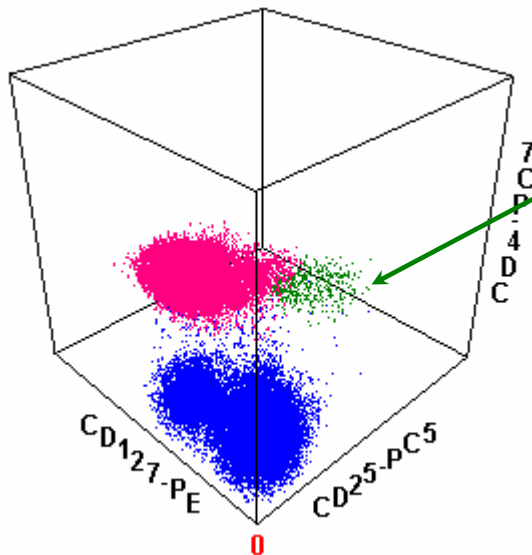
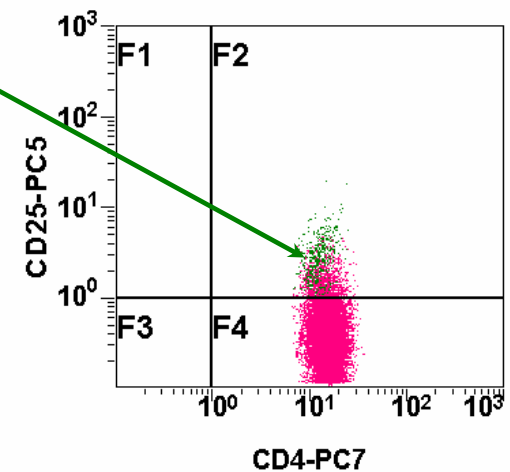
Анализ по зоне
лимфоцитов



Анализ по зоне $CD3^+CD4^+$

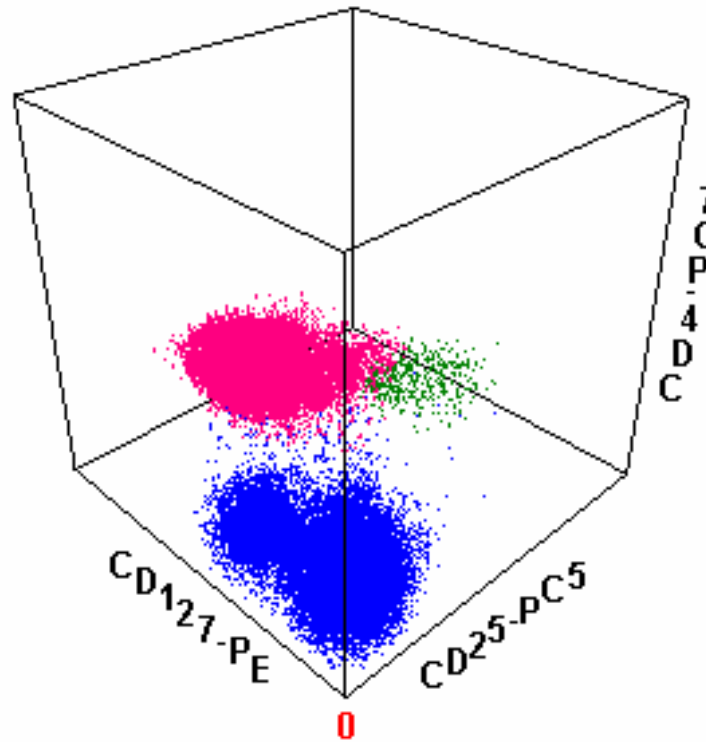


Анализ по зоне $CD3^+CD4^+$



Регуляторные
T-клетки

Анализ регуляторных Т-клеток



Субпопуляции	Содержание	
	Относительное (%)	Абсолютное количество (кл/л)
Общие Т хелперы	45 ± 10	0,576-1,336 x 10 ⁹
Регуляторные Т-клетки (относительно Т хелперов)	3,7 ± 2,05	0,009-0,078 x 10 ⁹

Инверсия соотношения T4/T8 - интерпретация

- Острая вирусная инфекция**
- Хроническая вирусная инфекция**
- Гематологические нарушения**
- Первичные иммунодефициты**
- Аутоиммунные заболевания**
- Солидные опухоли**

Интервалы распределения фенотипов лимфоцитов условно здоровых доноров (n = 362)

Тип клеток	% ПК	Абс.к-во кл/л
Лимфоциты (CD45 ^{bright})	28 - 36	1,363-2,808 x 10 ⁹
В-клетки (CD3 ⁺ CD19 ⁺ HLA-DR ⁺)	7 - 17	0,111-0,376 x 10 ⁹
В-1 клетки (CD19 ⁺ CD5 ⁺)	0,5 - 2,1	0,022-0,115 x 10 ⁹
В-2 клетки (CD19 ⁺ CD5 ⁻)	6,5 - 14,9	0,081-0,323 x 10 ⁹
В клетки памяти (CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD27 ⁺)	1,8 - 6,8	0,012-0,040 x 10 ⁹
НК (LGL) (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD8 ⁺)	8 - 17	0,123-0,369 x 10 ⁹
НК цитолитические (от общих НК-клеток)	2,5 - 6,2	0,003 - 0,022 x 10 ⁹
НК цитокин-продуцирующие (от общих НК-клеток)	93,7 - 97,5	0,081-0,323 x 10 ⁹
Т-клетки (CD3 ⁺ CD19 ⁻)	61 - 85	0,946-2,079 x 10 ⁹
Т хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	35 - 55	0,576-1,336 x 10 ⁹
Т цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	19 - 35	0,372-0,974 x 10 ⁹
Т хелперы активированные/ памяти (CD4 ⁺ CD45R0 ⁺)	5 - 25	0,068-0,702 x 10 ⁹
Т хелперы наивные (CD4 ⁺ CD45RA ⁺)	20 - 40	0,272-1,123 x 10 ⁹
$\alpha\beta$ -Т клетки (CD3 ⁺ $\alpha\beta$ -TcR ⁺ $\gamma\delta$ -TcR ⁻)	60,8 - 80,2	0,924-1,964 x 10 ⁹
$\gamma\delta$ -Т клетки (CD3 ⁺ $\gamma\delta$ -TcR ⁺ $\alpha\beta$ -TcR ⁻)	1,8 - 7,4	0,022-0,115 x 10 ⁹
Т-НК клетки (CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁺)	0,5 - 6	0,007-0,165 x 10 ⁹
Т клетки актив. (HLA-DR ⁺ CD25 ⁺)	0,5 - 6	0,007-0,165 x 10 ⁹
Регуляторные Т-клетки (CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ^{neg})	0,6 - 3,19	0,009-0,078 x 10 ⁹
Индекс соотношения (Тх/Тц)	1,5 - 2,6	

Опубликовано в: Хайдуков С.В., и др. Мед. иммунол., 2009, Т. 11, № 2-3, стр. 227-238

Хайдуков С.В.

EPICS® XL-MCL



Cytomics® FC500

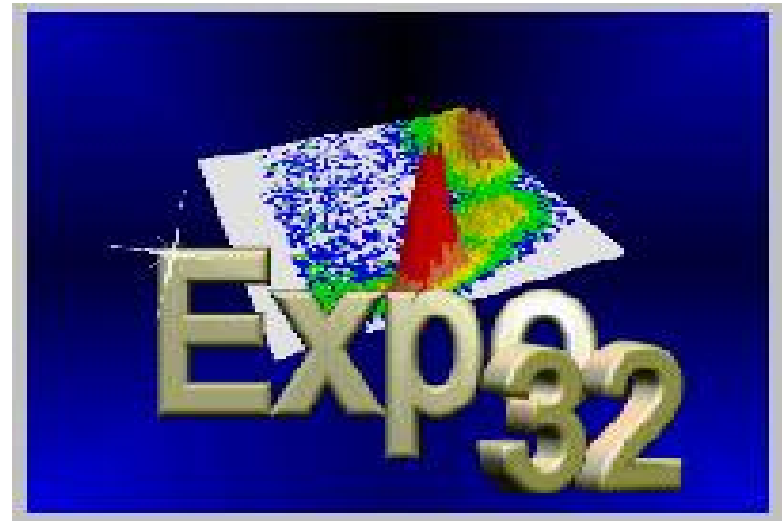


Хайдуков С.В.

CXP Software



This program is protected by U.S. and international laws as described in About. © Beckman Coulter, Inc., 2005



***СПАСИБО ЗА
ВНИМАНИЕ***