

Исследование апоптоза методом проточной цитометрии **484** Детекция внутриклеточных цитокинов **487** Диагностика аллергии немедленного типа **488** Определение цитокинов в биологических жидкостях методом проточной цитофлуориметрии **489** Иммунофенотипирование острых лейкозов **490** Иммунофенотипирование лимфопролиферативных заболеваний **493** Фенотипирование основных субпопуляций лимфоцитов **494** Подсчет гемопоэтических стволовых клеток **495**

## сокращения раздела:

ИЛ – интерлейкин  
ИО – иономицин  
ИФН – интерферон  
ЛПЗ – лимфопролиферативные заболевания

ЛПС – липополисахарид  
ОЛЛ – острые лимфобластные лейкозы  
ОМЛ – острые миелобластные лейкозы

ФГА – фитогемагглютинин  
ФМА – форбол-12-миристат-13-ацетат  
ФНО – фактор некроза опухолей  
ТН – Т хелпер

## Исследование апоптоза методом проточной цитометрии

### Мембранные маркеры апоптоза

#### Аннексин V

Изменения в плазматической мембране клетки являются одними из наиболее ранних признаков апоптоза. В апоптотических клетках фосфатидилсерин (ФС) переориентируется и локализуется на поверхности клеточной мембраны. Локализация ФС на поверхности мембраны наблюдается, начиная с ранней стадии апоптоза до полной деградации клетки. Рекомбинантный аннексин V - белок (35-36 кД), обладающий высокой аффинностью к ФС в присутствии ионов  $Ca^{2+}$ . Связываясь с ФС на поверхности клетки, аннексин V, конъюгированный с флуорохромом, служит маркером апоптоза.

Обычно аннексин V используется в комбинации с пропидием иодидом (PI), что позволяет одновременно определять интактные клетки (отрицательные и по аннексину V и по PI), клетки, находящиеся в «раннем» апоптозе (положительные по аннексину V, отрицательные по PI), и клетки, находящиеся в «позднем» апоптозе или в некрозе (положительные и по аннексину V и по PI).

#### CD95 (Fas/APO-1)

CD95, также называемый Fas или APO-1, - трансмембранный гликопротеин (45 кД), являющийся членом

семейства рецепторов к фактору некроза опухолей (TNF- $\alpha$ ). CD95-антиген экспрессируется в значительном количестве на тимоцитах и  $CD4^+$  и  $CD8^+$  лимфоцитах периферической крови, в меньшей степени на В-лимфоцитах и NK-клетках. Этот антиген экспрессируется также на гранулоцитах и моноцитах, но его экспрессия не обнаружена на тромбоцитах и эритроцитах. Экспрессия CD95 наблюдается также на клетках тканей и на неопластических клетках.

Связывание Fas с Fas-лигандом (Fas-L, CD95L), индуцирует апоптоз в клетках, его экспрессирующих. Моноклональные антитела к CD95 позволяют с использованием метода проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии выявить популяцию клеток, экспрессирующих CD95 антиген.

#### CD95L (Fas-L)

CD95L, также называемый Fas-лигандом (mFas-L), мембранный белок (40 кД). Существует также растворимая форма CD95L (sFas-L) - белок (26 кД). CD95L является членом семейства рецепторов TNF- $\alpha$ . Этот антиген экспрессируется цитотоксическими Т-лимфоцитами и NK-клетками. Экспрессия CD95L выявлена на многих опухолевых клетках.

Связывание Fas-L с Fas-рецептором (CD95) индуцирует процесс апоптоза в клетка-мишенях. Моноклональные антитела к CD95L позволяют с использованием

метода проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии выявить популяцию клеток, экспрессирующих CD95L антиген.

## Регистрация разрушения ДНК

### TUNEL-метод

Набор Mebstain Apoptosis Direct предназначен для детектирования апоптоза в образцах тканей. Этот набор может быть использован для иммуногистохимии, работы с цитоспиновыми препаратами и в методе проточной цитометрии. Считается, что фрагментация ядерной ДНК является биохимическим маркером апоптоза. Метка dUTP-biotin, встраиваемая с помощью TdT (терминальная дезоксирибонуклеотидтрансфераза), делает возможной визуализацию фрагментации ДНК на уровне одной клетки *in situ*. Метод считается более чувствительным, чем морфологические изменения.

Mebstain Apoptosis Kit Direct является набором для детектирования апоптоза с использованием модифицированного TUNEL-метода с применением dUTP-FITC. В клетках, находящихся в апоптозе, под действием эндонуклеаз ДНК расщепляется на фрагменты, состоящие из мультимерных нуклеосом. В TUNEL-методе 3'-ОН концевой фрагмент, образовавшийся при расщеплении ДНК, под действием TdT связывается с dUTP-FITC с последующим детектированием на флуоресцентном микроскопе или проточном цитометре.

## Регистрация активации ключевых молекул апоптоза

**Каспаза-3** – один из основных участников передачи апоптозного сигнала от Fas-рецептора. В норме

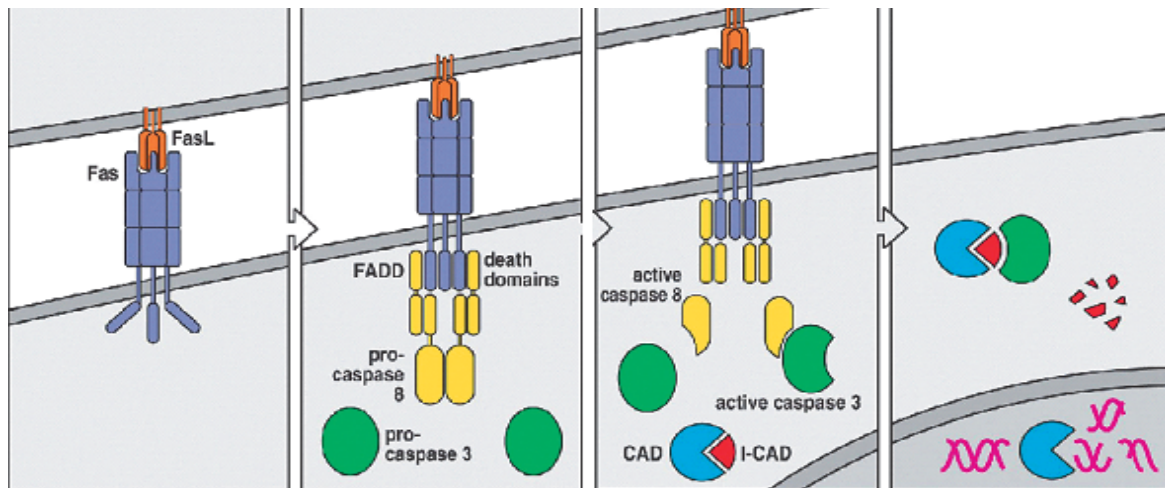
этот белок находится в цитоплазме в виде прокаспазы-3. (см. рис.) При связывании Fas-рецептора с Fas-лигандом происходит активация каспазного протеолитического каскада с образованием активной формы каспазы-3. Этот фермент, в свою очередь, участвует в активации дезоксирибонуклеотидтрансферазы (CAD), разрушающей ДНК. Окраска клеток конъюгатом моноклональных антител к активной форме каспазы-3 с флуорохромом позволяют идентифицировать эту молекулу с помощью проточной цитофлуориметрии.

## Митохондриальные маркеры апоптоза

**APO2.7** – антиген (также называемый 7A6), который появляется на мембране митохондрий апоптозных клеток. Экспрессия APO2.7 определяется на ранних этапах апоптоза. APO2.7 может быть обнаружен в клетках после воздействия радиации, обработки лекарственными средствами или связывания CD95 с Fas-лигандом. Живые клетки негативны или слабо позитивны по этому антигену. Только 2% периферических Т-клеток здоровых доноров экспрессируют APO2.7.

**Bcl-xL** и **Bcl-2** – продукты генов *bcl-XL* и *bcl-2*. Эти факторы способны ингибировать процессы, ведущие к клеточной гибели. Один из способов – стабилизация митохондриальной мембраны и препятствие выходу цитохрома С в цитоплазму, где он может активировать проапоптотические факторы. Экспрессия антиапоптотических белков усиливается при формировании зрелых форм Т-лимфоцитов и снижается при активации клетки.

**Bax** и **Bad** – белки, которые способны формировать гетеродимеры с Bcl-2 и Bcl-xL соответственно, вследствие их высокой аминокислотной гомологии. Связывание этих



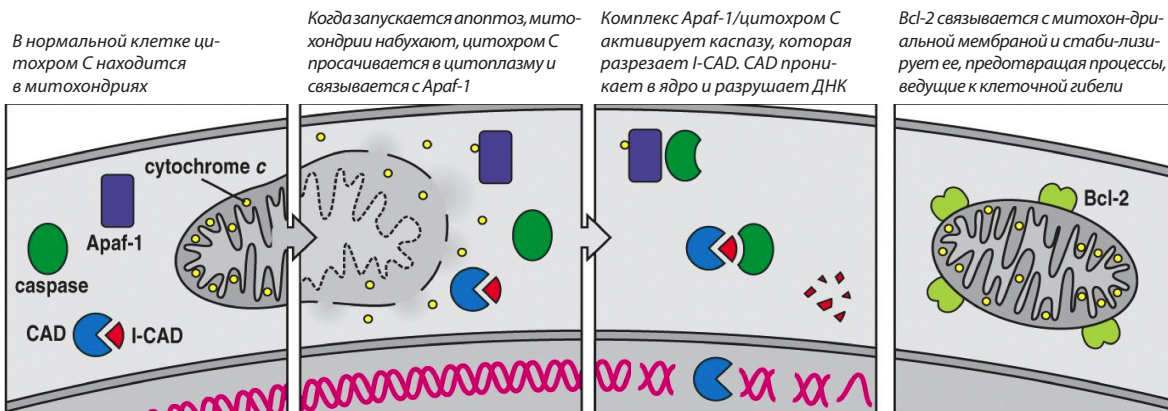
Fas-лиганд связывается с Fas-рецептором

Связывание FasL вызывает конформационные изменения Fas, которые приводят к присоединению адапторных белков

Адапторные белки привлекают и активируют каспазу-8, которая разрезает и активирует каспазу-3

Активированная каспаза-3 разрезает I-CAD, освобождая CAD (caspase activated DNase), которая направляется в ядро и разрушает ДНК

**Пояснения к рисунку:** FADD – адапторный белок, взаимодействующий с доменами смерти (death domains) Fas-рецептора; **pro-caspase** – прокаспазы; **active caspase** – активная форма каспазы; CAD – ДНКаза, активированная каспазой; I-CAD – ингибитор ДНКазы, активированной каспазой



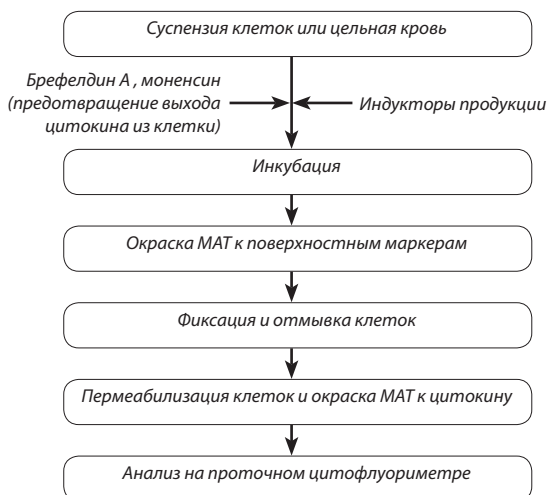
**Пояснения к рисунку:** cytochrome C - цитохром С; Apaf1 - белок, активирующий протеазы при апоптозе; caspase – активная форма каспазы; CAD – ДНКаза, активированная каспазой; I- CAD – ингибитор ДНКазы, активированной каспазой

белков отменяет антиапоптотические свойства Bcl-2 и Bcl-xL. Баланс про- и антиапоптотических молекул определяет развитие или предотвращение гибели клетки.

### Детекция внутриклеточных цитокинов

При развитии воспаления, иммунном ответе, гемопозе цитокины служат связующим звеном между иммунной и другими системами организма. Основными продуцентами цитокинов выступают не только клетки иммунной системы (лимфоциты, макрофаги, моноциты), но и стромальные соединительнотканые клетки.

#### Этапы пробоподготовки для детекции внутриклеточных цитокинов с помощью проточной цитофлуориметрии



При активации продуцента изменяется количественный и качественный состав вырабатываемого цитокинового спектра. Количество цитокина в такой ситуации зависит от количества клеток-продуцентов и их синтетической активности. С другой стороны, именно способ-

ность синтезировать тот или иной цитокин может определять принадлежность клетки к определенному типу. Так, к Т-хелперам и Т-цитотоксическим клеткам 1 типа (Th1 и Tc1) относят соответственно CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, способные продуцировать IFN-γ, а к Т-хелперам и Т-цитотоксическим клеткам 2 типа (Th2 и Tc2) – продуценты IL4 с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> соответственно.

Изменение пропорций клеток, экспрессирующих различные цитокины, может отражать патогенез заболевания и служить критерием для оценки успеха терапевтических мероприятий. Так, снижение относительного количества клеток, экспрессирующих ИФН-гамма, в периферической крови наблюдается у больных туберкулезом, рассеянным склерозом, дерматомиозитом. Превалирование Th2 и снижение продуцентов ИФН-гамма повышает частоту инфекционных осложнений после хирургических вмешательств у пациентов с онкозаболеваниями ЖКТ. У больных атопической бронхиальной астмой содержание ИФН-гамма-продуцирующих клеток не изменяется, однако повышается доля ИЛ-4-продуцирующих Т-клеток (за счет Th2). У детей с атопическим дерматитом и бронхиальной астмой наблюдается снижение Т-клеток, экспрессирующих ФНО-альфа. У пациентов в обширными травмами и инфекционными осложнениями отмечено снижение ЛПС-индуцированной цитокин-продуцирующей способности моноцитов периферической крови, а количество Т-клеток, экспрессирующих ИЛ-4, напротив, повышается. У ВИЧ-инфицированных пациентов наблюдается снижение доли клеток, экспрессирующих ИФН-гамма и ИЛ-2, и увеличение количества продуцентов ИЛ-4 и ИЛ-10.

Решить проблему детекции цитокина на уровне одной клетки позволяет проточная цитофлуориметрия. Покоящиеся клетки продуцируют небольшие количества цитокинов, которые, как правило, не депонируются, поэтому первым этапом пробоподготовки для оценки внутриклеточных цитокинов является стимуляция лимфоцитов и блокада выхода этих продуктов из клеток.

• См. главу «Цитокины», стр. 401

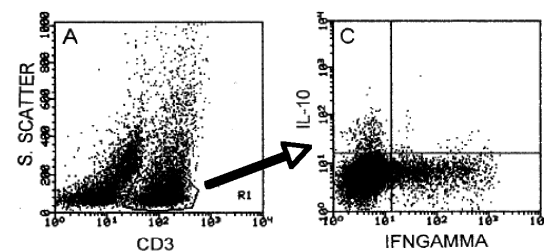
В качестве индуктора цитокинов чаще всего используют активатор протеинкиназы С форбол-12-миристрат-13-ацетат (ФМА) в комбинации с ионофором кальция иономицином (Ио). Применение такого сочетания вызывает синтез широкого спектра цитокинов – ИФН-гамма, ИЛ-4, ИЛ-2, ФНО-альфа. Недостатком использования ФМА-Ио являются проблемы детекции CD4 на поверхности лимфоцитов после такой активации. Также продукцию цитокинов стимулируют с помощью митогенов (фитогемагглютинин, ФГА) и бактериальных продуктов (липополисахарид, ЛПС).

**Индукторы и время инкубации, применяемые для оценки внутриклеточных цитокинов в различных клеточных популяциях**

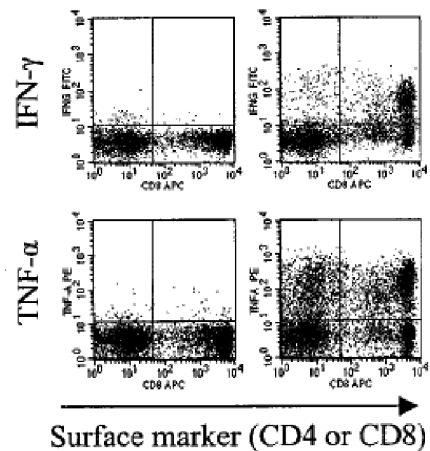
Индуктор	Индуктируемый цитокин	Клеточная популяция	Время инкубации (ч)	Источник*
ФМА + иономицин	ФНО-альфа	лимфоциты	4-6	[1]
	ИЛ-4	лимфоциты	4-6	[2-5]
	ИФН-гамма	лимфоциты	4-6	[1-6]
	ИЛ-2	лимфоциты	6	[3]
ФГА	ФНО-альфа	лимфоциты	4-24	[2]
	ИЛ-4	лимфоциты	24-48	[2]
	ИЛ-10	лимфоциты	48	[2]
ЛПС E. coli	ФНО-альфа	моноциты	4-8	[1], [3]
	ИЛ-6	моноциты	4-8	[1], [3]
	ИЛ-1бета	моноциты	4-8	[1], [3]
	ИЛ-10	моноциты	24	[6]
ИФН-гамма + ЛПС E. coli	ИЛ-12	моноциты	22	[1]

\* Литература:  
 [1] – Spolarics et al., 2003; [2] – Baran et al., 2001; [3] – Schuerwegh et al., 2003; [4] – Mazziotti et al., 2003; [5] – Mack et al., 2002; [6] – Crucian et al., 1996

После инкубации лимфоцитов в присутствии индукторов продукции и блокатора внутриклеточного транспорта, клетки фиксируют, пермеабелизуют и окрашивают специфическими антителами. Одновременное окрашивание поверхностных и внутриклеточных маркеров увеличивает количество получаемой информации о клетке и позволяет более точно определить ее популяционную принадлежность.



Crucian et al., 1996



Spolarics et al., 2003

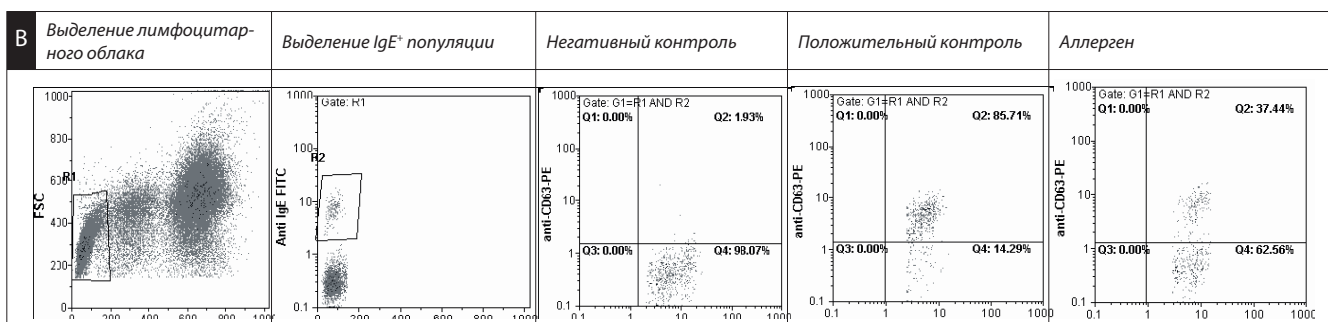
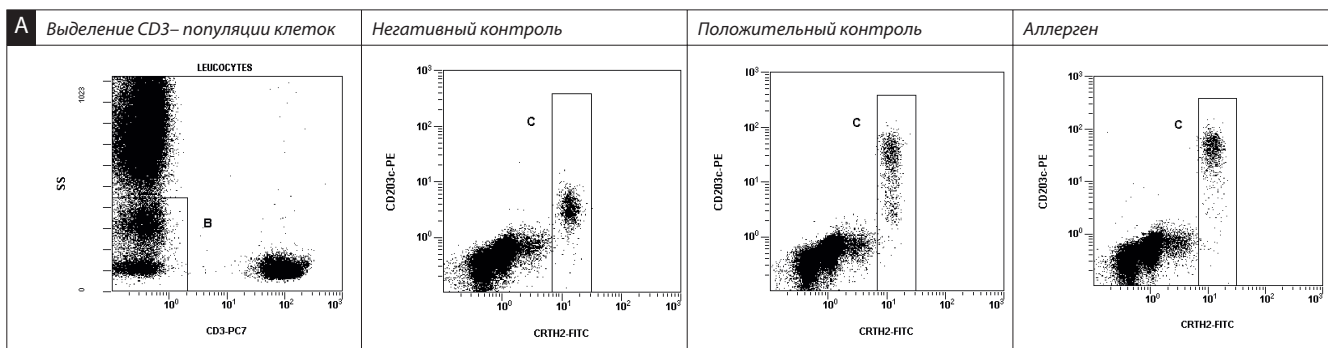
## Диагностика аллергии немедленного типа

Клинические признаки аллергии (зуд, покраснение, отек и др.) формируются в результате высвобождения гистамина из тучных клеток и базофилов. Точная идентификация аллергена, вызывающего такую реакцию, является важным условием правильной диагностики заболевания и успешной специфической терапии. В клинической практике диагностика аллергии проводится чаще всего на основе анамнеза заболевания, постановки кожных проб и обнаружения повышенных концентраций IgE в сыворотке пациента. В сенсibilизированном организме антитела IgE-типа фиксируются на тучных клетках и базофилах. При связывании аллергена с соответствующими антителами в клетке запускается каскад реакций, в результате которых разрушается комплекс актин-миозин, гранулы сливаются с мембраной клетки и их содержимое выбрасывается наружу. Вещества, освобождающиеся в результате дегрануляции (гистамин, протеиназы, ферменты и др.), вызывают развитие воспалительной реакции и приводят формированию клинических признаков аллергии. Постановка кожного теста бывает противопоказана многим пациентам из-за риска возникновения осложнений, поэтому часто возникает необходимость проведения теста *in vitro*.

В результате встраивания мембраны гранул в поверхностную мембрану клетки при дегрануляции, на поверхности базофилов появляются дополнительные молекулы. Добавление аллергена к клеткам крови в условиях *in vitro* имитирует процессы, происходящие в сенсibilизированном организме, и у исследователя имеется возможность зарегистрировать экспрессию маркеров дегрануляции на базофилах с помощью проточной цитофлуориметрии.

• См. главу «Медиаторы аллергической реакции», стр. 333





Примеры оценки дегрануляции базофилов с использованием различных комбинаций антител к поверхностным маркерам:

A – CRTH2/CD3/CD203c, B – antiIgE/CD63.

Для выделения популяции базофилов при анализе на проточном цитометре используют антитела к IgE, меченые флуорохромом. Также селекцию базофилов производят по экспрессии хемокинового рецептора CRTH2 и отсутствию маркера CD3. На рисунках представлены обе стратегии выделения популяции базофилов и оценки экспрессии маркеров дегрануляции.

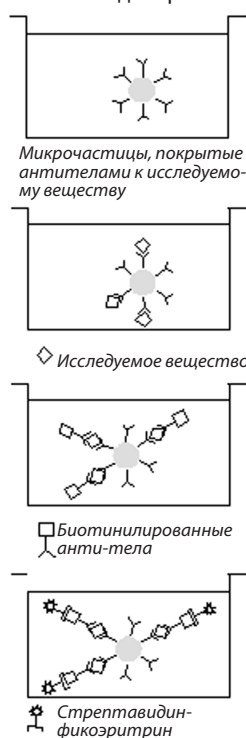
Современные производители наборов для оценки дегрануляции предлагают различные комбинации антител для фенотипирования активированных базофилов и обширный перечень аллергенов.

### Определение цитокинов в биологических жидкостях методом проточной цитофлуориметрии

В настоящее время оценка цитокинового статуса включает в себя определение концентрации ряда цитокинов в сыворотке или супернатанте культивированных клеток крови. Традиционно исследования цитокинов проводят методом ИФА, причем трудоемкость процесса и объем образца, необходимого для исследования, возрастает прямо пропорционально количеству исследуемых цитокинов. Это сильно ограничивает возможности методики и часто является причиной отказа лаборатории от постановки этого теста. Мультиплексная технология – очень перспективное направление в биологии. Она уже получила большое рас-

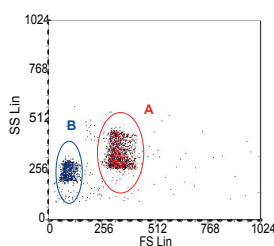
пространение в ПЦР-анализе и завоевывает ведущие позиции в проточной цитометрии. Мультиплексный анализ позволяет оценивать несколько растворимых аналитов одновременно в образце небольшого объема.

В основе метода – набор стандартных процедур иммуноферментного анализа. Антитела в данном случае сорбированы не в планшете, а на микрошариках. Частицы, покрытые антителами к различным цитокинам, отличаются друг от друга по размеру и интенсивности флуоресценции, что позволяет легко их идентифицировать в смеси при анализе на проточном цитофлуориметре. Смесь может содержать десятки видов частиц (в зависимости от количества исследуемых веществ). На первом этапе образец инкубируют с микрочастицами и биотинилированными антителами. Происходит связывание исследуемого вещества с соответствующими

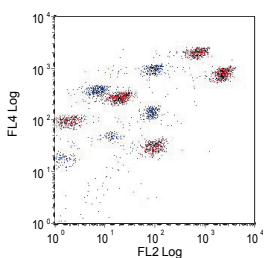


• См. главу «Мультиплексный анализ», стр. 480

антителами пропорционально его количеству. Затем образец и несвязавшиеся антитела удаляют путем отмывки и добавляют конъюгат стрептавидин-фикоэритрин. После инкубации и отмывки образцы анализируют на проточном цитофлуориметре. Концентрация исследуемого вещества пропорциональна интенсивности свечения фикоэритрина на соответствующей популяции микрошариков. Точные значения концентраций рассчитывают с помощью специального программного обеспечения (которое входит в состав набора) в соответствии с калибровочным графиком.



**Популяции микрошариков разных размеров: 4,4 мкм и 5,5 мкм.**



**Популяции микрошариков (с различной интенсивностью свечения на канале FL4), соответствующие 10 цитокинам. Интенсивность свечения на канале FL2 пропорциональна концентрации цитокина**

превалирование другого спектра цитокинов – ИЛ-2, -4, -10 и снижение ИФН-гамма, ИЛ-12p70 и т.д.

Мультиплексная технология позволяет сконструировать свою панель маркеров, наиболее значимых при данной патологии. С помощью комбинации симплексных наборов компании BenderMedSystems можно проанализировать до 20 аналитов на выбор в одном образце или использовать готовые мультиплексные наборы.

## Имунофенотипирование острых лейкозов

Диагностика острых лейкозов основывается на морфологических, цитохимических, а также фено-

типических особенностях бластных клеток. Острым лейкозам свойственно нарушение механизма нормальной дифференцировки и созревания кроветворных клеток, выражающееся в опухолевой трансформации и клональной пролиферации клеток-предшественников. В большинстве случаев острых лейкозов бласты имеют иммунофенотип, сравнимый с нормальными гемопоэтическими клетками аналогичных стадий дифференцировки. Таким образом, по набору поверхностных и внутриклеточных антигенов можно определить линейную принадлежность бластной клетки и соответствующую стадию дифференцировки.

В процессе дифференцировки клетки экспрессируют линейно-ассоциированные (дифференцировочные) антигены. Их экспрессия связана с определенной линией клеточной дифференцировки и сохраняется на протяжении всей жизни клетки. На основе наличия линейных маркеров различают основные группы острых лейкозов: Т-лимфобластные, В-лимфобластные и миелобластные. По экспрессии дифференцировочных антигенов лейкозы подразделяются на подтипы.

Кроме того, выделяют линейно нерестриктированные антигены, экспрессия которых не ограничена одной клеточной линией: CD34, TdT, HLA-DR, CD38.

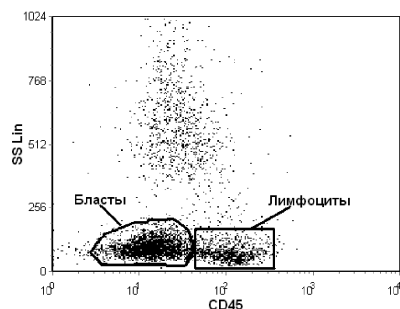
В соответствии с предложениями первой Европейской группы по иммунологической классификации лейкозов (EGIL, 1995) иммунологической фенотипирование острых лейкозов рекомендуется проводить в два этапа. На первом устанавливают линейность лейкоза (по экспрессии линейных маркеров), затем уточняют вариант и степень дифференцировки клеток.

Следует отметить, что нормальные дифференцировочные антигены могут обнаруживаться на злокачественных клетках в комбинациях, которые не выявляются в нормальном костном мозге (абберантный фенотип). К основным типам абберантности фенотипа лейкозных клеток относятся:

- Коэкспрессия антигенов нескольких линий.
- Отсутствие или низкий уровень экспрессии антигена, характерного для данной стадии дифференцировки.
- Асинхронная экспрессия антигена – одновременная экспрессия «раннего» и «позднего» антигенов, которые в норме находятся на разных этапах дифференцировки клеток.
- Избыточная экспрессия антигена.

При типировании лейкозов с помощью проточной цитофлуориметрии важным моментом является гейтирование бластов, т.к. при постановке диагноза учитывается фенотип чистой бластной популяции. Попадание в гейт бластов значительного количества

тва нормальных клеток искажает фенотипическую картину и затрудняет интерпретацию результатов цитометрического исследования.



**Пример обнаружения бластов по степени экспрессии панлейкоцитарного маркера CD45.**

Для выделения гейта бластов рекомендуется использовать цитограммы по боковому светорассеянию и экспрессии CD45. В процессе гемопоэза в костном мозге степень экспрессии общего лейкоцитарного маркера CD45 нарастает по мере созревания клеток. Таким образом, для бластов характерна низкая экспрессия этой молекулы, что и является главным критерием обнаружения бластной популяции. В некоторых ситуациях (например, при лимфобластных лейкозах) может оказаться более специфичным гейтирование по линейным маркерам CD19 или CD7. Применяется также гейтирование по параметрам светорассеяния (цитограммы FS-SS), т.к. при некоторых типах лейкозов бластные клетки отличаются небольшими размерами. Однако, даже теоретичес-

ки, не может быть определен вариант гейтирования, подходящий для всех вариантов злокачественной трансформации гемопоэтических клеток. Поэтому так важно иметь широкий выбор диагностических моноклональных антител для определения фенотипа злокачественных клеток в разных клинических ситуациях. После гейтирования бластов проводят подробное исследование их фенотипа, анализ полученной информации и постановку диагноза.

### Острые лимфобластные В-клеточные лейкозы (В-ОЛЛ)

В-ОЛЛ наиболее часто встречающиеся лейкозы. На основе иммунофенотипических признаков бластов выделяют 4 типа В-ОЛЛ: ОЛЛ из ранних В-клеток предшественников, пре-пре-В-тип (common), пре-В-клеточный вариант и В-клеточный ОЛЛ.

Первые два варианта ОЛЛ составляют от 65 до 70% всех случаев у детей и 50% у взрослых. Пре-В-клеточный ОЛЛ встречается реже (25% у детей), а ОЛЛ из зрелых В-клеток составляет 2-4% от ОЛЛ у детей. Для формы из зрелых клеток характерно наличие поверхностного IgM с рестрикцией легких цепей к или λ. Обнаружение того или иного типа цепей на мембране бластов служит доказательством клональной пролиферации.

### Острые лимфобластные Т-клеточные лейкозы (Т-ОЛЛ)

У взрослых Т-ОЛЛ составляет около 25% среди ОЛЛ, у детей – около 15%. На основе иммунофенотипических признаков бластов выделяют 4 типа Т-ОЛЛ:

Маркер	Про-В-лимфоцит	Пре-пре-В-клетка	Пре-В-клетка	Промежуточная В-клетка	Зрелый В-лимфоцит
Линейно-специфические	CD19				
	CD79				
	CD22	цитоплазматический			
Дифференцировочные	Ig	цитоплазматический			
	CD10				
	CD5				
Линейно неограниченные	HLA-DR				
	TdT				
	CD34				
Соответствующий ОЛЛ	ОЛЛ из ранних В-клеток -предшественников	Common ОЛЛ	Пре-В-клеточный ОЛЛ		В-клеточный ОЛЛ

**Классификация острых В-клеточных лейкозов по концепции соответствия фенотипа опухолевой клетки фенотипу нормальной клетки на определенной стадии дифференцировки.**

Маркер	Протимоцит	Претимоцит	Common (кортикальный) тимоцит	Зрелый тимоцит	Т-хелпер/Т-цитотксич.	Активированный Т-лимфоцит
Линейно-специфические	CD3		цитоплазматический			
	CD2					
	CD7					
Дифференцировочные	CD5					
	CD1a					
	CD4/CD8		CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>		CD4 <sup>+</sup> или CD8 <sup>+</sup>	
Линейно неограниченные	TdT					
	HLA-DR					
	CCD34					
ОЛЛ	Про-Т-тип ОЛЛ	Пре-Т-тип ОЛЛ	Кортикальный Т-тип ОЛЛ		Зрелый Т-Олл	

**Классификация острых В-клеточных лейкозов по концепции соответствия фенотипа опухолевой клетки фенотипу нормальной клетки на определенной стадии дифференцировки.**

про-Т-тип ОЛЛ, пре-Т-тип ОЛЛ, кортикальный Т-тип и зрелый Т-тип. Зрелый тип подразделяется в свою очередь на αβ и γδ-варианты, в зависимости от типа Т-клеточного рецептора.

### Острые миелобластные лейкозы (ОМЛ)

Бластные клетки при ОМЛ фенотипически соответствуют миелоидным предшественникам моноцитов, гранулоцитов и эритроцитов на разных этапах дифферен-

цировки, этим и объясняется многообразие форм этого типа лейкоза.

При ОМЛ установление иммунологического варианта имеет диагностическое значение в первую очередь для ОМЛ с минимальной миелоидной (M0), эритроидной (M6) и мегакариоцитарной (M7) дифференцировкой бластных клеток. Кроме того, при ОМЛ иммунологические маркеры бластов играют роль в прогнозе заболевания и могут учитываться при выборе терапевтической стратегии.

Подтип ОМЛ	Наиболее распространенный фенотип	Особенности
M0 – ОМЛ с минимальной миелоидной дифференцировкой бластов	MPO <sup>+</sup> , HLA-DR <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> , CD33 <sup>+</sup> , CD34 <sup>+</sup> , CD117 <sup>+</sup> , CD7 <sup>-/+</sup> , TdT <sup>+/+</sup>	Бласты – 90%, бластная популяция с низким значением SS и FS, возможна экспрессия лимфоидных маркеров: CD2, CD4, CD7, CD10
M1 – ОМЛ без созревания	MPO <sup>+</sup> , HLA-DR <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> , CD33 <sup>+</sup> , CD34 <sup>+</sup> (слабее, чем при M0), CD117 <sup>+</sup> , CD7 <sup>-/+</sup> , TdT <sup>+/+</sup> , CD15 <sup>-/+</sup>	Бласты – 90%
M2 – ОМЛ с созреванием	MPO <sup>+</sup> , HLA-DR <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> , CD33 <sup>+</sup> , CD117 <sup>+</sup> , CD34 <sup>+</sup> , TdT <sup>+/+</sup> , CD15 <sup>+</sup> , CD65 <sup>+/+</sup> , CD11b <sup>+/+</sup>	Бласты – 90%, возможна слабая экспрессия CD19
M3 – промиелоцитарный лейкоз	MPO <sup>+</sup> , HLA-DR <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> , CD33 <sup>+</sup> , CD34 <sup>-/+</sup> , CD117 <sup>-/+</sup> , CD15 <sup>+</sup> , CD2 <sup>-/+</sup>	Для бластов характерны высокие значения бокового светорассеяния (кроме формы CD2+HLA-DR-)
M4 – миеломонобластный лейкоз	MPO <sup>+</sup> , HLA-DR <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> , CD33 <sup>+</sup> , CD117 <sup>-/+</sup> , CD15 <sup>+</sup> , CD14 <sup>-/+</sup> , CD34 <sup>-/+</sup> , CD38 <sup>+</sup> , CD4 <sup>-/+</sup> , CD11b <sup>+/+</sup> , CD64 <sup>+</sup>	Экспрессия CD2 коррелирует с вариантом M4E0
M5 – монобластный лейкоз без созревания	MPO <sup>+</sup> , HLA-DR <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> , CD33 <sup>+</sup> , CD117 <sup>-/+</sup> , CD15 <sup>+</sup> , CD14 <sup>-/+</sup> , CD36 <sup>+</sup> , CD11b <sup>+/+</sup> , CD11c, CD4 <sup>-/+</sup>	Крупные бласты, возможна экспрессия CD56
M6 – эритромиелоз	MPO <sup>+</sup> , HLA-DR <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> , CD33 <sup>+</sup> , CD117 <sup>-/+</sup> , CD34 <sup>-/+</sup> , CD38 <sup>+</sup> , CD71 <sup>+</sup> , CD235 <sup>+</sup> (гликофорин A)	Не редко встречается экспрессия CD7
M7 – мегакариобластный лейкоз	MPO <sup>+</sup> , HLA-DR <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> , CD33 <sup>+</sup> , CD117 <sup>-/+</sup> , CD34 <sup>-/+</sup> , CD38 <sup>+</sup> , CD61 <sup>+</sup> , HLA-DR <sup>-/+</sup> , CD41 <sup>+</sup> , CD42b <sup>+</sup>	Прилипание тромбоцитов к бластам может исказить результаты исследования

**Фенотипическая характеристика подтипов острого миелобластного лейкоза (Jennings, Foop, 1997, дополненная)**



## ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Примеры панелей моноклональных антител Beckman Coulter для иммунофенотипирования острых лейкозов



### Пятицветная панель для проточного цитометра Cytomics FC500

#### Определение линейности

cyMPO FITC Kam.№ A07705					cyCD79a PE					cyCD3 ECD			CD45 PC5 Kam.№ A07785	
MPO+ – Миелоидный ОЛЛ					CD79a+ – В-линия					CD3+ – Т-линия				
FITC	PE	ECD	PC5	PC7	FITC	PE	ECD	PC5	PC7	FITC	PE	ECD	PC5	PC7
CD15	CD33	CD45	CD117	CD34	CD19	CD10	CD45	CD20	CD34	CD8	CD1a	CD3	CD7	CD4
Kam.№ A07721			IM2733	A07509	Kam.№ A07713			A07509	A07509	IM0102	A07742	A07748	IM3613	6607101
HLA-DR	CD13	CD45	CD2	CD56	cyIgM	–	CD45	cyCD22	–	TCR γδ	TCR αβ	CD3	–	–
Kam.№ A07720			A07745	A07508	733152	–	A07770	IM3704	–	IM1571	IM1467	A07748		
CD41	CD235	CD45	CD14	CD61	κ	λ	CD19	CD45	–					
Kam.№ A07723			A07765	IM3716	Kam.№ A07706			A07785	–					
CD65	CD16	CD45	CD64	CD4										
IM1654	A07766	A07784	IM3606	6607101										

Трехцветная панель для проточного цитометра, оснащенного лазером 488 нм и способного регистрировать не менее трех параметров флуоресценции (525 нм, 575-585 нм, 675-680 нм)

#### Определение линейности

MPO FITC Kam.№ IM1874			CD45 PE Kam.№ A07783			CD3 PC5 Kam.№ A07749		
CD22 FITC Kam.№ IM0779			CD45 PE Kam.№ A07783			CD79a PC5 Kam.№ IM3456		
MPO+ – Миелоидный ОЛЛ			CD79a+ – В-линия					
FITC	PE	PC5	FITC	PE	PC5	FITC	PE	PC5
CD34	CD45	CD117	CD34	CD45	CD19	CD34	CD45	CD7
IM1870	A07783	IM2733	IM1870	A07783	A07771	IM1870	A07783	IM3613
CD2	HLA-DR	CD33	CD20	CD10	CD19	CD8	CD1a	CD4
A07743	IM1639	IM2647	A07772	A07760	A07771	A07756	A07742	A07752
CD65	CD235	CD13	CD22	CD15	CD19	CD2	HLA-DR	CD7
IM1654	A07792	A07763	IM0779	IM1954	A07771	A07743	IM1639	IM3613
CD61	CD15	CD41	cyIgM	CD45	CD19	TCR γδ	TCR αβ	CD3
IM3605	IM1954	6607116	733152	A07783	A07771	IM1571	IM1467	A07749
CD14	CD64	CD4	κ	λ	CD19			
IM0645	IM3601	A07752	6604287	6604289	A07771			
CD16	CD42b	CD117						
IM0814	IM1417	IM2733						

## Иммунофенотипирование лимфопролиферативных заболеваний

Особенностью лимфопоза является способность клеток к опухолевой трансформации практически на всем пути клеточной дифференцировки. Это определяет многообразие лимфопролиферативных заболеваний (ЛПЗ). При иммунофенотипировании клеток пациентов иногда удается установить стадию дифференцировки, на уровне которой наступила онкогенная трансформация, но есть ряд ЛПЗ, при которых не найдены нормальные клеточные аналоги.

Британским комитетом по стандартам в гематологии (BCSH) разработаны рекомендации по иммунофенотипированию ЛПЗ и предложена, также как и для острых лейкозов, двухлинейная панель моноклональных антител.

На первом этапе проводится дифференциальная диагностика В-клеточных от Т- и НК-клеточных ЛПЗ. В зависимости от результатов первого этапа исследования и морфологии клеточных элементов проводят второй этап иммунофенотипирования, в ходе которого уточняется антигенный профиль патологических клеток

● Интенсивность мембранной экспрессии

**Первая линия** CD19, CD23, FMC7, Ig (κ или λ), CD22<sup>+</sup>, CD79b<sup>+</sup>, CD2, CD5

**Вторая линия**

1. CD11c, CD25, CD103 – при наличии отростчатых лимфоцитов
2. cytIg (κ или λ), CD79a, CD138 – заболевания с предполагаемой лимфоплазмочитарной или плазмноклеточной дифференцировкой
3. CD3, CD7, CD4, CD8, CD25 – Т-клеточные заболевания
4. Циклин D – при подозрении на лимфому из клеток зоны мантии и неклассифицируемые В-клеточные лимфомы

**Этапы проведения иммунофенотипирования в диагностике лимфопролиферативных заболеваний**

## Фенотипирование субпопуляций лимфоцитов

Фенотипирование лимфоцитов является диагностически значимым при первичных или приобретенных иммунодефицитах, лейкозах и ЛПЗ. Под фенотипом подразумевают совокупность поверхностных рецепторов, связанных с разными этапами развития и определяющих популяционную принадлежность клетки.

Прогрессивное уменьшение количества CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов является одним из маркеров ВИЧ-инфекции и обуславливает развитие вторичных заболеваний. Мониторинг количества CD4<sup>+</sup> клеток – один из главных критериев оценки прогрессирования заболевания и эффективности высокоак-

## ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА



Примеры панелей моноклональных антител для иммунофенотипирования лимфопролиферативных заболеваний

Пятицветная панель для проточного цитометра Cytomics FC500

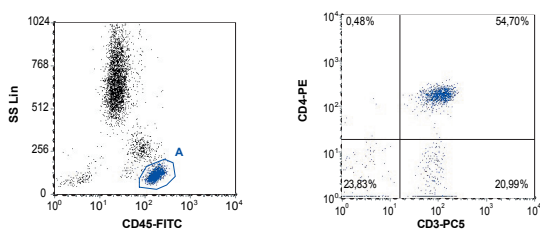
FITC	PE	ECD	PC5	PC7
CD3 <i>Kam.№ A07735</i>	CD16+56	CD19 <i>Kam.№ A07770</i>	CD2 <i>Kam.№ A07745</i>	CD5 <i>Kam.№ IM3627</i>
FMC7 <i>Kam.№ A07709</i>	CD23	CD19	CD38 <i>Kam.№ A07780</i>	CD5 <i>Kam.№ IM3627</i>
CD43 <i>Kam.№ IM3264</i>	CD79b <i>Kam.№ IM1612</i>	CD19 <i>Kam.№ A07770</i>	CD20 <i>Kam.№ A07509</i>	CD10 <i>Kam.№ A07761</i>
CD103 <i>Kam.№ A07712</i>	C11c	CD19	CD25 <i>Kam.№ IM2646</i>	CD5 <i>Kam.№ IM3627</i>
κ <i>Kam.№ A07706</i>	λ	CD19	CD22 <i>Kam.№ IM3704</i>	–
CD8 <i>Kam.№ IM0102</i>	CD7 <i>Kam.№ IM1429</i>	CD3 <i>Kam.№ A07748</i>	CD25 <i>Kam.№ IM2646</i>	CD4 <i>Kam.№ 6607101</i>

Трехцветная панель для проточного цитометра, оснащенного лазером 488 нм и способного регистрировать не менее трех параметров флуоресценции (525 нм, 575-585 нм, 675-680 нм)

FITC	PE	PC5
CD2 <i>A07743</i>	CD5 <i>A07753</i>	CD19 <i>A07771</i>
CD2 <i>A07743</i>	CD56 <i>A07788</i>	CD3 <i>A07749</i>
CD23 <i>IM0529</i>	CD5 <i>A07753</i>	CD19 <i>A07771</i>
CD22 <i>IM0779</i>	CD79b <i>IM1612</i>	CD19 <i>A07771</i>
CD43 <i>IM3264</i>	CD38 <i>A07779</i>	CD19 <i>A07771</i>
CD20 <i>A07772</i>	CD10 <i>A07760</i>	CD19 <i>A07771</i>
κ <i>6604287</i>	λ <i>6604289</i>	CD19 <i>A07771</i>
CD103 <i>IM1856</i>	CD25 <i>A07774</i>	CD19 <i>A07771</i>
CD103 <i>IM1856</i>	CD11c <i>IM1760</i>	CD19 <i>A07771</i>

тивной противоретровирусной терапии (ВААРТ). В настоящее время для повышения точности оценки количества CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов с помощью проточной цитофлуориметрии рекомендуется:

- Безотмывочная технология приготовления проб.
- 3- или 4-цветный анализ с гейтированием по маркеру CD45.
- Одноплатформенная технология подсчета абсолютного количества клеток (с использованием специальных счетных частиц).



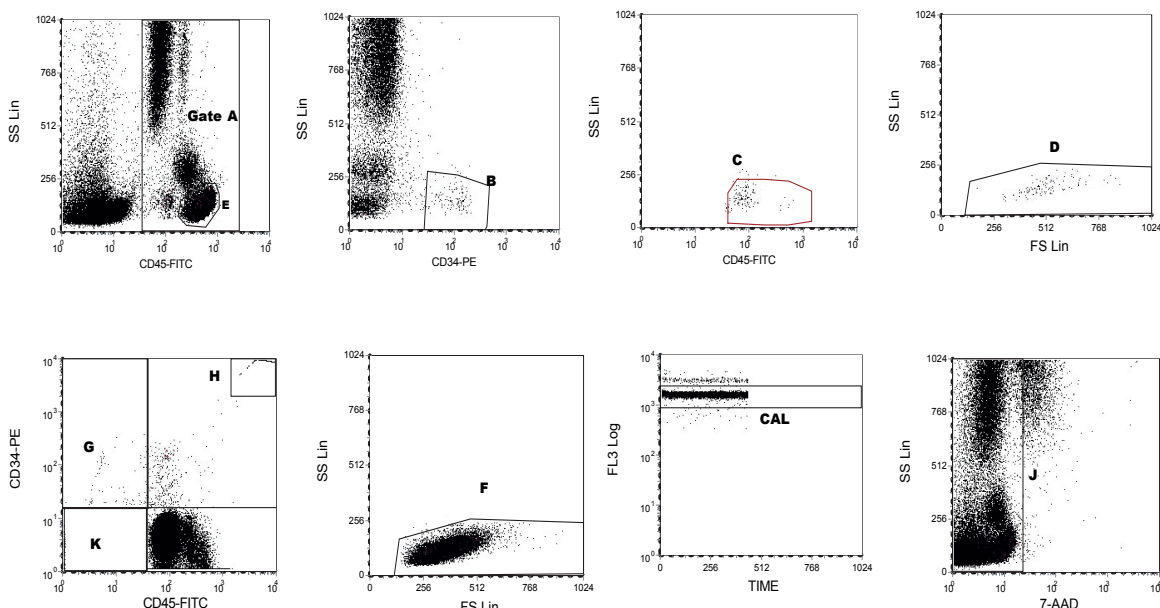
Пример гейтирования по экспрессии CD45 и оценка CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток.

Исследование поверхностных маркеров лимфоцитов при заболеваниях, не связанных с классифицированными иммунодефицитами или онкогематоло-

гией, не является диагностически значимым, однако позволяет оценивать распространенность, тяжесть заболевания и патогенетические особенности воспалительного процесса, прогнозировать развитие патологии. Наиболее часто оценивают экспрессию маркеров основных субпопуляций лимфоцитов: CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19. Также исследуют экспрессию маркеров активации Т-лимфоцитов – CD25 и HLA-DR. Повышение экспрессии этих молекул может наблюдаться при воспалительных процессах. Среди CD25<sup>+</sup> лимфоцитов находится популяция регуляторных Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> с яркой экспрессией CD25), которые играют важную роль в регуляции воспаления. Отмечено снижение количества этих клеток при аутоиммунных заболеваниях, у больных СПИД. При инфекционном воспалении, связанном с разрушением собственных тканей, численность регуляторных Т-клеток возрастает.

### Подсчет гемопоэтических стволовых клеток

Мультипараметрическая проточная цитометрия позволяет быстро и качественно проводить количественное определение гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в костном мозге, периферической и пу-



Анализ продукта афереза, выполнен на проточном цитометре Beckman Coulter® EPICS™ XL™ с использованием набора Stem Kit Reagents (кат.№ IM3630) и стратегии наложения гейтов в соответствии с рекомендациями ISHAGE.

повинной крови, продукте афереза мононуклеаров. Содержание ГСК в трансплантате при планировании аутологичной и аллогенной, родственной и неродственной трансплантации стандартно осуществляется методом проточной цитометрии согласно рекомендациям International Society of Chemotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) и основана на выявлении CD34+ клеток среди других жизнеспособных ядродержащих клеток гематогенного происхождения (CD45+). При использовании проточной цитометрии количественное определение ГСК осуществляется за счет выделения клеточных популяций методами программного обеспечения (логического ограничения или гейтирования). В основе рекомендаций ISHAGE лежат следующие критерии идентификации гемопоэтических клеток-предшественников человека (Sutherland D.R., Anderson L. et al., J. Hematotherapy, 5:213-226, 1996):

- экспрессируют CD34
- экспрессируют CD45 с интенсивностью, характерной для бластных клеток

- демонстрируют низкое боковое светорассеяние, а переднее – от низкого к среднему, также характерные для бластных клеток

Компания Beckman Coulter производит набор для идентификации и подсчета гемопоэтических клеток предшественников по одноплатформенной технологии – Stem Kit Reagents, а также реагент для контроля качества исследований Stem-Trol Control Cell, который содержит лиофилизированную культуру CD34+ клеток, сходных по характеристикам с ГСК. Стратегия наложения гейтов, применяемая для набора Stem Kit Reagents, полностью соответствует руководствам ISHAGE по определению CD34-позитивных клеток методом проточной цитофлуориметрии. Набор обеспечивает высокое качество и удобство выполнения анализа и содержит все необходимое для исследования:

- CD45-FITC/CD34-PE – 1 фл., 50 тестов
- CD45-FITC/IsoClonic Control-PE, 1 фл., 50 тестов
- Витальный краситель 7AAD
- Лизирующий раствор NH4Cl
- Stem-Count™ Fluorospheres

## ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА



### Реагенты для исследования апоптоза производства Beckman Coulter

Кат.№	Название	Конъюгат
IM2088	Мышиные антитела к APO2.7 человека, 100 тестов	PE
IM2660	Мышиные антитела к APO2.7 человека, 100 тестов	PC5
A24067	Polyclonal-Cleaved Caspase-3 (Asp175), 0,5 мл	Alexa Fluor®488
MHCD95L04	Мышиные антитела к CD95L человека, 100 тестов	R-PE
MHCD95L05	Мышиные антитела к CD95L человека, 100 тестов	APC
IM1506	Мышиные антитела к CD95 человека, 50 тестов	FITC
IM1739	Мышиные антитела к CD95 человека, 50 тестов	PE
IM2375	Annexin V kit, 20 тестов	FITC
IM3546	Annexin V kit, 200 тестов	FITC
IM3171	Apoptosis Mebstain Kit (dUTP-FITC)	
731721	Мышиные антитела к Bcl-xL человека, 0,1 мг	FITC
731723	Мышиные антитела к Bcl-xL человека, 0,1 мг	PE
IM2041	Мышиные антитела к Вах человека, 0,1 мг	Purified

### Антитела к цитокинам, Beckman Coulter

Кат.№	Наименование
IM2616	Anti-IFN-gamma-FITC, 100 тестов
IM2617	Anti-IFN-gamma-PE, 100 тестов
IM2718	Anti-IL2-PE, 100 тестов
IM2719	Anti-IL4-PE, 100 тестов
A07802(3)	IntraPrep – реагент для пермеабилзации клеток, 50 (150) тестов

### Наборы для оценки дегрануляции базофилов и перечень поставляемых аллергенов

Кат.№	Наименование	Состав набора:
Beckman Coulter A17116	Allergenicity Kit, 100 тестов	Антитела CRTH2-FITC/CD203c-PE/CD3-PC7 – 1 фл., 2 мл Положительный контроль – 1 фл. (0,2 мг) Активирующий раствор (с солями Ca2+) – 2 фл. (2 x 5 мл) Стоп-раствор – 1 фл. (10 мл) Лизирующий раствор – 3 фл. (3 x 100 мл) Фиксирующий раствор – 1 фл. (10 мл)

Кат.№	Наименование	Состав набора:
Bühlmann Laboratories	FK-BAT FLOW-CAST, 100 тестов	Антитела анти-IgE-FITC/CD63-PE – 1 фл., 2,2 мл Положительный контроль(anti-FcεRI) – 1 фл. (лиоф.) Активирующий раствор (с гепарином и ИЛ-3) – 1 фл. (лиоф.) Блокирующий буфер – 2 фл. (100 мл) Лизирующий раствор – 1 фл. 10-кратный (40 мл)

**Перечень аллергенов**

нестероидные противовоспалительные средства	антибиотики (различных групп)
анестетики	миорелаксанты
пищевые консерванты и улучшители вкуса	пищевые продукты
грибковые аллергены	эпителий кошек, собак
пыльца растений	клещевые аллергены; аллергены насекомых

**Симплексные и мультиплексные наборы компании BenderMedSystem**

для детекции цитокинов и молекул адгезии человека. Формат наборов: 96-лун. планшет

Кат №	Название теста	Кат №	Название теста
BMS219FF	sP-selectin	BMS8224FF	IL-1β
BMS232FF	sVCAM-1	BMS8221FF	IL-2
BMS239FF	sCD40L	BMS8225FF	IL-4
BMS258FF	t-PA	BMS8278FF	IL-5
BMS281FF	MCP-1	BMS8213FF	IL-6
BMS8201FF	sICAM-1	BMS8204FF	IL-8
BMS8205FF	sE-selectin	BMS8215FF	IL-10
BMS8218FF	sICAM-3	BMS8231FF	IL-13
BMS8219FF	sP-selectin	BMS8267FF	IL-18
BMS8229FF	sPECAM-1	BMS8216FF	IFN-α
BMS8232FF	sVCAM-1	BMS8228FF	IFN-γ
BMS8238FF	IL-12p70	BMS8223FF	TNF-α
		BMS8202FF	TNF-β

BMS711FF	Набор для определения кардиоваскулярных маркеров (sCD40L, IL-6, IL-8, MCP-1, sP-selectin, t-PA, sVCAM-1)
BMS810FF	Набор для определения 11 цитокинов Th1/Th2 (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF-α, TNF-β, IFN-γ)
BMS812FF	Набор для определения 6-ти молекул адгезии (sE-Selectin, sICAM-1, sICAM-3, sPECAM-1, sP-Selectin, sVCAM-1)
BMS8420FF	Базовый набор для определения цитокинов (не требуется для мультиплексных наборов)
BMS8421FF	Базовый набор для определения молекул адгезии (не требуется для мультиплексных наборов)

**Антитела к основным маркерам субпопуляций лимфоцитов, Beckman Coulter:**

Кат.№	Название	Кат.№	Название
A07738	CD45-FITC/CD14-PE, 50 тестов	6607015	CD45-FITC/CD4-PE/CD3-PC5, 50 тестов
A07733	CD3-FITC/CD4-PE, 50 тестов	6607017	CD45-FITC/CD8-PE/CD3-PC5, 50 тестов
A07734	CD3-FITC/CD8-PE, 50 тестов	6607072	CD45-FITC/CD19-PE/CD3-PC5, 50 тестов
A07736	CD3-FITC/CD19-PE, 50 тестов	6607071	CD45-FITC/CD56-PE/CD3-PC5, 50 тестов
A07735	CD3-FITC/CD(16+56)-PE, 50 тестов	6607013	CD45-FITC/CD4-PE/CD8-ECD/CD3-PC5, 50 тестов
A07737	CD3-FITC/HLA-DR-PE, 50 тестов	6607073	CD45-FITC/CD56-PE/CD19-ECD/CD3-PC5, 50 тестов

**Реагенты Beckman Coulter**

Кат. №	Название
IM3630	Stem-Kit Reagents, 50 тестов
IM3632	Stem-Trol Control Cells, 10 тестов
IM1870	Моноклональные антитела к CD34-FITC, 100 тестов
A07776	Моноклональные антитела к CD34-PE, 100 тестов
IM2709U	Моноклональные антитела к CD34-ECD, 100 тестов
IM2472	Моноклональные антитела к CD34-APC, 100 тестов
A07777	Моноклональные антитела к CD34-PC5, 100 тестов
A07509	Моноклональные антитела к CD34-PC7, 100 тестов