

## Выявление основных популяций лимфоцитов с помощью цитометрии по изображениям

### Аннотация

Детектор субпопуляций клеток, разработанный в ИАП РАН, был применен при иммунофенотипировании лимфоцитов здоровых доноров и стандартизованных образцов крови с нормальными и низкочисленными популяциями клеток. Показано, что при выполнении современных критериев правильности анализа возможно определение относительного содержания основных популяций лимфоцитов, в том числе для стандартных образцов с пониженным содержанием Т-хелперов, имитирующих кровь пациентов с ВИЧ-инфекцией.

### Введение

В диагностике и прогнозировании заболеваний, обусловленных иммунодефицитом, в частности при ВИЧ-инфекции, большое значение имеет определение в крови относительных и абсолютных концентраций Т-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов [1]. В работе [2] показано, что CD3+CD4+-лимфоциты эффекторной памяти и «терминально дифференцированные» CD3+CD8+-лимфоциты могут потенциально рассматриваться как универсальные биомаркеры для ВИЧ-инфекции и туберкулеза, который является ведущей причиной смерти больных ВИЧ-инфекцией. Одним из эффективных методов, позволяющих получить подобную диагностическую информацию, уже давно стал анализ субпопуляционного состава лимфоцитов с применением проточных цитометров [3], [4]. Однако в ряде случаев можно обратиться и к другой современной приборной реализации анализа субпопуляций – цитометрии клеток по их микроскопическим изображениям [5]–[7], результаты которой, как представляется, могут быть подобны получаемым с помощью проточных цитометров. Главной целью такого подхода является повышение доступности анализов за счет использования менее дорогостоящего оборудования, меньшего расхода реактивов, а также простоты подготовки и работы на приборе. Это может представлять интерес при скрининговых исследованиях социально значимых заболеваний, наблюдении за их течением, динамикой и эффективностью терапии.

### Материалы и методы

Выявление основных популяций лимфоцитов, конъюгированных с метками CD45/CD14, CD3/CD19, CD3/CD16+CD56, CD3/CD4 и CD3/CD8, проводилось на «Детекторе субпопуляций клеток», разработанном в ИАП РАН. Прибор построен по схеме, подобной схеме цифрового микроскопа, с лазерным возбуждением флуоресценции и со специализированным алгоритмом сбора и обработки данных [8], [9]. На формируемых изображениях полей зрения проводятся автоматизированный поиск и анализ иммунокомпетентных клеток, позволяющие получить статистические распределения обнаруженных объектов по их индивидуальным параметрам: размеру, прозрачности и интенсивности флуоресценции одновременно в двух спектральных диапазонах.

По функциональному назначению прибор может быть близок к проточным цитометрам, однако отличается от них отсутствием ФЭУ, проточных систем транспортировки клеток, прецизионных систем фокусировки лазерного пучка, что исключает необходимость промывок и сложной юстировки прибора.

Образец – суспензию клеток, приготовленную из цельной крови, метят специфичными флуоресцентными метками и помещают в камеру Горяева или другую счетную камеру. Камеру с образцом устанавливают в поле зрения микрообъектива прибора. При автоматическом сканировании образца произ-

водят регистрацию цифровых изображений большого числа полей зрения, в каждом из которых находятся десятки-сотни клеток. Анализ длится 1...10 мин в зависимости от требуемой выборки количества лимфоцитов, которая может достигать десятков тысяч клеток.

Обнаружение всех объектов осуществляется на изображении в светлом поле (на просвет), а их флуоресценция регистрируется как изображение образца в эмитированном свете. Длина волны лазерного источника возбуждения флуоресценции составляет 473 нм. Для регистрации сигналов в стандартных для цитометрии диапазонах используют сменные интерференционные полосовые светофильтры. Величины интенсивности флуоресценции объектов определяются одновременно в двух выбранных спектральных диапазонах.

Из индивидуально вычисленных параметров каждой обнаруженной клетки формируется 4-мерный массив данных всех клеток образца, сопоставление и дальнейшая программная обработка которых дают статистические данные для популяций. Гейтирование (выбор по параметрам и выделение подмножеств) многомерных данных на отображаемых гистограммах и/или двухпараметрических точечных скаттерограммах позволяет получать статистику по отдельным субпопуляциям, выбранным из общей совокупности найденных клеток. Визуализация образца, анализ и вывод текущих результатов происходят в реальном времени, как показано на *рис. 1* (здесь и далее – скриншоты и фрагменты скриншотов программного обеспечения прибора).

Для исследований использована периферическая кровь пяти здоровых доноров и стандартные образцы крови фирмы «Beckman Coulter Immuno-Troll™» и «Immuno-Troll™ Low Cells». Каждый образец инкубировали с двухцветными моноклональными антителами, конъюгированными с красителями FITC для первой метки и PE для второй. Специфика измерений на приборе позволяет уменьшить количество крови и реагентов в пять раз по сравнению с рекомендованными производителем для применения в проточной цитометрии. Технология с однократной отмывкой обеспечивает максимальную сохранность свойств клеток и позволяет хорошо очистить образец от мелких частиц для надежности цифрового анализа изображений.

Подготовку всех образцов производили одинаково. К 20 мкл крови добавляли 4 мкл моноклональных антител IOTest® Beckman Coulter. Встряхивали на «Vortex», после чего инкубировали в темном месте при комнатной температуре 20 мин. Затем добавляли 100 мкл лизирующего раствора OptiLyse® C Beckman Coulter для удаления эритроцитов. Встряхивали на «Vortex», инкубировали 10 мин. Добавляли 100 мкл фосфатного буфера (pH = 7,2), встряхивали на «Vortex», инкубировали 5 мин. Центрифугировали образец 5 мин при 280 g, отбирали лишнюю жидкость аспирацией, оставляя клетки на дне пробирки. Доводили конечный объем пробы до 10 мкл, добавив фосфатный буфер. Сразу же проводили анализ.

## Результаты

Все численные экспериментальные данные получены путем гейтирования массивов данных каждого измеряемого образца с помощью программы прибора, как показано на рис. 1 в качестве примера. Обобщение и обработка данных нескольких отдельных экспериментов и различных образцов проводились расчетным путем. Примеры хода экспериментов, а также виды получаемых и отображаемых результатов представлены на рис. 2-4.

Дискриминацию дебриса для всех образцов крови провели на распределении «Прозрачность-Диаметр». Там же в отдельный регион выделили лимфоциты, которые на графике располагаются справа внизу. Контаминация лимфоцитов моноцитами при гейтировании по прозрачности и диаметру для разных образцов крови составила менее 2 % (в примере на рис. 2а она составила 1,7%), что не превышает рекомендованного значения 3 % [10]. Точное выявление моноцитов проведено с помощью метки CD45/CD14 при их гейтировании на распреде-

лении «Флуоресценция-Диаметр» в канале флуоресценции PE, как проиллюстрировано на рис. 2б.

При помощи двумерных графиков распределений оценивали совместную флуоресценцию лимфоцитов, меченных разными двухцветными метками. Например, на рис. 3 и 4 подмножества точек хорошо разделены на квадранты и легко определяются визуально. Заметна популяция ярких лимфоцитов с повышенным свечением в канале флуоресценции FITC (CD3<sup>bright</sup>). Популяции с двойным позитивным сигналом (CD3+CD4+ и CD3+CD8+) могут быть с уверенностью идентифицированы по графикам.

Относительные количества моноцитов, Т- и В-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-цитотоксических, NK- и NKT-клеток, иммунорегуляторный индекс Th/Тсyt, полученные в результате измерений для доноров, попадают в интервалы распределения этих параметров для здоровых людей [4]. Аналитический контроль по показателям «Сумма лимфоцитов», «Репликации Т-клеток», «Сумма Т-клеток» удовлетворяет критериям качества, описанным в [1], [4], [10]. Для каждого образца за 2 мин анализа на-

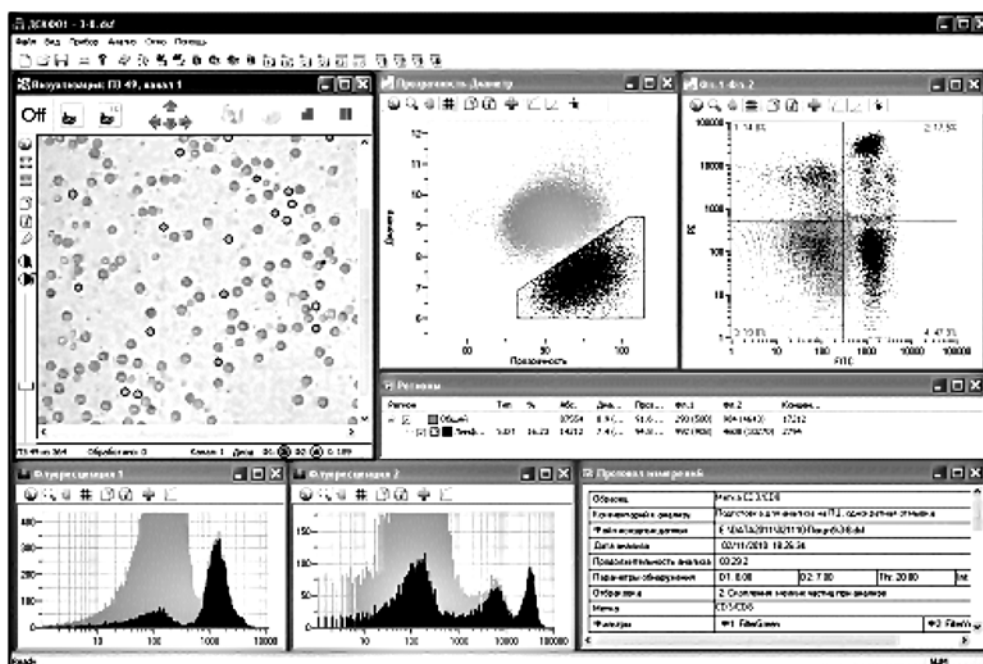


Рис. 1. Представление результатов анализа пользователю. Измерение содержания цитотоксических лимфоцитов в популяции лимфоцитов (CD3/CD8)

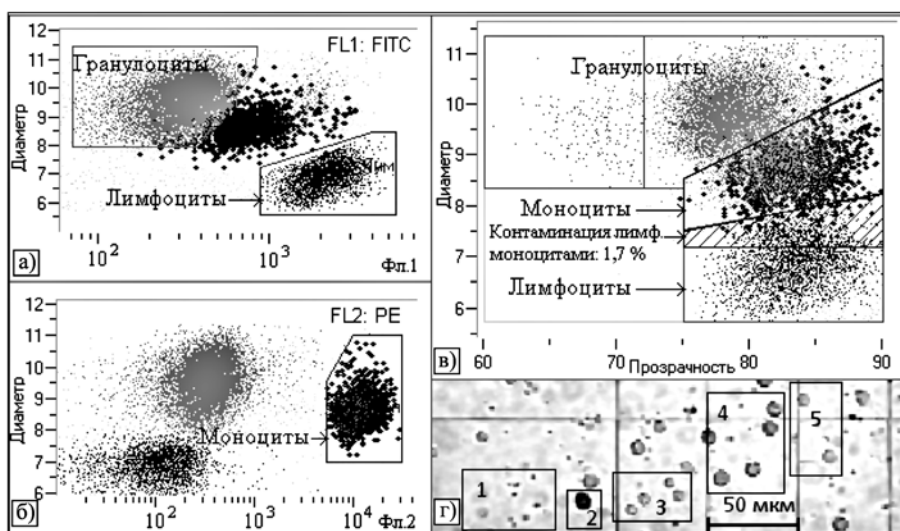


Рис. 2. Метка CD45/CD14: распределения «Флуоресценция-Диаметр» в каналах FITC и PE (а), (б); «Прозрачность-Диаметр» (в). На фрагменте изображения (г) цифрами обозначены: дебрис (1), гранулоциты с крупными темными гранулами (2), лимфоциты (3), гранулоциты (4), моноциты (5)

брана статистика 8...10 тыс. лимфоцитов, что значительно превышает рекомендованный в [10] минимум в 2,5 тыс. Выполнено аналогичное исследование для стандартизованного набора клеток периферической крови Immuno-Troll™, полученные результаты измерений удовлетворяют паспортным значениям набора и, кроме того, также попадают в нормативные показатели для здоровых людей. Результаты экспериментов (для доноров – усредненные) приведены в табл. 1 и 2.

В работе [2] приведены данные для пациентов с ВИЧ, где иммунорегуляторный индекс Th/Tcyt составил 0,58, и пациентов с ВИЧ и туберкулезом органов дыхания, где Th/Tcyt составил 0,29, тогда как для обследованных здоровых доноров этот индекс был равен 1,76, а для пациентов с туберкулезом,

но без ВИЧ – 1,86. В нашей работе, ввиду недоступности образцов ВИЧ-инфицированных людей, исследования для крови с пониженным содержанием Т-хелперов были проведены для Immuno-Troll™ Low Cells с содержанием Т-хелперов на уровне 18 % от общего количества лимфоцитов, что в среднем в 2,5 раза ниже нормы. Th/Tcyt, рассчитанный для этого набора, составил 0,4, что гораздо меньше нормы для здоровых людей и близко к значениям индекса для пациентов с ВИЧ. Данные результаты соответствуют паспортным данным стандартного образца и приведены в табл. 1.

Полученные нами данные хорошо согласуются с принятыми опорными значениями для использованных образцов: относительным содержанием основных популяций лимфоцитов

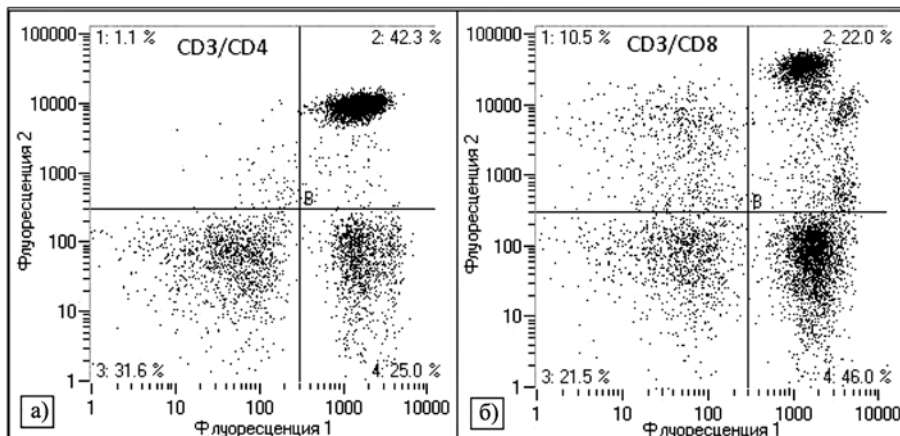


Рис. 3. Распределение флуоресценции в каналах FITC (Фл. 1) / PE (Фл. 2) для образцов, конъюгированных с антителами к CD3/CD4 (а) и к CD3/CD8 (б)

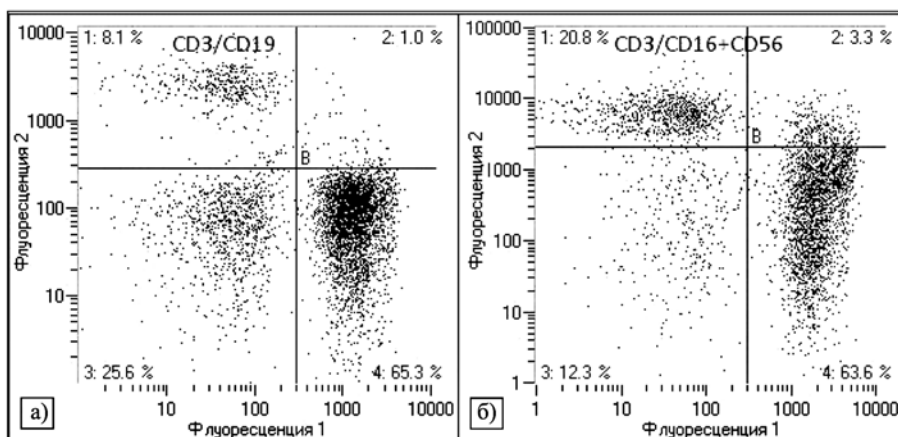


Рис. 4. Распределение флуоресценции в каналах FITC (Фл. 1) / PE (Фл. 2) для образцов, конъюгированных с антителами к CD3/CD19 (а) и к CD3/CD16+CD56 (б)

Таблица 1

**Результаты исследования крови доноров и стандартных образцов, показатели нормы взяты в [4], опорные значения – паспортные данные наборов**

Популяции и субпопуляции	Относит. кол-во позитивных клеток для доноров, %		Относит. кол-во позитивных клеток, стандарт Immuno Troll, %		Относит. кол-во позитивных клеток, стандарт Immuno Troll Low, %	
	Среднее ± оценка СКО, n = 5	Норма [4]	Изме-рено	Опорное значение	Изме-рено	Опорное значение
Т-лимфоциты (CD3+CD19-)	71 ± 5	61...85	71	72 ± 9	60	62 ± 9
Т-хелперы (CD3+CD4+)	46 ± 4	35...55	45	46 ± 9	17	18 ± 9
Т-цитотоксические (CD3+CD8+)	23 ± 2	19...35	25	22 ± 6	37	38 ± 6
В-лимфоциты (CD3-CD19+)	10 ± 3	7...17	13	15 ± 5	19	19 ± 5
НК-клетки (CD3-CD16+CD56+)	16 ± 4	8...17	8	10 ± 4	15	16 ± 4
НКТ-клетки (CD3+CD16+CD56+)	3,3 ± 4	0,5...6	-	-	-	-
Th/Tcyt (CD3+CD4+ / CD3+CD8+)	2,0	1,5...2,6	1,8	-	0,4	-

в крови здоровых людей и паспортными величинами стандартизованных наборов, в том числе с пониженным содержанием Т-хелперов. Аналитический контроль по расчетным показателям «Сумма лимфоцитов», «Репликации Т-клеток», «Сумма Т-клеток» (табл. 2) удовлетворяет критериям качества, описанным в литературе (колонка «Норма»). Все это свидетельствует, на наш взгляд, об отсутствии предпосылок появления существенных ошибок при определениях субпопуляций Т-лимфоцитов в крови людей, инфицированных ВИЧ.

### Заключение

Полученные результаты, с точки зрения обнаружения, идентификации и статистики подсчета частиц, представляются достоверными. В целом, это позволяет считать предложенный аппаратный подход совместимым с известными методиками иммунофенотипирования лимфоцитов для целей обнаружения сдвига иммунорегуляторного индекса Т-лимфоцитов. Технические параметры прибора и опыт его применения свидетельствуют о возможности его использования для изучения других клеток и различных микрообъектов с флуоресцентными метками.

*Работа выполнена в ИАП РАН в рамках государственного задания № 075-00780-19-00 Министерства науки и высшего образования РФ.*

### Список литературы:

1. Шестакова Е.В., Зурочка А.В., Квятковская С.В., Бецков С.Г., Дукардт В.В., Хайдуков С.В. Анализ контрольных показателей «репликации Т-клеток» и «сумма Т-клеток» при исследовании иммунного статуса у ВИЧ-инфицированных больных и выявление дубль-негативных субпопуляций Т-лимфоцитов (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4-CD8-) // Медицинская иммунология. 2008. Т. 10. № 4-5. С. 463-466.
2. Васильева Е.В., Кудрявцев И.В., Максимов Г.В., Вербов В.Н., Серебрякова М.К., Ткачук А.П., Тоголян А.А. Влияние ВИЧ-инфекции и туберкулеза на степень дифференцировки Т-лимфоцитов периферической крови // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7. № 2. С. 151-161.
3. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тоголян А.А., Черешнев В.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) // Медицинская иммунология. 2009. Т. 11. № 2-3. С. 227-238.
4. Хайдуков С.В., Байдун Л.В., Зурочка А.В., Тоголян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8. № 4 (17). С. 974-992.

5. Shapiro H.M. «Cellular Astronomy» – a foreseeable future in cytometry // Cytometry Part A. 2004. 60A. PP. 115-124.
6. Hennig C., Adams N., Hansen G. A versatile platform for comprehensive chip-based explorative cytometry // Cytometry Part A. 2009. 75A. PP. 362-370.
7. Varga V.S., Ficsor L., Kamarás V., Jónás V., Virág T., Tulassay Z., Molnár B. Automated multichannel fluorescent whole slide imaging and its application for cytometry // Cytometry Part A. 2009. 75A. PP. 1020-1030.
8. Бардин Б.В., Манойлов В.В., Чубинский-Надеждин И.В., Васильева Е.К., Заруцкий И.В. Определение размеров локальных объектов изображений для их идентификации // Научное приборостроение. 2010. Т. 20. № 3. С. 88-94.
9. Манойлов В.В., Бардин Б.В., Чубинский-Надеждин И.В., Васильева Е.К., Заруцкий И.В. Использование оптических параметров клеток для их распознавания на цифровых микроскопических изображениях // Научное приборостроение. 2012. Т. 22. № 1. С. 95-100.
10. Покровский В.В., Серебровская Л.В., Ситдыкова Ю.Р., Мэнди Ф., Берджерон М. Определение количества CD4 Т-лимфоцитов на проточном цитометре у пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) // ШАГИ профессионал. 2006. № 1. С. 9-18.

*Владимир Ефимович Курочкин,  
д-р техн. наук, профессор,  
директор,*

*Игорь Вадимович Чубинский-Надеждин,  
зав. лабораторией систем детектирования  
частиц и излучений,*

*Екатерина Кимовна Васильева,  
научный сотрудник,*

*Юрий Витальевич Куликов,  
научный сотрудник,*

*Борис Васильевич Бардин,  
канд. техн. наук, ведущий научный сотрудник,*

*Институт аналитического приборостроения РАН,  
г. С.-Петербург,*

*Александр Игоревич Мартынов,  
канд. мед. наук, первый зам. директора,*

*ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»  
ФМБА России,*

*г. Москва,*

*e-mail: virtkat@mail.ru*

Таблица 2

**Контрольные суммы и расчетные показатели результатов**

Расчетные показатели	Для результатов доноров					Норма
	1	2	3	4	5	
Th/Tcvt: CD3+CD4+ / CD3+CD8+	1,9	2,0	2,2	2,0	1,8	1,5...2,6 [4]
Сумма Т-клеток: Т-х + Т-ц, (CD3+)	64 (66)	64 (65)	73 (71)	70 (73)	76 (77)	CD3+ ± 5 [1], [4], [10]
Репликации Т-клеток: CD3+ среднее ± СКО	66,9 ± 0,4	66 ± 1	71,2 ± 0,5	71 ± 2	75 ± 1	СКО ≤ 2 [1], [10]
Сумма лимфоцитов: Т + В + NK	95	97	100	98	95	100 ± 5 [4]; 100 ± 10 [10]