

## ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОПУЛЯЦИОННОГО СПЕКТРА ИММУННЫХ КЛЕТОК КРОВИ И СЛЮНЫ У ЗДОРОВЫХ МОЛОДЫХ ЛЮДЕЙ

Э.Х. Рахматулина\*, С.Н. Теплова\*\*, С.А. Коченгина\*\*\*, Н.Д. Альтман\*\*

\*Уральское отделение Российской Академии наук,

\*\*Челябинская государственная медицинская академия,

\*\*\*Челябинская детская областная больница, г. Челябинск

Изучен популяционный состав иммуноцитов слюны на основе авторского метода цитофлуориметрического анализа клеток, экспрессирующих линейный дифференцировочный рецептор CD45<sup>+</sup>. Показаны принципиальная возможность применения данного метода для оценки мукозального иммунитета. Результаты цитофлуориметрического анализа состава иммуноцитов слюны предлагается использовать в качестве нормативных при изучении мукозального иммунитета у молодых лиц.

*Ключевые слова:* мукозальный иммунитет, спектр иммуноцитов слюны, цитофлуориметрический анализ.

**Введение.** В настоящее время метод проточной цитофлуориметрии является общепринятым для определения популяционного и субпопуляционного спектра лимфоцитов крови. До сих пор этот метод не применялся для оценки спектра иммуноцитов слюны. Особенностью современных аппаратных методов иммунологического анализа является их высокая специфичность и чувствительность, возможность регистрации большого числа событий, что позволяет анализировать состав клеток при небольшом их количестве в единице объема изучаемой биологической жидкости [4].

Авторами данной публикации разработан метод определения спектра иммунных клеток слюны (номер патентной заявки 2008120724, приоритет от 23.05.08).

Целью настоящего исследования было цитофлуориметрическое определение популяционного спектра иммунных клеток крови и слюны у молодых лиц, проживающих на Южном Урале.

**Материалы и методы исследования.** Всего в исследование включено 42 здоровых человека в возрасте от 18 до 30 лет. Средний возраст обследуемых 20,5 года, женщин было 13 человек, мужчин 29. У 11 человек определяли популяционный спектр лимфоцитов крови. Мужчин в группе было 4 и женщин 7 человек, средний возраст составил 20 лет.

Критериями включения служили:

– постоянное проживание в регионе Южного Урала;

– возраст от 18 до 21 лет;

– отсутствие острых или обострений хронических заболеваний;

– отсутствие иммунопатологии;

– отсутствие заболеваний слизистой оболочки ротовой полости.

Критерий исключения:

– несанированные заболевания зубов.

Осмотр ротовой полости стоматологом проводился непосредственно перед взятием исследуемого материала. Слюну забирали у здоровых лиц в соответствии с критериями включения и исключения, принятыми в данной работе. Забор слюны проводили утром натощак, через 10 минут после полоскания ротовой полости водой в сухие пластиковые флаконы без стимуляции слюноотделения. Кровь для анализа популяционного состава лимфоцитов забирали из вены утром натощак.

**Иммунологические методы исследования:**

Определение спектра лимфоцитов крови проводили по стандартной методике на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II с набором моноклональных антител той же фирмы. Подготовка исследуемой слюны и определение клеточного состава иммуноцитов с помощью проточного цитофлуориметра «BD FACSCanto II» проводилось по методике, разработанной С.Н. Тепловой, С.А. Коченгиной, Э.Х. Рахматуллиной и др. (2008). Характерной чертой клеточного состава слюны является присутствие в ней не только иммунных клеток, но и эпителиоцитов. Для отличия иммунных клеток от эпителиоцитов использовали линейный дифференцировочный CD45<sup>+</sup> маркер. Другой особенностью клеточного состава слюны является присутствие в ней большого числа нежизнеспособных клеток и клеточного детрита, что требует специальной подготовки проб с помощью отмывочной технологии с использованием специальной среды (RPMI с бикарбонатом).

Определение популяционного спектра жизнеспособных иммуноцитов в слюне, экспрессирующих линейный CD45<sup>+</sup> мембранный антиген, проводили

на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II. Для оценки жизнеспособности клеток использовали витальный краситель 7-AAD. Для анализа CD-маркеров применяли моноклональные антитела фирмы Becton Dickinson, серии MultiTest с использованием четырех меток следующими флуоресцентными красителями: Fluorescein izotyocyanat (FITC), Phycoerytrin (PE), Perpidin chlorofhyll protein (PerCP), Allophycocyanin (APC). Использовался оптимизированный лизирующий раствор той же фирмы в рабочем разведении. Во всех случаях проводилась постановка негативного изотипического контроля [6].

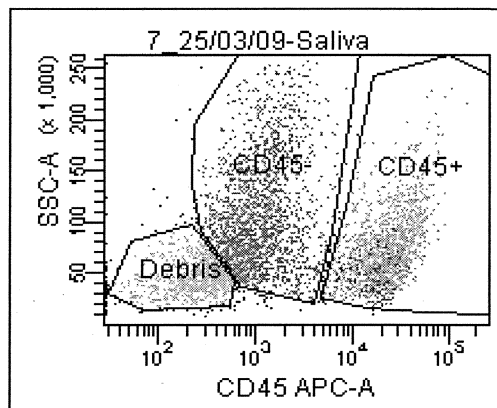
Число жизнеспособных клеток, экспрессирующих общелейкоцитарный линейно-ассоциированный дифференцировочный антиген CD45<sup>+</sup>, определяли с помощью метки CD45APC и красителя 7-AAD. Среди популяций иммунных клеток подсчитывали: гранулоциты (CD45<sup>+</sup> CD13<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup>), моноциты (CD45<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD13<sup>-</sup>), Т-цитотоксические лимфоциты (CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>), Т-хелперы (CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>), НК-клетки (CD45<sup>+</sup> CD 56<sup>+</sup> 16<sup>+</sup>) [5].

Статистическая обработка проведена применением программного комплекса Statistica for Windows версия 6.0 фирмы StatSoft Inc. (США). В таблицах представлены данные в виде средней арифметической (M), доверительного интервала (I<sub>95</sub>) универсальной средней – медианы (Me) и межквартильного интервала (Q<sub>25</sub>–Q<sub>75</sub>).

**Результаты и обсуждение.** Полученные результаты определения основных популяций лимфоцитов крови у обследуемых здоровых молодых лиц, проживающих на Южном Урале, представлены в табл. 1, в которой приведены общее число наблюдений (n), средняя арифметическая (M) и

ний этих показателей во всех случаях перекрывают друг друга [1].

Нами впервые разработан и использован метод цитофлуориметрической оценки иммунных клеток слюны.



Клеточный состав слюны: иммунные (CD45<sup>+</sup>), эпителиальные и другие клетки (CD45<sup>-</sup>), клеточный детрит (дебрис)

Рисунок демонстрирует результат цитофлуориметрического определения всей совокупности клеток слюны. Как следует из рисунка, в ротовой полости обнаруживаются в максимальном количестве CD45<sup>-</sup> клетки, к которым относятся в основном эпителиоциты. В большом количестве в слюне представлены клетки, экспрессирующие линейный дифференцировочный маркер CD45<sup>+</sup>, включающие все иммунные клетки: гранулоциты, макрофаги, популяции лимфоцитов. Достаточно большую область на графике занимает клеточный детрит, т.е. фрагменты разрушенных клеток ротовой полости.

Таблица 1

Результаты цитофлуориметрического определения спектра лимфоцитов крови у молодых людей, проживающих на Урале

Показатель	n	M	I <sub>95</sub>	Me	Q <sub>25</sub> –Q <sub>75</sub>
CD3 %	11	74	68,5–77,3	72,7	69,6–78,1
CD4 %	11	43	37,2–48,3	47,4	37,4–49,4
CD8 %	11	28	19,3–47,8	26,2	23,15–35,5
CD4/CD8	11	1,6	1,22–2,12	2,0	1,1–2,0
CD19 %	11	11	9,3–13,9	10,95	9,48–14,3
CD(16+56+) %	11	12	7,87–16,7	11,3	7,2–17,7

интервал достоверности (I<sub>95</sub>), а также медиана (Me) и интерквартильный размах (Q<sub>25</sub>–Q<sub>75</sub>).

Далее для сопоставления полученных данных с результатами других авторов в табл. 2 приведены материалы цитофлуориметрического определения спектра лимфоцитов крови, опубликованные разными исследователями из разных регионов, вместе с полученными нами показателями.

Как следует из табл. 2, процентное содержание основных популяций лимфоцитов крови (CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/56) при цитофлуориметрическом определении, по данным разных лабораторий, практически совпадает, интервалы колеба-

Далее в слюне было определено число жизнеспособных CD45<sup>+</sup> клеток (табл. 3) с помощью красителя 7-AAD.

Средние показатели численности популяций жизнеспособных иммунных клеток в слюне (средняя арифметическая и интервал достоверности, а также медиана и квартильный размах), у 42 молодых людей, которые были определены с помощью проточной цитофлуориметрии, приведены в табл. 3. Среди жизнеспособных CD45<sup>+</sup> клеток преобладающими в слюне здоровых молодых людей были популяции лейкоцитов, экспрессирующих маркеры гранулоцитов (CD45<sup>+</sup> CD13<sup>+</sup>), количество кото-

Таблица 2  
Сопоставление результатов цитофлюориметрического определения спектра иммунных клеток крови у молодых людей Южно-Уральского региона с результатами других исследователей

Показатель	Интервал колебаний показателей	Интервал колебаний показателей	Интервал колебаний показателей	Интервал колебаний показателей
CD3%	56–86	60–80	59–85	63–82
CD4%	33–58	33–50	29–57	29–53
CD8%	13–39	16–39	11–38	18–43
CD4/CD8	1,4–2,5	1,2–2,0	1,5–2,6	1,22–2,12
CD19%	5–22	5–22	6,4–23	7–18
CD (16+56) %	5–26	–	5,6–31	5–22
CD16%	–	3–20	–	–
CD56%	–	5–25	–	–
Литературный источник	Laurence J., et al., 1993 [8]	Луговская С.А. и др., 2005 [2]	Kretowski A., et al., 1999 [7]	Данные настоящего исследования

рых было равно 80,95 %. Достаточно представительной была популяция макрофагов (CD45<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>), медиана которой составила 20,65 % от жизнеспособных иммунных клеток. Минимальной была доля лимфоцитов в слюне, процент которых составлял 0,8 от общего количества жизнеспособных CD45<sup>+</sup> клеток.

Распределение субпопуляций лимфоцитов оценивалось в пределах общей популяции жизнеспособных лимфоцитов, число которых принималось за 100 %. Оказалось, что доля Т – лимфоцитов (CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>) в слюне составила 19,5 %, Т хелперов (CD45<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) – 19,7 %, Т цитотоксических клеток (CD45<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) – 0,65 %. Соотношение Т – хелперов и Т – цитотоксических клеток было равным 30,3. Число В-лимфоцитов (CD45<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup>) равным 2,01 % [3].

В целом, общая закономерность распределения лимфоцитов в слюне напоминает распределение соответствующих субпопуляций в крови: максимально в изучаемой биологической жидкости представлены Т лимфоциты, из них Т хелперы и в меньшей степени Т цитотоксические клетки и В лимфоциты. Особенностью популяционного состава лимфоцитов слюны является более низкое содержание Т клеток и Т хелперов, чем в крови, очень низкое количество Т цитотоксических лимфоцитов и соответственно высокий иммунорегуляторный индекс – соотношение CD4/CD8 клеток, достигающий 30,3.

Таким образом, в настоящее время в иммунологии стандартным методом оценки системного

Таблица 3  
Спектр иммунных клеток слюны у молодых людей, проживающих на Южном Урале (n = 42)

Показатель	M	I <sub>95</sub>	Me	(Q <sub>25</sub> –Q <sub>75</sub> )
Число жизнеспособных CD45 <sup>+</sup> клеток в % от общего числа клеток слюны	49,3	37,4–61,2	48,2	38,7–58,7
CD45 <sup>+</sup> CD13 <sup>+</sup> в % от общего числа жизнеспособных CD45 <sup>+</sup> клеток слюны	74,41	52,00–95,00	80,95	61,00–93,10
CD45 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup> в % от общего числа жизнеспособных CD45 <sup>+</sup> клеток слюны	20,3	9,6–40,0	20,3	19,1–21,0
Число лимфоцитов в % от общего числа жизнеспособных CD45 <sup>+</sup> клеток слюны	0,8	0,2–3,6	0,6	0,2–1,3
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> в % от общего числа жизнеспособных лимфоцитов слюны	17,8	17,6–20,0	19,5	19,2–19,7
CD45 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> в % от общего числа жизнеспособных лимфоцитов слюны	15,6	13,2–20,0	19,7	17,4–19,8
CD45 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> в % от общего числа жизнеспособных лимфоцитов слюны	1,1	0,50–2,20	0,65	0,08–1,48
CD4/CD8 в % от общего числа жизнеспособных лимфоцитов слюны	13,9	9,0–26,4	30,3	13,3–217,5
CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> в % от общего числа жизнеспособных лимфоцитов слюны	2,2	1,0–4,0	2,0	1,5–2,4
CD45 <sup>+</sup> CD(16+56 <sup>+</sup> ) в % от общего числа CD45 <sup>+</sup> жизнеспособных клеток слюны	5,6	1,4–14,6	1,8	1,1–11,5

иммунитета является определение показателей крови, для чего используются самые современные технологии, включая метод проточной цитофлуориметрии для анализа популяционного состава лимфоцитов крови [9]. Этот метод до сих пор не нашел широкого применения для оценки спектра иммуноцитов других биологических жидкостей организма, в частности для анализа клеточного состава слюны. В то же время изучение особенностей мукозального иммунитета, содержания иммуноцитов в секретах, омывающих слизистые оболочки, которые являются основными входными воротами для поступления различных микробных агентов в организм, представляет теоретический и практический интерес, т.к. имеются топические особенности ответа мукозоассоциированной лимфоидной ткани на различные антигены. Изучение этих особенностей делает необходимым разработку аппаратных методов анализа клеточного и молекулярного состава различных биологических жидкостей. В данной статье приведено содержание иммуноцитов в крови и в слюне молодых людей, проживающих на Южном Урале, по материалам проточной цитофлуориметрии слюны, что можно использовать в качестве норм для оценки иммунных параметров слюны.

#### Литература

1. Зуева, Е.Е. Иммунофенотипирование в диагностике острых лейкозов / Е.Е. Зуева // *Российский медицинский журнал*. – 2003. – Т. 4. – С. 471–478.

2. Луговская, С.А. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов / С.А. Луговская, М.Е. Почтарь, Н.Н. Тупицин. – М., 2005.

3. Симонова, А.В. Фенотип лимфоцитов крови при воспалительных заболеваниях человека / А.В. Симонова. – М.: ИНТО, 2001.

4. Чередеев, А.Н. CD-маркеры в практике клинико-диагностических лабораторий / А.Н. Чередеев, Н.К. Горлина, И.Г. Козлов // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 1999. – № 6. – С. 25–31.

5. Flow cytometry analysis of OKT4 epitope deficiency in South African children / E.J. Hughes, E.A. Goddard, P. Bouic, D.W. Beatty // *Clin Exp Immunology*. – 1994. – №98 (3). – P. 526.

6. *Immunobiology*, 6-th edition // Garland Science. – New York and London, 2005.

7. Analysis of recently activated, memory and naïve lymphocyte T subsets in the peripheral blood of patients with Graves' disease and insulin-dependent diabetes mellitus / A. Kretowski, J. Mysliwiec, D. Turowski, I. Kinalska // *Rocz Akad Med Bialymst.* – 1999. – V. 44. – P. 226–234.

8. Laurence, J. T-Cell subsets in Health, Infectious Disease, and Idiopathic CD 4<sup>+</sup> T Lymphocytopenia / J. Laurence // *Annals of Internal Medicine*. – 1993. – V. 119 (1). – P. 55–62.

9. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians / T. Reichert, M. De Bruyere, V. Deneys et al. // *Clin Immunol Immunopathol.* – 1991. – V. 60. – P. 190–208.

Поступила в редакцию 18 декабря 2009 г.