

<sup>1</sup> Институт химической кинетики и горения СО РАН  
ул. Институтская, 3, Новосибирск, 630090, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет  
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия

<sup>3</sup> ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора  
Кольцово, Новосибирская обл., 630559, Россия

E-mail: sdi@ngs.ru

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОЛИ Т-ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ПО СВЕТОРАССЕЯНИЮ \*

В работе продемонстрированы возможности светорассеяния в определении доли Т-лимфоцитов в периферийной крови человека. Анализ лимфоцитов проводился на сканирующем проточном цитометре с одновременным измерением светорассеяния и специфической флуоресценции одиночных клеток. Флуоресценция была вызвана излучением флуорохрома, связанного с моноклональным антителом, специфичным к определенному типу лимфоцитов. Анализ особенностей светорассеяния лимфоцитами различных типов позволил выявить зависимость асимметрии распределения параметров светорассеяния лимфоцитов от доли Т-лимфоцитов в пробе. Метод обеспечил определение доли Т-лимфоцитов в крови с ошибкой не хуже чем 4,5 %. Анализ по предложенной нами методике занимает 10–15 минут, в то время как иммунофлуоресцентный анализ занимает десятки минут. Таким образом, разработанный нами метод развивает потенциал сканирующей проточной цитометрии в проведении общего гематологического анализа.

*Ключевые слова:* проточная цитометрия, обратная задача светорассеяния, индикатриса светорассеяния, Т-лимфоциты

### Введение

В составе крови человека имеется большое количество клеток, и решающую роль для иммунитета среди них играют особые клетки крови, к которым относятся Т-, В- и недифференцированные лимфоциты. Они выполняют различные функции в системе иммунитета. В частности, Т-лимфоциты способны отличать клетки своего организма от чужеродных, после чего они координируют действие других клеток крови для реализации иммунного ответа, т. е. для защиты организма от микробных и других повреждающих факторов [1].

За последние 50 лет наблюдается неуклонное увеличение частоты врожденных и приобретенных иммунодефицитных состояний, чему способствует глобальное распространение некоторых вирусных инфекций и серьезное ухудшение экологической ситуа-

ции. Большинство иммунодефицитов связано с нарушением деятельности иммунокомпетентных клеток крови, и особенно Т-лимфоцитов. По мере прогрессирования иммунодефицитного заболевания качество Т-лимфоцитов в крови снижается, и их количество меняется. Вследствие всего этого организм постепенно утрачивает способность защищаться от окружающих его микроорганизмов, вызывающих воспаление, последствия которого могут быть фатальными. Оценка количественных показателей клеточного иммунитета у больных при динамическом наблюдении в процессе терапии может быть использована для определения возможных вариантов течения заболевания и подбора оптимальных иммунокорректирующих средств [2].

В настоящее время существует лишь несколько методик исследования субпопуляций лимфоцитов. Световая и электронная мик-

\* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 07-04-00356) в рамках интеграционных проектов Сибирского отделения РАН № 2006-3, 2006-14.

роскопия позволяет измерять несколько параметров клеток напрямую [3]. Но изучение лимфоцитов под световым, электронным или конфокальным микроскопами требует довольно сложной пробоподготовки, поэтому эти методики занимают относительно много времени для определения параметров лимфоцита (например, размера клетки и ядра). По этой же причине измерение большого числа лимфоцитов затруднительно, поэтому результаты, получаемые названными методиками, статистически недостоверны. Также существует проблема, связанная с тем, что в процессе процедуры пробоподготовки у лимфоцитов меняются размеры. Это происходит из-за того, что в мазке лимфоциты имеют более сплюснутую форму, чем во взвеси [4]. Поэтому известные данные по размеру, например, лейкоцитов весьма противоречивые.

Методы турбидиметрии и нефелометрии основаны на анализе светорассеяния от ансамбля частиц, в отличие от проточной цитометрии, которая анализирует рассеянный свет от одиночных частиц [5]. Но эти методы не позволяют определить некоторые параметры (например, показатель преломления ядра), влияющие на светорассеяние.

Методика Култера [6; 7] определяет объем клетки и концентрацию клеток в суспензии. Данные, полученные счетчиком Култера, очень полезны во многих отношениях [7]. Однако электрический сигнал таких счетчиков не имеет прямого отношения к объему клетки [8]. Более того, объем ядра клетки, измеренный счетчиком Култера, может значительно отличаться от данных, полученных путем анализа изображений клеток [9]. Кроме этого, счетчик Култера определяет не все параметры, влияющие на светорассеяние.

Существует также метод центрифугирования для определения размера клетки [10]. Именно этим методом были определены размеры некоторых клеток периферической крови человека [11]. Методика отслеживания изменения скорости определяет размер клетки по стабилизации скорости клеток в гравитационном поле. Распределение лимфоцитов по размеру, определенное такой методикой, показано в [8]. Допущения этой методики: 1) плотность клеток не меняется от клетки к клетке в данной субпопуляции; 2) клетки сферические. Обе методики не позволяют получить та-

кие важные параметры, влияющие на светорассеяние, как форма клетки и ядра, размер ядра, положение ядра, показатели преломления ядра и цитоплазмы.

Существует также спектральный метод определения диаметра и показателя преломления эритроцита [12], но пока нет информации, как этим методом можно извлечь какие-либо параметры мооядерных клеток.

Метод проточной цитометрии уже применялся для изучения субпопуляций лимфоцитов [13; 14], однако возможность определения доли Т-лимфоцитов в крови этим методом в данной работе демонстрируется впервые.

Современные методы количественного анализа субпопуляций лимфоцитов очень дорогостоящи. Ценность же данной работы заключается в разработке сравнительно дешевой методики определения доли Т-лимфоцитов среди всех лимфоцитов по рассеянному ими свету, и эта доля является важной характеристикой иммунного статуса человека.

### Экспериментальная часть

Настоящая работа выполнена на сканирующем проточном цитометре (СПЦ) [15], который позволяет измерять одновременно сигналы светорассеяния и флуоресценции от одиночных клеток. Причем скорость измерения составляет до десятка тысяч клеток в минуту [16]. Основное преимущество СПЦ в том, что измерение светорассеяния происходит в широком диапазоне углов. Для лимфоцитов диапазон углов рассеяния составлял от 5 до 60°.

Объект для исследования был получен следующим образом. Для подготовки образцов лимфоцитов использовалась цельная периферическая венозная кровь из локтевой вены здорового донора (здоровые мужчины 18 лет) с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) в качестве антикоагулянта. Центрифугирование проводилось в течение 20 минут в солевом растворе (фосфатно-солевой буфер) с плотностью 1,077 мг/л, рН = 7,4 и с ускорением 1 300 об/мин. Далее снимался обогащенный лейкоцитами осадок, который появлялся в результате центрифугирования. Из полученного осадка выделялись лимфоциты с помощью иммунофлуоресцентных маркеров CD3-FITC и CD19PE для Т- и В-клеток соответственно. После окрашивания в течение 20 минут про-

ба была снова отмыта и разбавлена для получения концентрации около  $10^6$  клеток/мл. Полученную пробу анализировали на СПЦ, измеряя одновременно два сигнала: интенсивность флуоресценции от специфически связанных с лимфоцитом маркеров и индикатрису светорассеяния.

В ходе экспериментов были проанализированы пробы, приготовленные из крови семи доноров.

### Результаты и обсуждение

Использованная конструкция СПЦ дает возможность измерять следующую комбинацию элементов матрицы Мюллера [17]:

$$I_s(\theta) = \int_0^{2\pi} [S_{11}(\theta, \varphi) + S_{14}(\theta, \varphi)] d\varphi \quad (1)$$

где  $I_s(\theta)$  – выходной сигнал СПЦ;  $\theta$  и  $\varphi$  – полярный и азимутальный углы соответственно. Если предположить, что лимфоцит имеет осесимметричную структуру, то второй член уравнения (1) равен нулю и, таким образом, выходной сигнал канала светорассеяния цитометра пропорционален элементу  $S_{11}$ , проинтегрированному по азимутальному углу [17].

Индикатриса, измеренная СПЦ (рис. 1) зависит от морфологии лимфоцита. Было измерено до 1 000 индикатрис в каждой пробе. На рис. 2 представлены усредненные по 100 клеткам индикатрисы Т-лимфоцитов и остальных лимфоцитов двух доноров. Результаты демонстрируют, что индикатрисы Т- и остальных лимфоцитов в среднем статистически достоверно отличаются, хотя известно, что морфологические отличия лимфоцитов не уловимы в обычный световой микроскоп.

На основании представленных результатов можно сделать важное заключение: действительно, отличия в светорассеянии между Т-лимфоцитами и остальными лимфоцитами имеются, но эти отличия меньше, чем разница в интенсивности между лимфоцитами для разных доноров. Следовательно, чтобы определять долю Т-лимфоцитов по светорассеянию, необходимо нормализовать параметры индикатрисы для разных доноров.

Перейдем к выбору параметров индикатрисы. Для этого построим зависимость относительной разницы в интенсивности светорассеяния для лимфоцитов разных типов

в рассматриваемом диапазоне углов. Относительную разность будем строить для индикатрис, усредненных по 100 клеткам, из двух популяций лимфоцитов: CD19–/CD3+ (Т-лимфоциты), CD19+/CD3– и CD19–/CD3– (остальные лимфоциты). Индикатрисы были усреднены внутри каждой из популяции. Относительная разность между усредненными индикатрисами светорассеяния Т- и остальных лимфоцитов представлена на рис. 3.

Из рис. 3 видно, что интенсивность индикатрисы светорассеяния в области углов от 20 до 25° для остальных лимфоцитов в среднем на 20 % превосходит интенсивность рассеяния для Т-лимфоцитов у всех доноров. Интеграл от индикатрисы светорассеяния в области углов от 20 до 25° (параметр  $X_1$ ) можно использовать как идентификационный параметр в методе определения доли Т-лимфоцитов. В качестве второго параметра можно использовать интеграл от индикатрисы све-

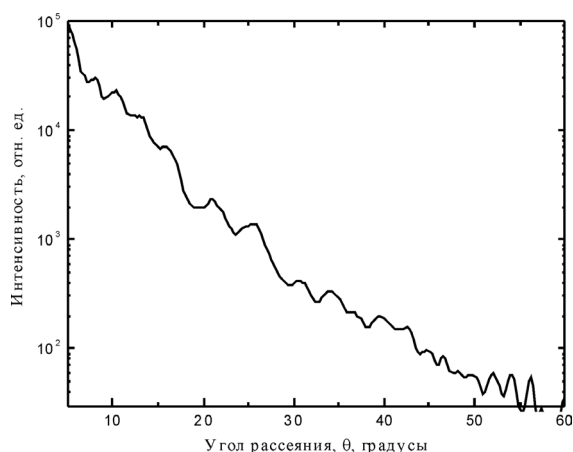


Рис. 1. Измеренная индикатриса светорассеяния лимфоцита

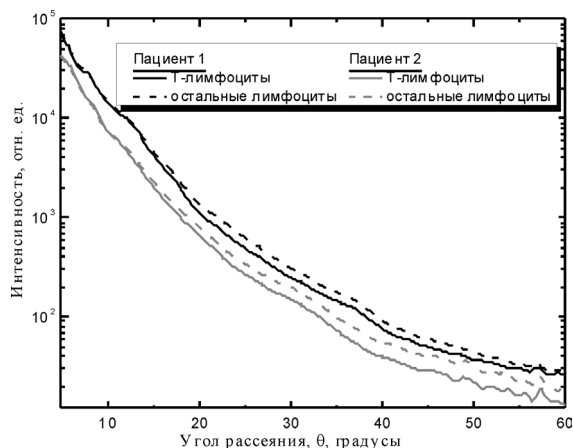


Рис. 2. Усредненные по 100 клеткам индикатрисы светорассеяния лимфоцитов для разных доноров

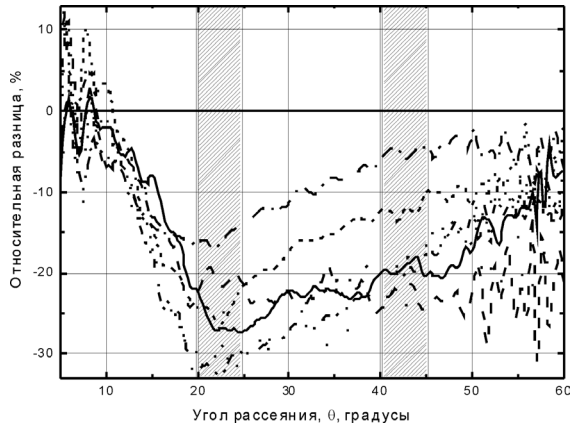


Рис. 3. Относительная разница между усредненными индикатрисами светорассеяния Т-лимфоцитов (CD19-/CD3+) и остальных лимфоцитов (CD19+/CD3- и CD19-/CD3-) для семи разных доноров

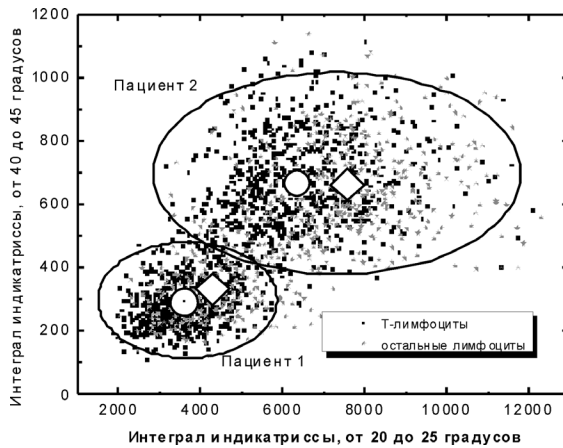


Рис. 4. Распределение значений интегралов от индикатрис светорассеяния Т- и остальных лимфоцитов в двух областях (от 20 до 25 и от 40 до 45°) для разных доноров. Открытые круг и ромб показывают положения центров распределений для Т- и остальных лимфоцитов соответственно

торассеяния в области углов от 40 до 45° (параметр  $X_2$ ). Для обоих параметров наблюдается устойчивое превышение интенсивности светорассеяния остальных лимфоцитов над Т-лимфоцитами. Достаточно большое угловое расстояние между параметрами и, следовательно, различная природа формирования индикатрисы в этих углах позволяет надеяться, что связь между параметрами не носит только линейный характер.

Для проведения процедуры нормализации и масштабирования построим двумерную параметрическую карту, где точка на карте относится к индивидуальному лимфоциту. Такая параметрическая карта для двух доноров представлена на рис. 4. Аналогичные карты были построены для всех семи доноров. Вид тако-

го распределения для каждого донора строго индивидуален, однако наблюдается устойчивое расположение центра распределения для Т-лимфоцитов слева от центра распределения для остальных лимфоцитов. Для всех распределений были применены процедуры нормализации и масштабирования, после которых у всех исследуемых распределений средние значения были смещены в ноль, а дисперсия стала равной единице [18]. В результате такой операции у распределений отличался третий момент – асимметрия распределения.

После нормировки и масштабирования для всех семи доноров были построены распределения по параметру  $X_1$  и вычислены асимметрии полученных распределений. Процентное содержание Т-лимфоцитов в пробах показало хорошую корреляцию с величиной асимметрии (рис. 5). Методом линейной регрессии была получена зависимость доли Т-лимфоцитов в крови донора от асимметрии распределения по одному параметру – интегралу индикатрисы от 20 до 25°. Коэффициент корреляции для полученной зависимости равен 0,88, средняя ошибка линейной регрессии 0,054.

Для того чтобы использовать оба параметра индикатрисы  $X_1$  и  $X_2$ , при вычислении доли Т-лимфоцитов необходимо рассчитать четыре асимметрии двумерного распределения [19]. Две из четырех полученных асимметрий оказались малыми величинами порядка  $10^{-17}$ , поэтому их вклад не существен. Две другие асимметрии были использованы для получения уравнения, выражающего зависимость доли Т-лимфоцитов в периферийной крови донора от асимметрии распределения параметров светорассеяния лимфоцитов. Уравнение искалось в виде

$$Y = a_1 X_1 + a_2 X_2 + a_3, \quad (2)$$

где  $X_1, X_2$  – асимметрии двумерного распределения;  $Y$  – доля Т-лимфоцитов;  $a_1, a_2, a_3$  – варьируемые коэффициенты, которые находились методом линейной регрессии [19]. Рассчитанные значения для варьируемых коэффициентов:  $a_1 = -0,102$ ;  $a_2 = 0,019$ ;  $a_3 = 0,725$ . Значения доли Т-лимфоцитов, полученные с помощью уравнения (2), хорошо коррелируют с данными, полученными с помощью флуоресцентных меток. Корреляционная прямая для данных, полученных обоими методами, показана на рис. 6. Коэффициент корреляции  $R = 0,94$ .

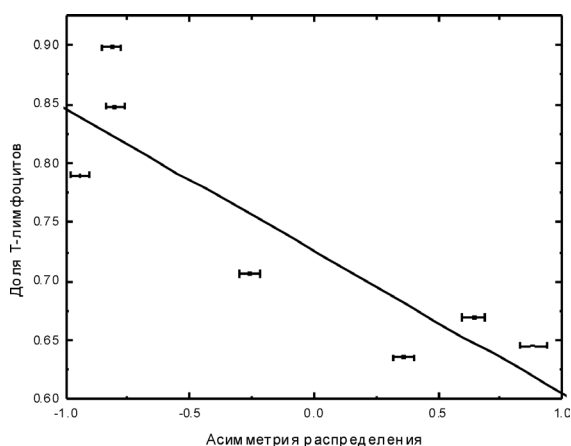


Рис. 5. Зависимость доли Т-лимфоцитов в периферийной крови донора от асимметрии распределения по интегралу индикатрисы от 20 до 25°

Средняя ошибка линейной регрессии (2) составила 0,045.

Таким образом, возможность определения доли Т-лимфоцитов существует благодаря тому, что есть зависимость доли Т-лимфоцитов от асимметрии распределения параметров светорассеяния лимфоцитов, в качестве которых принимались интегралы от индикатрисы светорассеяния в определенных диапазонах углов.

### Заключение

Данная работа развивает многопараметрические методы классификации [19], указывает на пути их улучшения. Был проведен многопараметрический анализ светорассеяния лимфоцитов для определения доли Т-лимфоцитов на сканирующем проточном цитометре. В результате установлено, что индикатрисы светорассеяния лимфоцитов разных доноров могут отличаться сильнее, чем индикатрисы разных субпопуляций лимфоцитов одного донора.

Также установлено, что при определении доли Т-лимфоцитов в крови наиболее информативными являются параметры светорассеяния, являющиеся интегралами индикатрисы в угловых диапазонах 20–25 и 40–45°.

Доля Т-лимфоцитов может быть определена по коэффициенту асимметрии распределения параметров светорассеяния с ошибкой не хуже чем 4,5 %.

Развитое программное обеспечение сканирующего проточного цитометра позволяет ав-

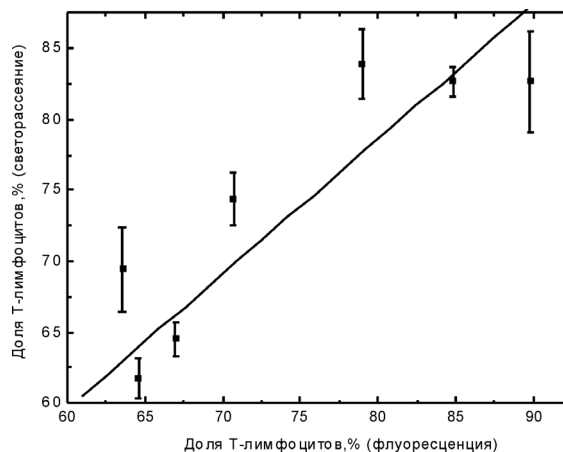


Рис. 6. Корреляция процентного содержания Т-лимфоцитов, определенного по светорассеянию, и процентного содержания Т-лимфоцитов, определенного стандартным методом по флуоресценции

томатически измерять и анализировать индикатрисы светорассеяния. Также программное обеспечение, созданное в данной работе, позволяет автоматизировать измерения на сканирующем проточном цитометре в случае «разнотипных» доноров, определять асимметрии распределений и по ним – долю Т-лимфоцитов в пробе.

Таким образом, показана возможность определения доли интересующей популяции лимфоцитов в пробе без использования дорогостоящих флуоресцентных меток. Предложенная нами методика позволяет определять долю Т-лимфоцитов за 10–15 минут без использования дорогостоящих моноклональных антител, меченных флуоресцентными метками.

Разработанный нами метод развивает потенциал сканирующего проточного цитометра для проведения гематологического анализа, который определяется большим объемом информации, заключенной в индикатрисах светорассеяния.

### Список литературы

1. *William E* T Cells & NK Cells // Fundamental Immunology. 5<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams and Wilkins Publishers, 2003.
2. *Богущ П. Г., Важбин Л. Б., Чуксина Ю. Ю. и др.* Оценка иммунологической реактивности у больных сифилисом // Новости «Вектор-Бест». 2003. № 3 (29) ([http://www.vector-best.mhost.ru/nvb/st29\\_4.htm](http://www.vector-best.mhost.ru/nvb/st29_4.htm)).
3. *Ruban G. I., Kosmacheva S. M., Goncharova N. V et al.* Investigation of morphometric

parameters for granulocytes and lymphocytes as applied to a solution of direct and inverse light-scattering problems // *Journal of Biomedical Optics*. 2007. Vol. 12 (4).

4. Sandro B., Rotstein O., Parodo J. et al. Hypertonic inhibition of exocytosis in neutrophils: central role for osmotic actin skeleton remodeling // *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* 2000. Vol. 279. P. 619–633.

5. Zharov V. P., Galanzha E. I., Shashkov E. V. et al. In vivo photoacoustic flow cytometry for monitoring of circulating single cancer cells and contrast agents // *Opt. Lett.* 2006. Vol. 31. P. 3623–3625.

6. Alexander H., Markey G., Nolan R. et al. Cell sizing in chronic lymphoproliferative disorders: an aid to differential diagnosis // *J. Clin. Pathol.* 1992. Vol. 45. P. 875–879.

7. Chapman E., Kurec A., Davey F. Cell volumes of normal and malignant mononuclear cells // *J. Clin. Pathol.* 1981. Vol. 34. P. 1083–1090.

8. Chalmers J., Haam S., Zhao Y. et al. Quantification of cellular properties from external fields and resulting induced velocity: cellular hydrodynamic diameter // *Biotechnol. Bioeng.* 1999. Vol. 64. P. 509–518.

9. Mourant J., Canpolat M., Brocker C. et al. Light scattering from cells: the contribution of the nucleus and the effects of proliferative status // *J. Biomed. Opt.* 2000. Vol. 5 (2). P. 131–137.

10. Bertonecello I., Pretlow T. G., Pretlow T. A comparison of cell separations obtained with centrifugal elutriation and sedimentation at unit gravity // *Cell Separation Methods and Selected Applications*. San Diego: Academic Press, 1987. P. 89–108.

11. Lasky L., Zanjani E. Size and density characterization of human committed and

multipotent hematopoietic progenitors // *Exp. Hematol.* 1985. Vol. 13. P. 680–684.

12. Ghosh N., Buddhiwant P., Uppal A. et al. Simultaneous determination of size and refractive index of red blood cells by light scattering measurements // *Applied physics letters*. 084101, 2006. Vol. 88.

13. Babcock G., Taylor A., Hynd B. et al. Flow cytometric analysis of lymphocyte subset phenotypes comparing normal-children and adult // *Diagnostic and Clinical Immunology*. 1987. Vol. 5. Is. 4. P. 175–179.

14. Sack U., Gerling F., Tarnok A. Age-related lymphocyte subset changes in the peripheral blood of healthy children – a meta-study // *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2007. Vol. 34. Is. 3. P. 176–181.

15. Maltsev V. P. Scanning flow cytometry for individual particle analysis // *Review of Scientific Instruments*. 2000. Vol. 71. No. 1. P. 243–255.

16. Yurkin M. A. Discrete dipole simulations of light scattering by blood cells: PhD thesis. Amsterdam: University of Amsterdam, 2007.

17. Yurkin M. A., Semyanov K. A., Tarasov P. A. et al. Experimental and theoretical study of light scattering by individual mature red blood cells by use of scanning flow cytometry and a discrete dipole approximation // *Applied Optics*. 2005. Vol. 44. P. 5249–5256.

18. Бородин А. Н. Элементарный курс теории вероятностей и математической статистики. СПб.: Изд-во «Лань», 1999.

19. Terstappen L., Mickaels R. A., Dost R. Increased light scattering resolution facilitates multidimensional flow cytometric analysis // *Cytometry*. 1990. Vol. 11. Is. 4. P. 506–512.

Материал поступил в редколлегию 21.03.2008

D. I. Strokotov, V. I. Mun, K. A. Semyanov, V. P. Maltsev

#### THE DETERMINATION OF T-LYMPHOCYTE PERCENTAGE IN BLOOD FROM ANGLE RESOLVED LIGHT SCATTERING

This work shows the possibility of determination of T-lymphocyte percentage in blood by light scattering pattern only. The analysis of lymphocytes was carried out by scanning flow cytometry with measurement light scattering and specific fluorescence simultaneously. The fluorescence was caused from fluorochrom radiation which was connected with monoclonal antibody. The analysis of light scattering from different lymphocyte subpopulations allowed reveal the dependence distribution asymmetry of T-lymphocyte percentage. This method resulted in determination of T-lymphocyte percentage with mistake less then 4,5 %. The analysis by this method takes 10–15 minutes as the same time immunofluorescence analysis takes several tens of minutes. Thus, our method develops a potential of scanning flow cytometry in carrying out bulk hematological analysis.

*Keywords:* flow cytometry, inverse light scattering problem, light scattering indicatrix, T-lymphocytes.