**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**
**ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**
**Кафедра внутрішньої медицини №2, клінічної імунології та алергології ім. академіка Л.Т. Малої**

**Магістерська робота**

за спеціальністю 224 «Технології медичної діагностики та лікування»
на тему: **«Проточна цитометрія: теоретичні засади, методика виконання та типові зміни при вроджених імунодефіцитах»**

Виконала: здобувач другого (магістерського)
рівня вищої освіти, курсу 2, групи 04-24-090
IV факультету, за спеціальністю 224
«Технології медичної діагностики та лікування»
Олексюк Наталія Афанасіївна

Керівник: д.мед.н., професор В.Д. Бабаджан

Рецензент: д.мед.н., професор П.Г. Кравчун

Харків - 2026

ЗМІСТ

Вступ ..... 4

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. ТЕОРЕТИЧНІ ЗАСАДИ ПРОТОЧНОЇ ЦИТОМЕТРІЇ ..... 6

1.1. Визначення та принцип дії методу ..... 6

1.2 Історія розвитку проточної цитометрії ..... 7

1.3 Основні компоненти системи ..... 9

1.3.1 Оптична система ..... 11

1.3.2. Гідродинамічне фокусування ..... 16

1.3.3. Детектори та система збору даних ..... 16

1.4 Суть методу проточної цитометрії ..... 19

1.5 Типи флуорохромів і маркерів ..... 20

1.6 Використання моноклональних антитіл (CD - маркери – кластери диференціювання) ..... 24

1.7 Сфери застосування проточної цитометрії в медицині ..... 26

1.7.1 Імунологія та клінічна діагностика ..... 26

1.7.2 Гематологія та Онкологія (Онкогематологія) ..... 27

РОЗДІЛ 2 МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ПРОТОЧНОЇ ЦИТОМЕТРІЇ ..... 28

2.1. Стадії підготовки клітин ..... 28

2.2.1 Виділення лімфоцитів з периферичної крові методом градієнтного центрифугування ..... 28

2.2.2 Лізис еритроцитів (ручний та автоматичний режими) ..... 35

2.2.3 Підрахунок клітин у камері Горяєва ..... 36

2.2 Вибір панелей антитіл для аналізу ..... 37

2.3 Флуоресцентне мічення клітин ..... 42

2.4 Контроль якості підготовки зразків ..... 43
2.5 Проблеми перекриття спектрів і методи компенсації ..... 45
2.6 Обробка та інтерпретація результатів ..... 47
РОЗДІЛ 3 ІМУНОФЕНОТИПУВАННЯ КЛІТИН ТА ЙОГО КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ..... 48
3.1 Основні субпопуляції лімфоцитів: Т-, В- та NK- клітини ..... 49
3.2 Ключові CD-маркери та їх діагностичне значення ..... 52
3.3 Імунофенотипування в клінічній практиці ..... 55
3.3.1 Імунодефіцитні стани ..... 56
3.3.2 Аутоімунні захворювання ..... 57
3.3.3 Онкогематологічні процеси ..... 59
РОЗДІЛ 4 ПРОТОЧНА ЦИТОМЕТРІЯ ПРИ ВРОДЖЕНИХ ІМУНОДЕФЦИТАХ ..... 62
4.1 Класифікація вроджених імунодефіцитів ..... 62
4. 2 Клінічні форми вродженних імунодефіцитів ..... 64
4.3 Діагностика вродженних імунодефіцитів ..... 76
4.3.1 Анамнез ..... 76
4.3.2 Фізикальне дослідження ..... 77
4.3.3 Лабораторні методи дослідження ..... 77
ВИСНОВКИ ..... 81
Список використаних джерел ..... 83

# ВСТУП

Проточна цитометрія є одним із провідних методів сучасних біомедичних досліджень та лабораторної діагностики, який поєднує можливість швидкого, точного й багатопараметричного аналізу клітин у суспензії. Основою цього методу є вимірювання оптичних характеристик окремих клітин у ламінарному потоці рідини за допомогою лазерного променя. При цьому одночасно оцінюють світлорозсіювання, що дозволяє визначати морфологічні параметри клітин (розмір, внутрішня структура, гранулярність), та флуоресценцію, яка відображає їх біохімічні та імунологічні властивості.

Розвиток проточної цитометрії став можливим завдяки створенню моноклональних антитіл, мічених флуорохромами, що дало змогу виявляти специфічні поверхневі антигени клітин. Це дозволило не лише класифікувати клітини за морфологічними ознаками, але й проводити точне імунофенотипування - розподіл клітин на популяції та субпопуляції, визначення їх функціонального стану та ролі у патологічних процесах.

Сьогодні проточна цитометрія широко застосовується в різних галузях медицини та біології. В імунології цей метод є «золотим стандартом» для визначення кількості та співвідношення Т- і В-лімфоцитів, натуральних кілерів та інших клітинних субпопуляцій. У гематології та онкології цитометрія використовується для діагностики та класифікації лейкозів, лімфом, моніторингу ефективності терапії. У мікробіології вона дозволяє вивчати клітини бактерій, грибів, одноклітинних водоростей. Також проточна цитометрія застосовується для оцінки апоптозу, проліферації, фагоцитозу, продукції цитокінів і багатьох інших клітинних процесів.

Важливим є те, що метод відзначається високою швидкістю: сучасні прилади здатні аналізувати десятки тисяч клітин за секунду. Це забезпечує високу достовірність результатів та дозволяє проводити комплексні дослідження навіть при обмеженому обсязі біологічного матеріалу. Однак, поряд із

перевагами, проточна цитометрія має і певні обмеження - потребу у дорогому обладнанні, кваліфікованому персоналі та стандартизованих протоколах.

# РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. ТЕОРЕТИЧНІ ЗАСАДИ ПРОТОЧНОЇ ЦИТОМЕТРІЇ

## 1.1. Визначення та принцип дії методу

Проточна цитометрія - це високочутливий лабораторний метод, що ґрунтується на аналізі оптичних та флуоресцентних характеристик окремих клітин або частинок у потоці рідини, який проходить крізь лазерний промінь, і дозволяє швидко та одночасно оцінювати їхні морфологічні й імунологічні властивості.

***Принцип методу проточної цитометрії*** (цитофлюориметрії). Суть методу в тому, що прилад «розглядає» кожну клітину окремо, коли вона пролітає повз лазер. Він фіксує, як клітина розсіює світло і чи вона світиться. Навіть без спеціальних добавок можна просто за розміром і формою підрахувати основні групи лейкоцитів: лімфоцити, моноцити та гранулоцити. Розвиток гибридомної технології та поява моноклональних антитіл (МКАТ) дозволили типувати клітини не тільки за їх морфологічними ознаками, але й за рахунок наявності набору поверхневих антигенів і рецепторів, які притаманні виключно для певних популяцій клітин та їх функціонального стану.

Для проточної цитометрії використовують спеціальні «світні» мітки - антитіла, з'єднані з фарбою. Ці мітки працюють як високоточні ключі: вони підходять тільки до своїх «замків» на поверхні клітин крові. Оскільки таких міток дуже багато, їх об'єднали в групи та пронумерували. Кожна група отримала назву CD (кластер диференціювання) з певним числом. Наприклад, один номер шукає тільки клітини-помічники, а інший - клітини-кілери. Завдяки тому, що ці мітки світяться під променем лазера, прилад (цитометр) миттєво підраховує, скільки в крові назбиралося лімфоцитів кожного виду. Це дозволяє лікарям побачити точний склад імунної системи пацієнта.

***Принцип роботи проточного цитомета.*** Проточний цитофлуориметр представляє собою спеціальний прилад для вимірювання оптичних властивостей

окремих клітин у складі суспензії. Робота з клітинною суспензією є обов'язковою умовою проведення аналізу через виконання вимірювань безпосередньо у струмені рідини. Сучасне обладнання реєструє такі характеристики об'єктів як світлорозсіювання під різними кутами та рівень флуоресценції у певних діапазонах спектру.

На відміну від класичного оптичного мікроскопа цей метод не відноситься до засобів візуалізації. Прилад не формує зображення клітини під час виконання досліджень. При цьому варто зауважити появу на ринку нових моделей пристроїв, які вдало поєднують у собі можливості цитофлуориметра та мікроскопа.

Висока ефективність даної технології досягається завдяки здатності аналізувати до декількох десятків тисяч клітин за одну секунду. Конструктивні особливості обладнання дозволяють фіксувати для кожного окремого об'єкта від 5 до 14 і більше різних параметрів одночасно. Подальша обробка отриманої інформації допомагає ідентифікувати специфічні популяції клітин та встановити їхню точну кількість у досліджуваному матеріалі.

Метод проточної цитометрії дозволяє вивчати клітини людей, тварин, рослин, а також бактерії або дріжджі. Окрім цілих клітин аналізу підлягають інші мікроскопічні частки на кшталт ізольованих ядер чи хромосом. Паралельно з цим активно вдосконалюються методи дослідження розчинних молекул за допомогою полімерних мікросфер із нанесеними на них антитілами.

## 1.2 Історія розвитку проточної цитометрії

Проточна цитофлуориметрія як новий метод дослідження клітин виникла і стала розвиватися у другій половині XX століття. Основна ідея, яка послужила поштовхом для створення цього методу − прискорення і автоматизація рутинного мікроскопічного дослідження в лабораторній діагностиці.

Принцип проточної цитометрії (підрахунок клітин крові) був запатентований в 1953 році в США Уоллесом Коултера (Wallace H. Coulter).

Перша лабораторна установка для регістрації флуоресценції потоку клітин у первинній суспензії була створена у 1968 році Вольфгангом Гёде (Wolfgang Göhde) в Університеті Мюнстера (Німеччина). Запатентувавши прилад, Гьоде зареєстрував в 1968/69 рр. компанію «Partec» і організував серійне виробництво з використанням потужностей компанії «Phywe AG» в Геттінгені. На три роки раніше, в 1965 році Марк Фульвейлер (Mack Fulwyler) розробив пристрій, що дозволяє розділяти суспензію клітин по їх електричного заряду. Цей методичний підхід широко використовується і сьогодні. У 1969 році був випущений перший серійний проточний цитометр в формі приставки до флуоресцентного мікроскопу фірми «Zeiss». З 1970 року в цитометрі стали використовувати гелій-неоновий лазер з випромінюванням з довжиною хвилі 633 нм («Cytograph»). Цей прилад дозволяв швидко розділяти досліджувану суспензію клітин на живі і загиблі клітини по включенню в загиблі клітини барвника трипанового синього. Пізніше прилад був удосконалений завдяки використанню аргонового лазеру з довжиною хвилі 488 нм – «Cytofluorograph» (1971) від від компанії Bio / Physics Systems Inc. (Пізніше: Ortho Diagnostics).

Спочатку технологія називалася імпульсною цитофотометрією (в німецькому варіанті «Impulszytophotometrie»). Тільки 10 років потому в 1978 році на Конференції Американського інженерного суспільства в Пенсаколе (Флоріда, США) було прийнято рішення назвати технологію «проточною цитометрією». Термін проточна цітометрія є більш коректний, чем проточна цітофлюоріметрія, оскільки одночасно вимірюється не тільки флуоресценція, а й інтенсивність розсіяного світлового потоку. Незабаром було розроблено кілька інструментів для проточної цитометрії, включаючи PAS 8000 (1973) від «Partec», FACS (1974) від «Becton Dickinson», ICP 22 (1975) від «Partec/Phywe» і Epics (1977/78) від «Coulter». Ці прилади вже мали здатність вимірювати інтенсивність флуоресценції при двох і більше довжинах хвиль і визначати відразу кілька параметрів клітин.

1.3 Основні компоненти системи

***Принципова схема пристрою.*** Роботу проточної системи приладу можна представити таким чином (*рис. 1*):

– суспензія клітин з пробірки зі зразком забирається спеціальною голкою (1);

– клітини вузьким струменем впорскується в центр ламинарного потоку проточною рідини, що представляє собою буферний розчин, ізотонічний по відношенню до клітин, що приводить до гідродинамічного фокусування струменя клітин в струмені розчину (2).

Забір зразка з пробірки і проточної рідини з відповідного резервуара здійснюється за рахунок подачі надлишкового тиску (3);

– потік рідини з клітинами протікає через проточну клітинку (4), де відбувається вимір оптичних властивостей клітин;

– після проходження проточної клітини потік рідини збирається у злив (5).

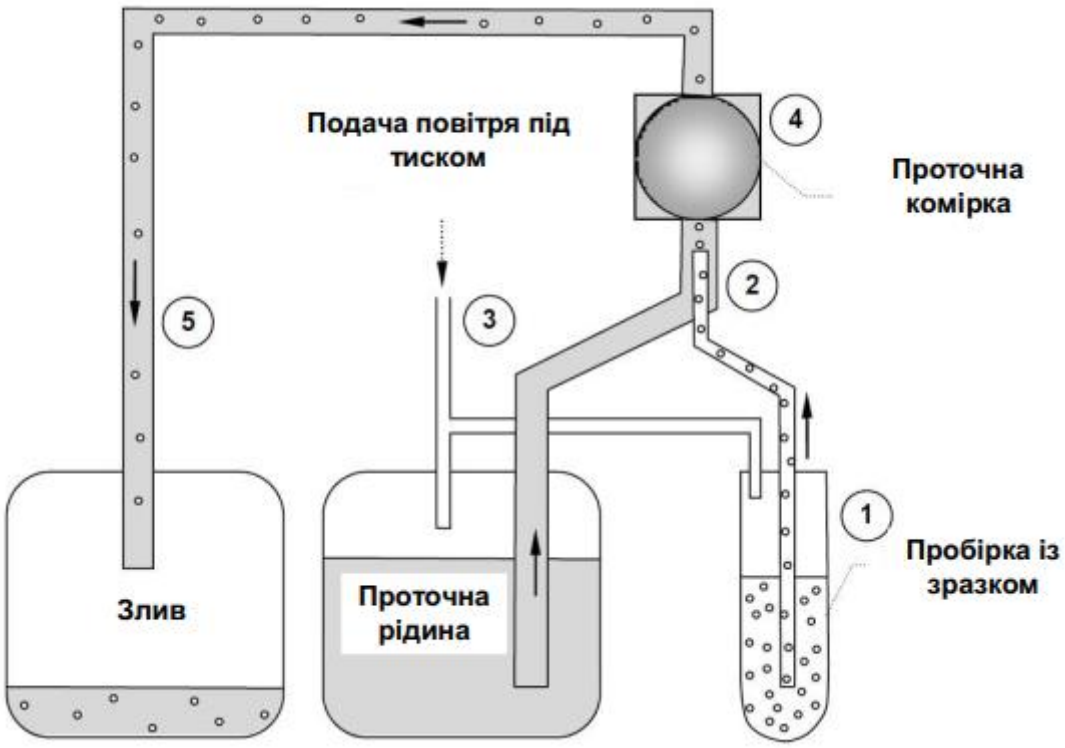



**Рис. 1.** Принципова схема проточної системи цитофлуориметр. Пояснення

в тексті

Ламінарний потік рідини протікає по тонкому каналу в кюветі з оптично прозорого матеріалу (кварц) (*рис. 2 А*). В одній з ділянок каналу в його центрі сфокусований лазерний промінь, і клітини в потоці послідовно поодинці перетинають цю точку (*рис. 2 Б*). У момент перетину кліткою цієї ділянки розсіяне нею світло лазера, а також флуоресценція реєструються оптичною системою приладу.

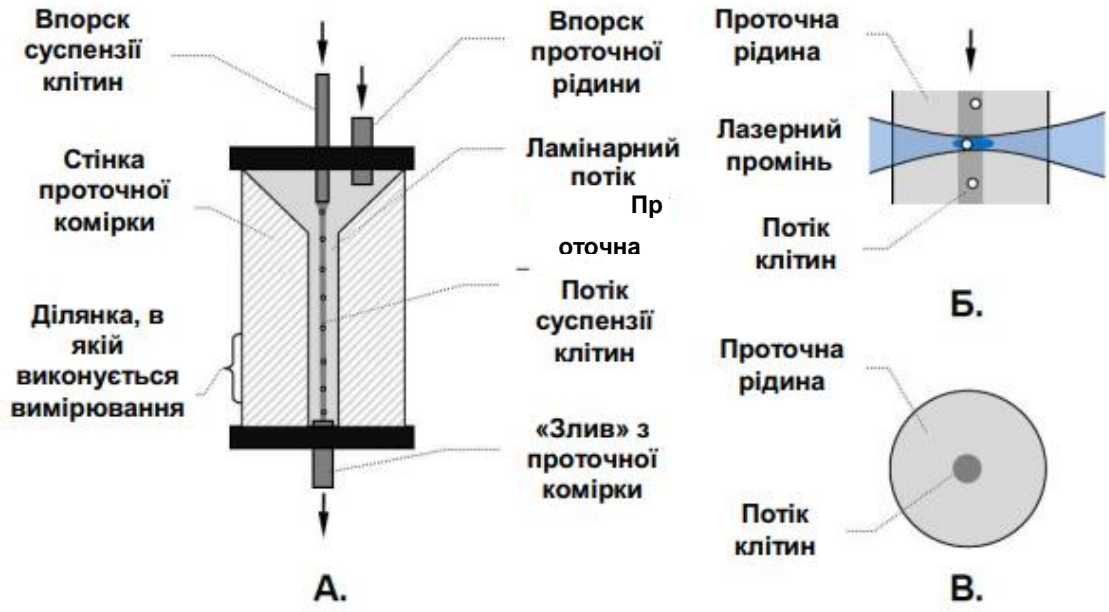



**Рис. 2.** Схема роботи типової проточної клітини (А); показана ділянка, в якій сфокусований лазерний промінь перетинає потік в клітині (Б); поперечний розріз ламінарного потоку (В)

Діаметр лазерного променю у точці фокусу складає приблизно 20 мкм уздовж проточного каналу та 60 мкм поперек нього. Такі габарити гарантують швидкий перетин пучка окремою клітиною та дозволяють уникнути ситуації одночасного перебування кількох об'єктів у зоні освітлення. Це забезпечує достатньо рівномірне опромінення по всій ширині клітинного потоку. При цьому інтенсивність світла у промені розподілена нерівномірно через те що у центрі вона вища а до країв суттєво знижується.

Поперечний профіль інтенсивності лазерного випромінювання підпорядковується розподілу Гауса. Для порівняння можна зазначити що клітина яка відхилилася від центру такого променю на 30 мкм отримає лише 13,5% світлової енергії відносно об'єкта у самому центрі. Через це для отримання стабільних результатів критично важливо щоб клітини перетинали лазер строго визначеним чином по одній та без відхилень від основної траєкторії.

Центрування клітин у проточній комірці відбувається завдяки чіткій організації потоку рідини або гідродинамічному фокусуванню. Для реалізації цієї мети необхідно підтримувати ламінарність потоку тобто рух рідини окремими шарами без їхнього змішування. Центральний потік клітин не контактує з оточуючою проточною рідиною. Діаметр цього потоку безпосередньо регулюється через тиск проточної рідини. Зменшення тиску призводить до розширення потоку клітин і навпаки.

Наявність ламінарного потоку виступає найважливішою умовою для коректності проведення вимірювань. Підвищити точність аналізу можна шляхом збільшення тиску проточної рідини. У такому випадку потік клітин звужується а їхня кількість при перетині променю в одиницю часу знижується. Одночасно покращується фокусування об'єктів відносно центру ламінарного потоку та зменшується інструментальна похибка приладу.

Навпаки зменшення тиску рідини та розширення діаметра потоку збільшує кількість клітин які проходять крізь лазер за одиницю часу. Така настройка дозволяє значно прискорити виконання аналізу проте точність отриманих результатів стає суттєво нижчою.

### 1.3.1 Оптична система

Оптична система проточного цитометру включає один або кілька монохроматичних лазерних джерела світла і систему детектування сигналу.

При проходженні кліткою лазерного променю, стається таке: 1) частина світла розсіюється клітиною; 2) частина енергії світла поглинається і

витрачається в тепло, на протікання фотохімічних процесів, або знову висвічується у вигляді світла (*флуоресценція*), як правило, з меншою енергією кванта; 3) частина світла проходить без змін, без взаємодії з клітиною. Для аналізу властивостей клітин використовуються процеси 1) та 2), при цьому в останньому випадку аналізується флуоресценція.

*Аналіз прямого світлорозсіювання.* Детектор прямого світлорозсіювання FSC (від англійського forward scatter) встановлюється на шляху лазерного променя та призначений для реєстрації світла, що розсіюється під малими кутами, значення яких залежать від конкретної моделі приладу і зазвичай становлять кілька градусів. Центральна зона цього детектора має захисне екранування, тому пряме, нерозсіяне лазерне випромінювання ним не фіксується. Якщо в потоці відсутні клітини або будь-які інші частинки, лазерний промінь проходить повз детектор і потрапляє саме на екрановану ділянку. Після проточного осередку детектор реєструє лише те світло, яке відхиляється від початкового напрямку. Коли через лазерний промінь проходить клітина, частина випромінювання змінює свій напрямок, розсіюється і досягає активних ділянок детектора. Отриманий світловий сигнал перетворюється на електричний імпульс, амплітуда якого відповідає кількості світла, що потрапило на приймач.

Поява сигналу FSC означає, що через лазерний промінь пройшов певний об’єкт, тому такі сигнали використовують для підрахунку їх кількості. Сила світлорозсіювання під малими кутами безпосередньо пов’язана з розмірами клітини, оскільки більші об’єкти розсіюють більше світла, ніж менші. Завдяки цьому величина сигналу FSC дає можливість робити висновки щодо розмірів досліджуваних частинок. Під час проходження лазерного променя крізь клітину світло багаторазово заломлюється та розсіюється у різних напрямках, зокрема і під більшими кутами. Реєстрація такого випромінювання дозволяє отримати уявлення про внутрішню будову клітини, зокрема про співвідношення між ядром і цитоплазмою, а також про наявність гранул чи інших внутрішньоклітинних структур. У проточній цитометрії кожен окремий зареєстрований сигнал від

об’єкта прийнято називати подією, а сам процес аналізу фактично зводиться до підрахунку таких подій.

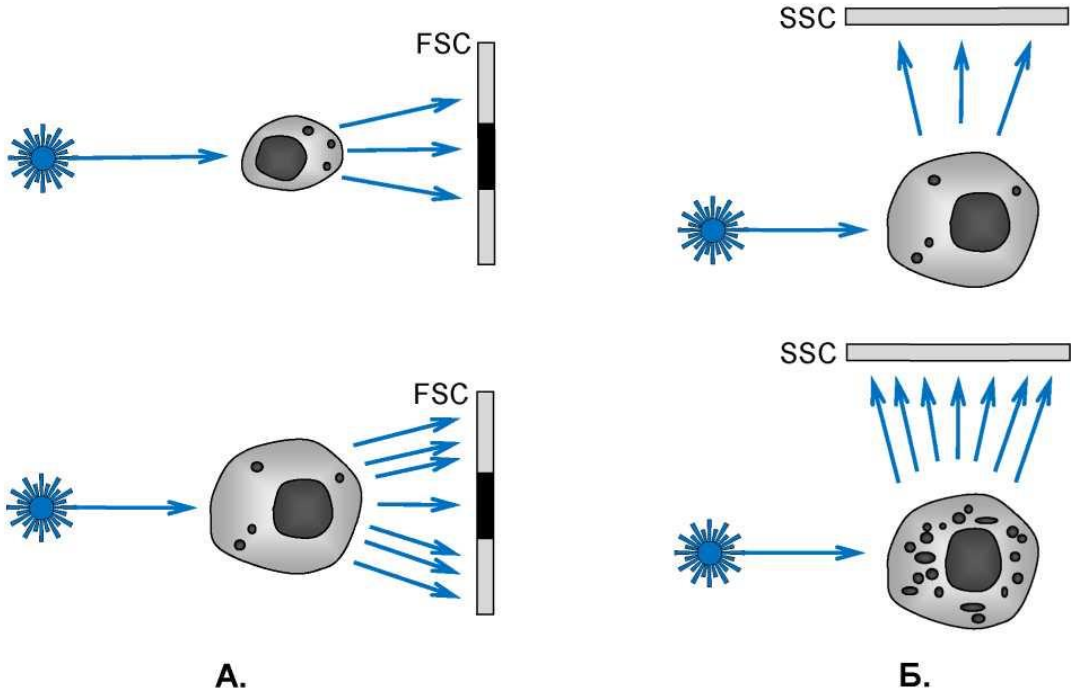



**Рис. 3.** Схема, що ілюструє принцип інтерпретації даних про светлорозсіювання об'єктів:

А − сигнал прямого світлорозсіювання (*FSC*) вище від більш великих об'єктів;

Б − сигнал бічного світлорозсіювання (*SSC*) вище від об'єктів більшої гранулярності.

*Аналіз бокового світлорозсіювання.* Детектор бокового світлорозсіювання SSC (від англійського side scatter) встановлюється під прямим кутом до напрямку лазерного променя і призначений для реєстрації світла, яке відхиляється на великі кути, межі яких залежать від конструкції конкретного приладу. Таке розсіювання виникає внаслідок багаторазового заломлення та відбиття лазерного випромінювання під час його проходження крізь клітину. Фіксація цього сигналу дає змогу оцінити складність внутрішньої організації клітини, зокрема наявність гранул, везикул та інших внутрішньоклітинних структур, а також співвідношення між ядром і цитоплазмою.

Клітини з більш розвиненою та складною внутрішньою будовою зазвичай спричиняють інтенсивніше світлорозсіювання під великими кутами. Саме тому величина сигналу SSC використовується як непрямий показник гранулярності та внутрішньої структурованості об’єкта. Спільне використання показників FSC і SSC дозволяє отримати уявлення про морфологічні особливості клітин загалом і навіть без урахування флуоресцентних характеристик є достатньо інформативним для аналізу різних клітинних популяцій, таких як лімфоцити, моноцити та гранулоцити, у досліджуваному зразку(рис 4).

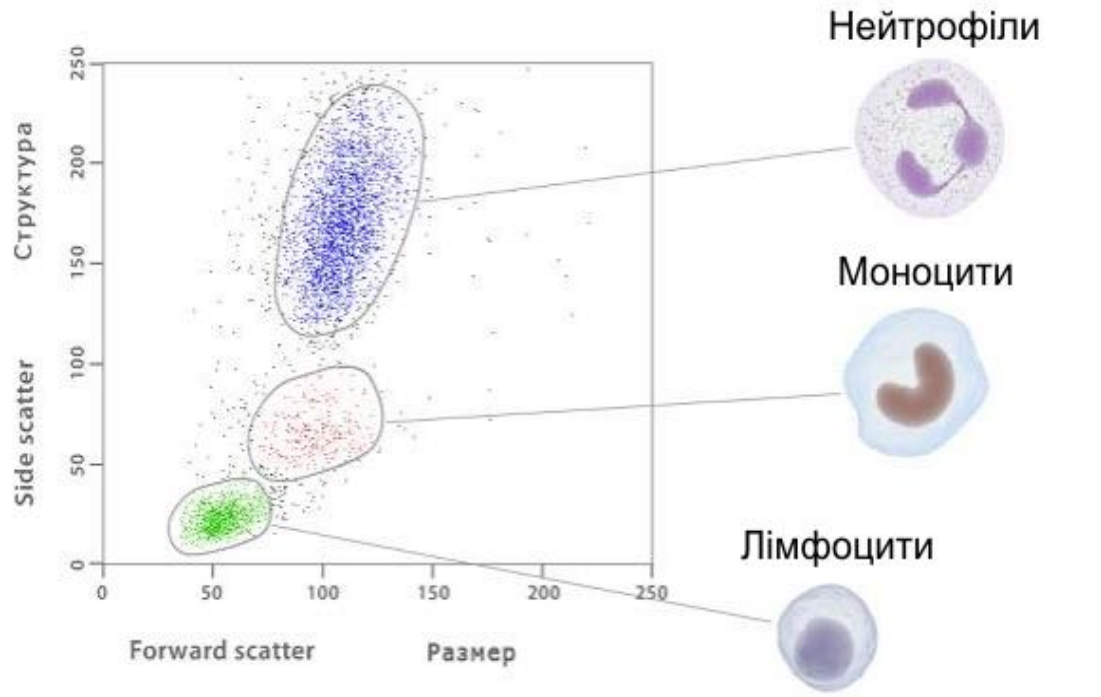



**Рис. 4.** Лазерна проточна цитометрія. Бічне світлорозсіювання (side scatter).

*Аналіз флуоресценції.* Система реєстрації флуоресценції включає набір дихроїчних дзеркал, оптичних фільтрів і флуоресцентних детекторів FL (від англійського fluorescence), кожен з яких налаштований на сприйняття випромінювання у чітко визначеному спектральному діапазоні. Дослідження

флуоресцентних характеристик клітин дає змогу отримати найбільш повну інформацію про зразок, оскільки навіть клітини з однаковою морфологічною будовою можуть суттєво відрізнятися за молекулярним складом залежно від виконуваної функції, стадії клітинного циклу та інших біологічних особливостей. Флуоресцентний сигнал може виникати як за рахунок власних сполук клітини, що зумовлює автофлуоресценцію, так і внаслідок використання спеціальних фарбників.

У практиці застосовують барвники, які вибірково зв’язуються з певними клітинними структурами або молекулами, наприклад речовини, що взаємодіють з ДНК, а також флуоресцентні мітки у складі кон’югатів з моноклональними антитілами, специфічними до окремих мембранних чи цитоплазматичних антигенів. Метод, заснований на використанні антитіл до поверхневих антигенів, є одним із найпоширеніших у проточній цитометрії. У найпростішому варіанті, коли використовується лише один барвник, інтенсивність флуоресценції відображає кількість місць його зв’язування з клітиною, у випадку ДНК-специфічних фарбників це відповідає вмісту ДНК, а при застосуванні антитіл характеризує рівень експресії відповідних антигенів на клітинній поверхні (рис. 7).

Моноклональні антитіла є високоспецифічними, оскільки вони взаємодіють лише з певними типами клітин і розпізнають конкретні молекулярні структури на їхній поверхні. Їх використання дало можливість класифікувати клітини не тільки за морфологічними ознаками, а й за набором поверхневих антигенів і рецепторів, що відповідають визначеному типу клітин та їх функціональному стану. Опромінення світлом певної довжини хвилі збуджує молекули флуоресцентних міток, пов’язаних з різними клітинними компонентами, причому можливе одночасне збудження кількох різних барвників, що дозволяє паралельно оцінювати одразу кілька параметрів клітини.

### 1.3.2. Гідродинамічне фокусування

Ця система забезпечує точне центрування клітин у потоці який проходить через промінь лазера. Основою процесу є ламінарний потік де рідина рухається шарами без перемішування.

Суспензія клітин вводиться у центр потоку буферного розчину який формує вузький струмінь завдяки тиску проточної рідини. Принцип роботи полягає у тому що клітини рухаються одна за одною та перетинають промінь у строго визначеній позиції що гарантує високу точність вимірів.

Регулювання системи здійснюється наступним чином:

- При вищому тиску проточної рідини струмінь клітин звужується що робить вимірювання точнішими хоча швидкість процесу стає меншою.
- При нижчому тиску потік стає ширшим що дозволяє проводити аналіз швидше проте точність результатів при цьому знижується.

Такий підхід дозволяє ефективно балансувати між швидкістю аналізу та якістю отриманих результатів.

### 1.3.3. Детектори та система збору даних

***Загальні принципи аналізу даних.*** При потраплянні світла на детектори світлорозсіювання або флуоресценції генерується електричний струм який підсилюється спеціальною системою обробки сигналу перетворюється на значення напруги та оцифровується для подальшого вивчення.

Для опису спектральних характеристик оптичних елементів застосовують специфічні символи. Наприклад маркування 530/30 позначає фільтр що пропускає випромінювання з центральною довжиною хвилі 530 нм та шириною смуги пропускання 30 нм. Аналогічним чином розшифровується позначення 585/42. Абревіатура LP вказує на фільтр який пропускає випромінювання з довжиною хвилі більше зазначеної межі тоді як SP позначає фільтр для хвиль

коротших за вказане значення.

Процес формування електричного сигналу при проходженні клітиною лазерного променя має певну послідовність. Сигнал поступово наростає під час входження об'єкта у промінь досягає максимуму у точці найбільшої інтенсивності випромінювання та поступово спадає при виході з нього. Після оцифровки для отриманого імпульсу розраховуються такі параметри як висота H ширина W та площа A.

Незначні коливання струму в детекторі за відсутності зразка або наявність дрібних часток у рідині викликають невеликі зміни напруги. Щоб прилад не враховував ці перешкоди під час підрахунку та аналізу подій встановлюється порогове значення напруги нижче якого будь які сигнали ігноруються системою.



**Рис. 5.** Схема, формування електричного сигналу при проходженні кліткою лазерного променя і основні параметри його аналізу.

Якщо прилад оснащений двома і більше лазерними джерелами, то в ньому передбачено суміщення даних, отриманих при послідовному проходженні однієї клітиною різних лазерних променів. Це здійснюється за рахунок точного вимірювання часу, що витрачається клітиною на шлях від одного лазера до іншого і автоматичного обліку цього часу програмою збору даних.

Результатом вимірювання зразка є сформований файл, в якому у вигляді таблиці записані дані з усіх робочих детекторів для кожної із зареєстрованих подій (об'єктів) (*рис. 6 А*). Для полегшення обробки отриманих даних вони

можуть бути представлені в графічному вигляді. Найбільш поширеними формами графічного представлення даних є точкова діаграма (*рис. 6 Б*) і гістограма (*рис. 6 В*). У першому випадку на осях діаграми відкладаються будь-які два з виміряних параметрів. Кожне з подій відображається точкою, координати X і Y якої відповідають значенням сигналу для обраних параметрів. У другому випадку для відображення на гістограмі вибирається тільки один параметр, значення якого відкладаються по осі X. По осі Y відкладається кількість подій для кожного із значень X.



**Рис. 6.** Основні форми представлення результатів проточної цитофлуориметрії: таблиця даних (А), точкова діаграма, на осях X і Y якої відкладені будь-які два обрані параметра (Б), гістограма, на осі X якої відкладений один з параметрів, а на осі Y − кількість подій, зареєстрованих для кожного із значень обраного параметра (В).

Отриманий сигнал надходить до комп’ютерної системи, де проходить цифрову обробку, після чого результати подаються у вигляді графіків та

гістограм. Програмне забезпечення, яке застосовується у проточній цитометрії, надає можливість за допомогою спеціальних інструментів виділяти на побудованих діаграмах окремі групи подій або клітин, визначати їх відсоткову частку, зіставляти рівень прояву досліджуваних характеристик у різних клітинних популяціях та виконувати статистичну обробку отриманих даних.

Сучасні прилади для проточної цитометрії умовно поділяють на два основні типи. До першого належать відносно прості аналізатори, які здатні реєструвати флуоресценцію на двох або більше довжинах хвиль, а також світлорозсіювання під малими та великими кутами. Другу групу становлять багатофункціональні клітинні сортери, що дозволяють одночасно вимірювати п’ять і більше клітинних або ядерних параметрів і, окрім аналізу, виконувати фізичне сортування частинок із заданими характеристиками.

У проточному цитометрі, обладнаному системою для сортуванню клітин, проточний осередок закріплений на п'єзокристалі. При подачі на нього напруги кристал разом з осередком здійснює коливання із заданою частотою, внаслідок чого струмінь рідини з клітинами розбивається на окремі краплі. Проходячи крізь заряджаюче кільце, крапля може придбати позитивний або негативний заряд залежно від того, яка клітина міститься у середині краплі. Пролітаючи повз пластини, що відхиляють, крапля з клітиною притягується до них, виходить з основного потоку і потрапляє в пробірку. Метод сортування клітин на проточному цитометрі дозволяє отримати популяції клітин з високою чистотою (до 99.9% позитивних клітин) у відсортованій фракції.

## 1.4 Суть методу проточної цитометрії

Робота методу полягає у пропусканні клітин через лазерний промінь. Під час проходження світло розсіюється, а специфічні маркери на клітинній поверхні або всередині клітини можуть випромінювати флуоресценцію. Це дозволяє визначати такі компоненти, як білки, ДНК і РНК, та отримувати детальні відомості про розмір, форму, зернистість і молекулярний склад клітин.

Спочатку клітини виділяють із крові, тканини чи іншого біологічного матеріалу. Для їхнього розпізнавання використовують флуоресцентні мітки, які зв’язуються з певними білками, нуклеїновими кислотами або внутрішньоклітинними структурами. Підготовлений зразок надходить у рідинну систему цитометра, де клітини рухаються вузьким потоком і поодинці потрапляють у лазерний промінь. Під дією світла флуоресцентні маркери випромінюють світло з різною довжиною хвиль залежно від свого типу.

Детектори реєструють як пряме, так і бічне розсіювання світла, а також сигнали флуоресценції. Отримані дані передаються в комп’ютерну систему, яка аналізує їх і створює детальні профілі клітин відповідно до їхніх фізичних і хімічних характеристик.

## 1.5 Типи флуорохромів і маркерів

Аналіз флуоресценції клітин дозволяє отримати найбільшу кількість інформації про досліджуваний зразок, оскільки навіть клітини з ідентичною морфологією можуть відрізнятися за складом білків і інших макромолекул в залежності від виконуваної функції, стадії клітинного циклу і т.д. Флуоресценція клітини може виникати як за рахунок власних хімічних сполук (автофлуоресценція), так і за рахунок застосування спеціальних барвників. Застосовуються барвники, які специфічно зв'язуються з тими чи іншими структурами і компонентами клітин (наприклад, пропідіум йодид, що зв'язується з ДНК) або кон'югати барвників з моноклональними антитілами, специфічними до певних мембранних та цитоплазматичних антигенів клітини.

До найпоширеніших флуорохромів належать:

- **FITC** (*Fluorescein isothiocyanate*, флуоресцеїн ізотіоціанат) - зелена флуоресценція, збуджується лазером 488 нм, використовується для мічення поверхневих антигенів.

- **PE** (*Phycoerythrin*, фікоеритрин) - інтенсивне червоно-оранжеве світіння, висока яскравість, підходить для виявлення маркерів з низькою експресією.
- **PerCP** (*Peridinin-Chlorophyll-Protein*, перидинин-хлорофіл-білок) - червоне світіння, часто застосовується у багатокольоровому аналізі.
- **APC** (*Allophycocyanin*, алофікоціанін) - дальньочервона флуоресценція, ефективний при збудженні червоним лазером.
- Комбіновані флуорохроми, наприклад **PE-Cy5**, **APC-Cy7**, створені для розширення спектра аналізу та зменшення перекриття сигналів.



**Рис. 7.** Схема, що ілюструє принцип інтерпретації даних флуоресценції об'єктів при використанні одного барвника: інтенсивність флуоресценції свідчить про кількість сайтів зв'язування барвника з кліткою.

Система для реєстрації світіння флюоресцентних міток складається з комплексу світлофільтрів і фотопомножувачів, кожен з яких реєструє випромінювання в діапазоні довжин хвиль, що відповідають флуорохрому.

Вибір типу і кількості флюоресцентних барвників визначається метою дослідження.

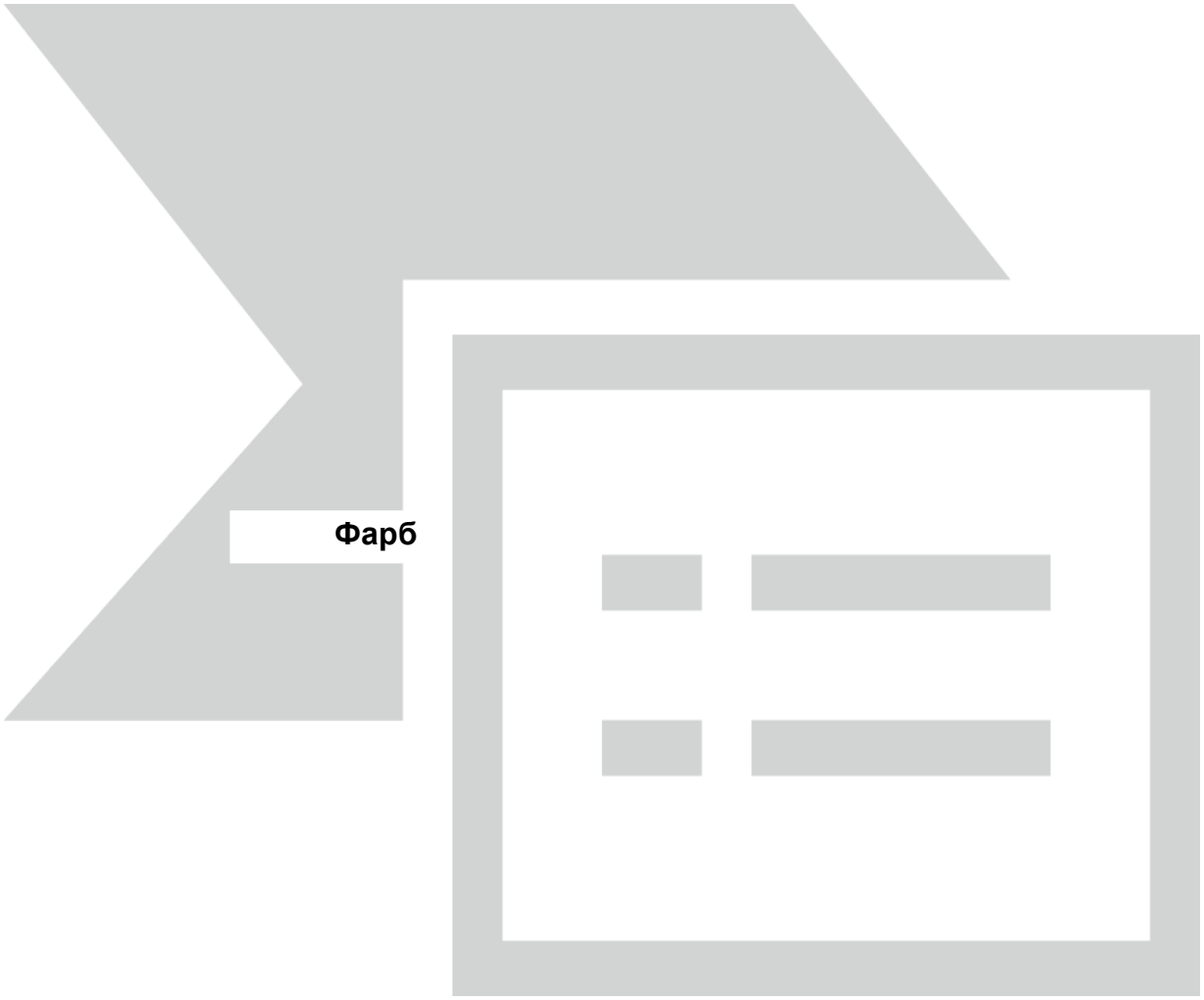



**Рис. 8.** Схема, що ілюструє принцип інтерпретації даних флуоресценції об'єктів при використанні декількох барвників: зіставлення інтенсивності сигналу на різних детекторах дозволяє виділити в зразку популяції клітин з різним поєднанням досліджуваних ознак.

Основними типами таких барвників є моноклональні антитіла, кон’юговані з флюоресцентною міткою: **флуоресцеїн (FITC)**, **фікоеритрин (PE)**, **барвник з перенесенням енергії (ECD)** та інші (**APC**, **PC5**, **PC7**, **PerCP**), які застосовуються для визначення мембранних і цитоплазматичних антигенів клітини.

Флуорохром флуоресцеїн ізотіоционат (FITC) уловлюється FL-1-детектором (зелена флюоресценція), фікоеритрин (PE, RD1) – FL-2-детектором (оранжева флюоресценція), перидинінхлорофіл протеїн (Per-CP) і тандемний

барвник ціанін-5/фікоеритрин (Cy5/PE) – FL3 детектором (глибока червона флюоресценція), алофікоціанін (APC) – FL-4 детектором.

Перші два збуджуються однієї і тієї ж лінією спектра, випущеною аргоновим лазером (тобто 488 нм), але випромінюють світло в різних областях спектру: перший − 515–525 нм, а другий − 575–585 нм, що дозволяє розвести їх флуоресценцію за різними фотоелектронними помножувачами. На моноклональні антитіла можуть ковалентно пришиватися відразу два барвника, наприклад фікоеритрин і Техаський червоний.

Таким чином, якщо ми маємо МА до **CD3, CD4 і CD8**, мічені цими флуорохромами, ми можемо відразу кількісно охарактеризувати зміст у периферичній крові **Т-клітин, Т-хелперів і цитотоксичних Т-лімфоцитів**.

Оскільки сучасні цитометри, як правило, обладнані більш ніж трьома фотоелектронними помножувачами (від 3 до 9 ФЕУ), це дозволяє на одному зразку периферичної крові проаналізувати практично всі основні субпопуляції клітин.

Флюоресцентні барвники надають можливість оцінювати життєздатність клітин за допомогою таких маркерів як 7AAD або PI. Для виконання подібних досліджень застосовують флуорофори що здатні зв'язуватися з нуклеїновими кислотами наприклад DAPI та Hoechst. Також у практиці використовують спеціальні pH чутливі сполуки такі як Fluo 3 або іон залежні флуорофори на кшталт Indo 1.

На практиці ідентифікація різних типів клітин відбувається за допомогою специфічних антигенів та відповідних моноклональних антитіл:

- Антигени CD3 визначають шляхом використання моноклональних антитіл ОКТ 3 ОКТ 1 або Leu 4.
- Для виявлення антигенів CD4 застосовують мітки ОКТ 4 та Leu 2a.
- Антигени CD8 ідентифікують за допомогою ОКТ 8 та Leu 3a.
- Маркери CD2 визначаються завдяки використанню антитіл ОКТ 11.
- Антигени групи CD1 виявляють через застосування моноклональних антитіл ОКТ 6.

- Показники ОКТ 9 та ОКТ 10 характерні для претимічних клітин а також для незрілих або активованих Т лімфоцитів.
- Зрілі В лімфоцити розпізнають за допомогою міток ОКВ 1 та Leu 12.
- Молоді форми В лімфоцитів ідентифікують через антитіла ОКВ 2.
- Для визначення моноцитів гранулоцитів та натуральних кілерів використовують маркери ОКМ 1 та Leu 7.

Вибір флуорохрому залежить від параметрів лазерів проточного цитометра, кількості одночасно досліджуваних маркерів і необхідності уникнути спектральної інтерференції між каналами. При багатокольоровому аналізі ретельно підбирають комбінації барвників, щоб забезпечити максимальну чутливість і точність вимірювань.

## 1.6 Використання моноклональних антитіл (CD - маркери – кластери диференціювання)

Використання моноклональних антитіл (МКА) в проточній цитометрії дозволяє детально охарактеризувати популяції клітин за експресією поверхневих і внутрішньоклітинних антигенів. Це має важливе значення в клінічній лабораторній діагностиці, імунології, гематології, онкології та трансплантології.

Моноклональні антитіла - це антитіла, які продукуються гібридомними клітинами (гібридомами), отриманими в результаті злиття сенсибілізованих В-лімфоцитів із мієломними клітинами. Такі антитіла є високоспецифічними і розпізнають лише один епітоп антигену.

В проточній цитометрії МКА використовуються у вигляді кон’югатів із флуорохромами, що дозволяє одночасно ідентифікувати кілька клітинних антигенів у межах однієї проби. Це дає змогу:

- визначати субпопуляції лімфоцитів (Т-, В-, NK-клітини);
- виявляти клітини певних ліній або стадій диференціювання;
- оцінювати ступінь активації клітин;
- діагностувати і моніторувати імунодефіцитні стани

(наприклад, ВІЛ-інфекцію);

- уточнювати фенотипи пухлинних клітин при лейкозах і лімфомах;
- здійснювати імунологічний моніторинг після трансплантації органів і тканин.

Основою імунологічної класифікації клітин є система кластерів диференціювання, відома як CD, яка об’єднує поверхневі маркери, що виявляються за допомогою різних моноклональних антитіл і зв’язуються з певними структурами клітинної мембрани. Кожному такому кластеру присвоєно окремий порядковий номер, наприклад CD3, CD4, CD8, CD19 або CD56. Залежно від того, до яких типів клітин належать відповідні антигени, розрізняють кілька основних груп маркерів. До Т-клітинних відносять антигени, характерні для різних субпопуляцій Т-лімфоцитів, до В-клітинних маркерів належать антигени, притаманні клітинам В-лімфоцитарного ряду, а для NK-клітин характерні власні специфічні поверхневі показники. Окремо виділяють групу мієлоїдних антигенів, а також маркери, що відображають стан активації та проліферативну активність клітин.

Для дослідження експресії поверхневих антигенів клітини інкубують з відповідними моноклональними антитілами, міченими флуорохромами. Після завершення інкубації клітинну суспензію промивають, ресуспендують у буферному розчині та піддають аналізу за допомогою проточного цитометра. Кожен флуорохром має власний спектр збудження і випромінювання, тому при опроміненні світлом певної довжини хвилі він випромінює світло іншої довжини, яке реєструється відповідними детекторами приладу.

Результати дослідження зазвичай подають у вигляді відсотка позитивних клітин, а також візуалізують у формі гістограм або точкових діаграм, що відображають інтенсивність флуоресценції. Застосування моноклональних антитіл у проточній цитометрії значно розширює можливості вивчення клітинного складу периферичної крові, кісткового мозку, лімфатичних вузлів і пухлинних тканин та забезпечує отримання точної й об’єктивної характеристики

різних клітинних популяцій.

## 1.7 Сфери застосування проточної цитометрії в медицині

Застосування проточної цитометрії (також згадується як цитофлуориметрія ) є надзвичайно широким завдяки її унікальній здатності до **швидкого, точного та багатопараметричного аналізу окремих клітин**.

### 1.7.1 Імунологія та клінічна діагностика

Проточна цитометрія є **"золотим стандартом"** в імунології для дослідження імунокомпетентних клітин.

**Імунофенотипування (Кількісний Аналіз)**

Метод дозволяє кількісно визначити основні популяції лімфоцитів (Т-, В-лімфоцити та натуральні кілери (NK-клітини)) та їхні субпопуляції. Розподіл лімфоцитів заснований на їх біологічних функціях та експресії ними поверхневих клітинних антигенів. Визначення процентного співвідношення Т- та В-лімфоцитів, натуральних кілерів використовують для характеристики **імунодефіцитних** та **аутоімунних станів**, пухлинних та вірусних захворювань.

- **Т-лімфоцити:** Виявляють загальні Т-клітини (CD3+) та їхні основні субпопуляції - **Т-хелпери** (CD3+CD4+) і **цитотоксичні Т-лімфоцити** (CD3+CD8+).
- **В-лімфоцити:** Ідентифікують за маркерами CD19+ та CD20+.
- **NK-клітини:** Виявляють за фенотипом CD3−CD16+CD56+.
- **Імунорегуляторний індекс (IPI):** Обчислення співвідношення CD4/CD8 є важливим показником.
- **Діагностика Імунодефіцитів:** Фенотипування лімфоцитів є діагностично значущим при **первинних і вторинних імунодефіцитах**.
- **Скринінг на HLA-B27:** Метод використовують для виявлення експресії антигену HLA-B27 на Т-лімфоцитах для скринінгу серонегативних

спондилоартропатій.

### 1.7.2 Гематологія та Онкологія (Онкогематологія)

У цій сфері проточна цитометрія дозволяє ідентифікувати та класифікувати клітинні патології.

- **Діагностика Лейкозів та Лімфом:** Імунофенотипування гострих лейкозів та лімфом є однією з основних функцій проточної цитометрії.
- **Моніторинг Мінімальної Залишкової Хвороби (MRD):** Велика перевага проточної цитометрії полягає в можливості **детектувати рідкісні події** (аномальні клітини).
- **Аналіз Плазматичних Клітин:** Використовується для ідентифікації аномальних плазматичних клітин (CD45+CD38+CD138+) у зразках кісткового мозку.
- **Підрахунок Стовбурових Клітин:** Ідентифікація та перерахунок CD45+CD34+-стовбурових клітин у біологічних зразках (кров, кістковий мозок).
- **Аналіз Клітинного Циклу (ДНК-цитометрія):** Визначення розподілу клітинної популяції за фазами циклу (G0/G1,S,G2/M).

# РОЗДІЛ 2 МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ПРОТОЧНОЇ ЦИТОМЕТРІЇ

## 2.1. Стадії підготовки клітин

Підготовка зразка для проточної цитометрії включає кілька послідовних етапів, які забезпечують високу якість і достовірність результатів. Першим кроком є лізис еритроцитів - руйнування червоних кров'яних клітин, які можуть заважати аналізу, оскільки вони не мають ядра і не несуть специфічних маркерів, важливих для дослідження. Для цього застосовують спеціальні лізуючі розчини, які вибірково знищують еритроцити, залишаючи незмінними лімфоцити та інші мононуклеарні клітини.

Після лізису проводять промивання клітин для видалення залишків лізуючого розчину та метаболітів. Це необхідно для підтримання оптимальних умов середовища та уникнення несприятливого впливу на клітини в наступних етапах підготовки.

Наступний етап полягає в інкубації клітин з моноклональними антитілами, міченими флуорохромами. Антитіла специфічно зв'язуються з відповідними клітинними маркерами, що дозволяє ідентифікувати типи клітин та їх функціональний стан. Інкубація проводиться за певних температурних і часових умов, що забезпечує максимальну ефективність зв'язування.

За потреби, після мічення антитілами клітини можуть піддаватися фіксації - обробці спеціальними фіксуючими розчинами, які стабілізують структуру клітин і зберігають їх характеристики для подальшого зберігання або транспортування. Фіксація також допомагає знизити ризик деградації клітинного матеріалу під час аналізу.

### 2.2.1 Виділення лімфоцитів з периферичної крові методом градієнтного центрифугування

Як правило, дослідження лімфоцитів в лабораторії включає етап виділення

фракції мононуклеарних лейкоцитів (лімфоцитів) з периферичної крові. З цією метою використовують метод виділення клітин на градієнті щільності фікол-пак (вірографін), при цьому клітини розташовуються в шарах градієнта з відповідною щільністю, оскільки вони розрізняються по величині і щільності.

Кров необхідно перенести у центрифужні пробірки, необхідний об’єм крові 10 мл. Існують два варіанти підготовки крові перед нашаруванням її на градієнт щільності.

1. Робота з цілісною кров'ю: зібрану в пробірки гепаринізовану кров розвести равним об'ємом фосфатно-сольового буфера (рН 7,2).

2. Робота з лейкоцитарною суспензією включає послідовне виконання наступних дій:

- помістити пробірку з гепаринізованою кров'ю на 30 хв в термостат при 37°С для попереднього осідання еритроцитів;

- зібрати лейкосуспензію, не чипаючи осіли еритроцити, і перенести її в чисту пробірку;

- видалення тромбоцитів здійснюється ценрифугуванням лейкоцитарної суспензії протягом ІО хв при 300 g (1000 об./хв). Надосадову рідину, що містить тромбоцити, удаляють;

- лейкоцити, що залишилися на дні пробірки у вигляді осаду розвести розчином Хенкса до об’єму 2 мл і ресуспендіровати.

Після цього етапу процедуру виділення клітин проводять за стандартизованим протоколом. Для ізоляції лімфоцитів і моноцитів готують градієнт щільності з показником 1,076 г/мл, який отримують шляхом змішування фіколу з паком або верографіном у відповідній пропорції. На підготовлений розчин обережно нашаровують зразок крові, у результаті чого формується чіткий ступінчастий градієнт щільності між плазмою та шаром фіколу, що забезпечує коректне розділення клітинних елементів.

Під час центрифугування еритроцити та гранулоцити, які мають більшу щільність, проходять крізь шар фіколу та осідають на дні пробірки. Водночас мононуклеарні клітини, до яких належать лімфоцити та моноцити, затримуються

на межі поділу середовищ і формують характерне світле кільце в інтерфазі. Такий підхід дає змогу ефективно розділяти клітинні популяції залежно від їхньої щільності, яка може бути меншою або більшою за значення 1,076 г/мл.

Для отримання збагаченої та більш чистої популяції гранулоцитів використовують градієнт із вищою щільністю, що становить 1,120 г/мл. У разі необхідності одночасного виділення мононуклеарів і гранулоцитів застосовують двошаровий градієнт щільності. Його готують шляхом послідовного нашарування по 1,0 мл відповідних розчинів, при цьому спочатку в пробірку вносять середовище з щільністю 1,120 г/мл, а поверх нього обережно додають шар із щільністю 1,076 г/мл. Із гепаринізованої крові попередньо відбирають плазму та розводять її середовищем 199 у співвідношенні 1:1, після чого отриману суміш повільно наносять на стінку пробірки з підготовленим подвійним градієнтом, уникаючи перемішування шарів.

Після завершення центрифугування еритроцити проходять крізь усі шари градієнта та накопичуються на дні пробірки. Мононуклеарні клітини формують кільце у верхній інтерфазі, тоді як гранулоцити концентруються у нижньому шарі, що дозволяє досягти високої чистоти виділення, яка може сягати близько 99 відсотків. Потрібний клітинний шар обережно відбирають у чисту пробірку та двічі промивають середовищем 199 протягом п’яти хвилин при швидкості центрифугування 1500 обертів за хвилину для видалення залишків градієнтного розчину. Отриманий після цього клітинний осад ресуспендують в 1 мл поживного середовища, що робить його придатним для подальших експериментальних досліджень або аналітичних процедур.

***Матеріали і устаткування:*** 1. Фікол-400 − полісахарид. 2. Пак − рентгенконтрастна речовина (аналоги: верографін, триомбраст, урографін та ін.). 3. Середовище 199. 4. Стерильна дистильована вода. 5. 3% розчин оцтової кислоти. 6. Центрифуга з бакет-ротором. 7. Ареометр з межами вимірів від 1.060 г/см до 1.090 г/см 8. Камера Горяєва. 9. Мікроскоп. 10. Лабораторний посуд, конічні центрифужні пробірки, ваги для урівноваження центрифужних пробірок та ін.

***Опис методу***

1. Приготування 9% розчину фіколу (9г фіколу-400 розчиняють в 100 мл дистильованої води на водяній бані при 100°С).

2. Приготування 33,8% розчину рентгенконтрастної речовини (наприклад, верографіну): (20 мл 76% верографіну розводять в 25 мл дистильованої води).

3. Приготування градієнта щільності: для отримання градієнта щільності розчин фіколу додають до верографіну, а не навпаки. Для отримання градієнта щільності 1,076 г/мл сполучають 20 мл 76% верографіна, 100 мл фіколу і 25 мл дистильованої води. Для отримання градієнта щільності 1,120 г/мл сполучають 40 мл 76% верографіну, 60 мл фіколу і 45 мл дистильованої води. Щільність вимірюють ареометром. Якщо щільність вища, ніж необхідно, то додають розчин фіколу, якщо нижче − розчин верографіну. Градієнт щільності можна зберігати впродовж 30 діб при температурі +4 в склянці з помаранчевого скла.

Складають подвійний градієнт обережно, нашаровуючи один на одного по 1,0 мл розчинів, спочатку градієнт щільності 1,120, а потім 1,076. З гепаринізованої крові відбирають плазму, розводять середовищем 199 1:1, нашаровують поволі на стінку пробірки з приготованим градієнтом щільності.

За відсутності фікола градієнт щільності можна приготувати тільки з однієї рентгенконтрастної речовини. З цією метою 10 (20) мл 76% розчину верографіну змішати з 43,1 (86,2) мл дистильованої води і додати 0,45 (0,9) мл 0,1% розчину хлористого натрію. Отриманий при цьому 14,3% розчин верографіну має щільність 1,077 г/мл і може бути використаний в якості градієнта щільності.

4. Виділення лімфоцитів: периферичну кров з ліктьової вени в об'ємі 10 мл беруть в пробірку, що містить гепарин, в кінцевій концентрації 25 ОД/мл крові (1 мл розчину гепарину, що має концентрацію 200-250 ОД/мл). Кров повинна відстоятися впродовж 40-60 мін при кімнатній температурі до чіткого розподілу еритроцитів і плазми.

4а. У центрифужну пробірку наливають 2-3 мл градієнта щільності, на нього нашаровують 4-6 мл плазми, що відстоялася, і верхній шар еритроцитів. Співвідношення об'ємів градієнт: плазма витримують в межах 1:2 − 1:4.

4b. Пробірки центрифугують впродовж 30 мін в бакет-роторе з прискоренням 300 g (1500 об/хв) при температурі +4°С, при виділенні тільки мононуклеарів допускається температура + 20°С. Величину відносного відцентрового прискорення g обчислюють за формулою: $g = 1{,}11 \times 10^{-5} \times n^2 \times r$ (n − число обертів за хвилину, r − радіус від центру осі центрифуги до межі зіткнення суміші фікол-пака з суспензією, що розділяється, в см).

Існує номограмма, що виражає залежність відносного прискорення центрифуги (rcf) від швидкості обертання ротора (n) і радіусу (r) − середнього радіусу обертання стовпчика рідини в центрифужной пробірці (тобто відстані від осі обертання до середини стовпчика рідини). Радіус вимірюється (см) від осі обертання ротора до середини стовпчика рідини в пробірці, коли утримувач знаходиться в положенні центрифугування (*рис. 9*).

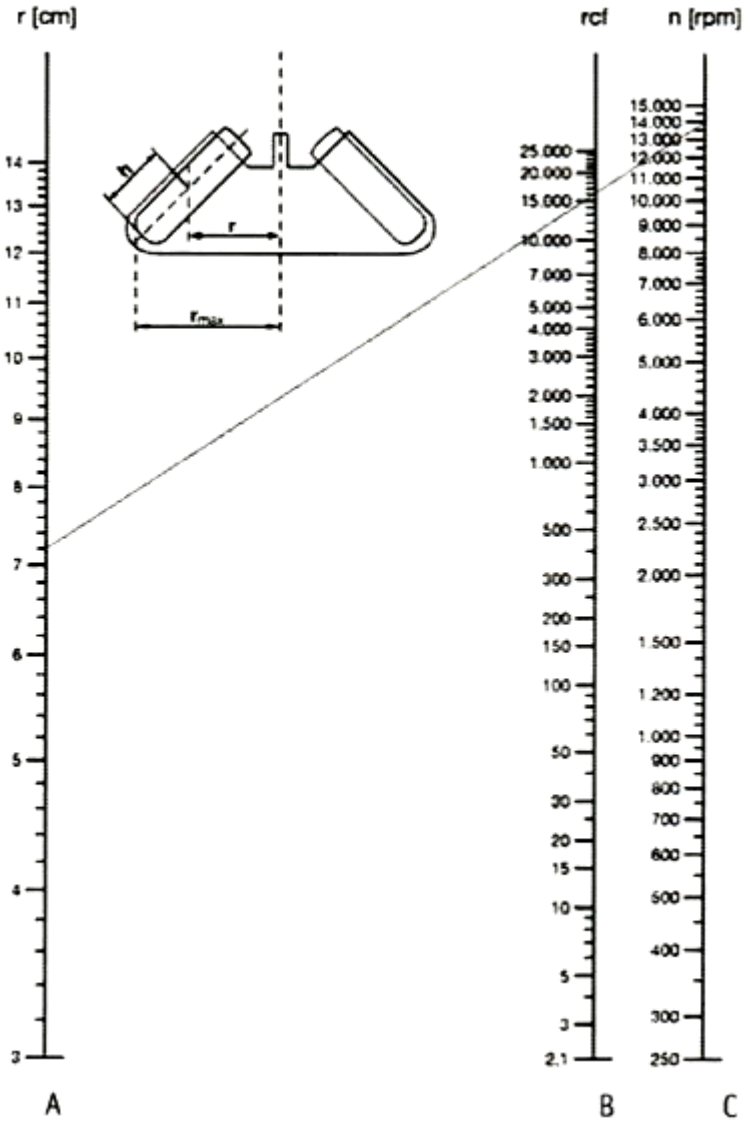



**Рис. 9.** Номограма для визначення відносного прискорення центрифуги (rcf) в залежності від швидкості обертання і діаметра ротора, де r − радіус ротора, см; n − швидкість обертання ротора, оборотів в хвилину; rcf (relative centrifuge force) − відносне прискорення центрифуги.

Радіус центрифугування rmax − це відстань від осі обертання ротора до дна гнізда ротора. Для визначення прискорення за допомогою лінійки сполучаємо значення радіусу і числа оборотів на і на шкалі rcf визначаємо його величину.

*Приклад:* на шкалі А відзначаємо значення rрадіуса для ротора − 7,2 см, на шкалі З відзначаємо значення швидкості ротора -14000 об/хв, з'єднуємо ці дві точки. Точка перетину утвореного відрізка зі шкалою В показує значення прискорення для даного ротора. В даному випадку відносне прискорення

дорівнює 15000.

В процесі центрифугування еритроцити і гранулоцити "провалюються" в градієнт і осідають на дно пробірки. На верхній межі градієнта при правильному розподілі утворюється рихле кільце білуватого кольору, що складається в основному з лімфоцитів з домішкою моноцитів. Над шаром лімфоцитів знаходиться плазма.

Плазму збирають в окрему пробірку для наступного аналізу на імуноглобуліни; лімфоцити відсисають в суху конічну центрифужну пробірку.

Лімфоцити збирають в суху конічну центрифужну пробірку. До суспензії лімфоцитів додають 3-4 мл середовища 199, що містить 10% розчин телячої сироватки, і вміст пробірки ретельно перемішують. Після цього пробірки центрифугують з прискоренням 200-300 g при температурі 20°С, потім надосадкову рідину видаляють, а процедуру відмивання повторюють ще один раз.

4с. Після відмивання готують робочу концентрацію лімфоцитів, що містить $2x10^6$ клітин в 1 мл. До суспензії лімфоцитів додають 3-4 мл середовища 199, що містить 10 % розчин телячої сироватки, і вміст пробірки ретельно перемішують. Після цього пробірки центрифугують з прискоренням 200-300 g при температурі 20°С, потім надосадкову рідину видаляють, а процедуру відмивання повторюють ще один раз. Приготовлену за цією методикою суспензію лімфоцитів можна зберігати при температурі +4°С впродовж 2 годин.

Замість середовища 199 можна використовувати будь-який буферний розчин pH 7,0-7,2 без іонів Са2+ (наявність іонів Са2+ сприяє конгломерації клітин, їх коагуляції). сироватки IV (АВ) групи крові людини. При використанні останньою потрібна інактивація при 56 °С впродовж 30 мін і абсорбція еритроцитами. Для цього 0,5 мл осаду відмитих еритроцитів додають до 1 мл сироватки і інкубують впродовж 1 ч при 37 °С, періодично струшуючи. Бажана абсорбція сироватки пулом лейкоцитів, враховуючи можливість наявності антилейкоцитарних антитіл. При використанні людської сироватки необхідно враховувати вплив аутоцитолімфотоксинів, що проявляють максимум

активності при 4 °C.

4d. Після відмивання готують робочу концентрацію лімфоцитів, що містить $2\times10^6$ клітин в 1 мл (20 клітин у великому квадраті камери Горяєва).

5. Після центрифугування на градієнті щільності другий інтерфазний шар складатимуть гранулоцити. Після відбору лімфоцитів шар гранулоцитів відбирають в пробірку, відмивають двічі середовищем 199 по 5 хв при 1500 об/хвн. Отриманий клітинний осад розводять в 1 мл живильного середовища.

### 2.2.2 Лізис еритроцитів (ручний та автоматичний режими)

Ручний режим лізису еритроцитів зазвичай має на увазі обробку зразка крові спеціальними хімічними реагентами (наприклад, амонієвим хлоридом) вручну. Цей процес включає етапи додавання лізуючого розчину, інкубацію протягом визначеного часу при кімнатній температурі або у інших умовах, а потім центрифугування для відділення лізисованих еритроцитів від інших клітин. Метод зручний для невеликої кількості зразків і забезпечує добру якість лізису з мінімальним впливом на інші клітини, наприклад лейкоцити.

Автоматичний режим лізису еритроцитів реалізується за допомогою спеціалізованих лабораторних автоматів або пристроїв, які оптимізують час і умови лізису, часто включаючи автоматичне додавання реагентів, змішування, інкубацію та подальше відокремлення клітин. Автоматичні системи забезпечують більш високу стандартизацію процедури, підвищену продуктивність та зменшують людський фактор. В деяких випадках при автоматичному лізисі застосовують спеціальні буфери (наприклад, ACK buffer) та умови, які мінімізують пошкодження інших клітинних елементів.

**Реагенти для лізису еритроцитів в ручному і автоматичному режимах:**

• Whole Blood Lysing Reagents − лизис еритроцитів за рахунок мурашиної кіслоти з подальшою її нейтралізацією і фіксацією клітин параформальдегідом;

• IOTest® 3 Lysing Solution − розчин на основі хлориду амонію ($NH_4Cl$), який є активним інгредієнтом лізуючого розчину;

• OptiLyse 3 − лізис еритроцитів за рахунок сапоніну з подальшою фіксацією клітин параформальдегідом;

• VersaLyse − ферментативний лізис еритроцитів − головним активним інгредієнтом реактиву VersaLyse є циклічний амін; в присутності карбоангидрази еритроцитів він перетворюється в з'єднання, що володіє високою літичною активністю щодоцих клітин;

• ImmunoPrep® − реагент для автоматичного лізису зрітроцітов для безотмивочної технології; якісний лізис еритроцитів; відсутність морфологічних змін в клітинах інших типів; високий рівень стандартизації. Лизис зрітроцітов за рахунок мурашиної кислоти з подальшою її нейтралізацією і фіксацією клітин параформальдегіду.

### 2.2.3 Підрахунок клітин у камері Горяєва

Для підрахунку кількості лімфоцитів в камері Горяєва заздалегідь готуємо розчин фарбника – генциан-фіолетового. Для приготування фарбника 10 г сухої фарби розводимо 100 мл 96° спирту, настоюємо декілька днів, часто струшуючи. Приготований розчин додаємо до 3% оцтової кислоти. До 200 мкл отриманого фарбника вноситься 10 мкл отриманої клітинної суспензії. Після забарвлення генциан-фіолетовим нейтфріли в камері Горяєва добре контурують, можливі еритроцити руйнуються оцтовою кислотою.

Перед приготуванням робочої концентрації лічать початкову кількість лімфоцитів :

- до 0,1 мл осаду відмитих клітин додають 0,9 мл середовища 199, суспензію ретельно перемішують;

- в чисту пробірку вносять 0,38 мл 3% розчину оцтової кислоти і 0,02 мл (20 мкл) суспензії лімфоцитів (мононуклеаров) у співвідношенні 20:1, суспензію ресуспензують;

- в камері Горяєва підраховують лімфоцити (мононуклеари) в 25 великих квадратах і отримане число множать на 50. Розрахунок концентрації клітин

проводимо по загальноприйнятих правилах з урахуванням розведення фарбником. В результаті, отриману кількість клітин множимо на 50000 і отримуємо концентрацію нейтрофілів в 1 мл живильного середовища. Доводимо концентарцію клітин до стандартного розведення – 1 х$10^6$ в 1 мл.

Результат відповідає кількості лімфоцитів в 1 мл суспензії 9кількість клітин дорівнює 1х$10^6$/мл або 1х$10^9$/л). Наприклад, в 25 квадратах підраховане 20 клітин: 20х50=1000, що відповідає 1х$10^9$/л. Оптимальний вміст клітин в суспензії 0,8 – 1,5х$10^9$/л. при недостатній кількості клітин необхідно провести додаткове центрфугування, убрати надосад и знову провести підрахунок клітин. При вмісті клітин більше 1,5х$10^9$/л необхідно розвести суспензію розчином Хенкса до робочої концентрації.

Приготовану за цією методикою суспензію лімфоцитів бажано залучати в реакції відразу, її можна зберігати при температурі + 4°С впродовж 2 годин.

## 2.2 Вибір панелей антитіл для аналізу

Вибір панелей моноклональних антитіл для проточної цитометрії повинен базуватися на чітко сформульованій науковій або клінічній задачі та технічних можливостях лабораторії. Панель антитіл у цьому контексті розуміється як сукупність моноклональних антитіл, кожне з яких кон'юговане з певним флуорохромом і застосовується одночасно для ідентифікації й кількісного та якісного характеристики клітинних субпопуляцій у досліджуваному зразку. Головним завданням при проєктуванні панелі є отримання максимально інформативного сигналу за мінімальної кількості артефактів (зокрема спектрального перекриття, хибної експресії або стеричного гальмування) при збереженні високої чутливості та специфічності аналізу.

Першочерговим етапом розробки панелі є визначення біологічного чи клінічного запиту, який має бути вирішений за допомогою цитометричного дослідження. Це може бути рутинне імунофенотипування периферичної крові, пошук рідкісних клітин (наприклад, мінімальна залишкова хвороба),

класифікація гематологічних неоплазій (диференціація мієлоїдної та лімфоїдної ліній) або проведення функціональних тестів (аналіз апоптозу, кальцій-залежних відповідей, продукції цитокінів тощо). Визначення мети експерименту визначає склад маркерів, необхідну кількість кольорів і бажану межу виявлення.

Наступним кроком є формування списку маркерів, що включає як «ядро» лінійних маркерів (lineage), так і функціональні або активаційні маркери. Для стандартного фенотипування лімфоцитів «ядро» зазвичай включає CD45, CD3, CD4, CD8, CD19 та CD16/CD56. Для оцінки функціонального стану додають маркери активації й диференціювання, наприклад CD25, CD38, HLA-DR, CD45RA/CD45RO, Ki-67, CD69. У гематологічній діагностиці формуються спеціалізовані панелі з маркерами мієлоїдної, B- і T-ліній (наприклад CD13, CD33, CD117, MPO для мієлоїдної лінії; CD19, CD20, CD10 для B-лінії; CD2, CD5, CD7, CD34, TdT для популяцій незрілих клітин). Конкретний набір маркерів обирається з урахуванням можливих діагностичних варіантів і наявності контрольних зразків для валідації.

Паралельно з вибором маркерів необхідно врахувати конфігурацію цитометра: кількість і довжини хвиль лазерів, набір детекторів і світлофільтрів, а також чутливість окремих каналів. Підбір флуорохромів має узгоджуватися з можливостями приладу: деякі барвники збуджуються одним лазером, але дають сигнали в різних діапазонах, які приймаються різними детекторами. Така узгодженість забезпечує коректну реєстрацію флуоресценції і спрощує процедуру компенсації спектрального перекриття.

Парування антиген - флуорохром є ключовим принципом у дизайні панелі. Для низькоекспресованих антигенів слід обирати яскраві флуорохроми (наприклад PE, APC або сучасні «brilliant» барвники), тоді як для високоекспресованих маркерів прийнятні менш яскраві барвники (як-от PerCP або FITC). Такий підхід підвищує співвідношення сигнал/шум і зменшує ризик втрати можливості відрізняти позитивні клітини від фону. Під час парування також слід передбачати потенційні проблеми з так званим steric hindrance: якщо два антитіла націлені на близькорозташовані епітопи, їх комбінація може

знижувати зв’язування; у таких випадках експериментально перевіряють альтернативні клони або змінюють порядок нанесення антитіл.

Спектральне перекриття флуорохромів є невід’ємною проблемою багатоколірної цитометрії, тому проєктування панелі повинно мінімізувати сумісне використання фарбників із великим spillover на маркерах, що часто коекспресуються. Для коректної компенсації обов’язково виконують single-stain контролі (по одному антитілу/флуорохрому) та використовують компенсаційні кулі або спеціальні клітинні контролі для побудови матриці компенсації. Додатково рекомендується застосовувати FMO (Fluorescence Minus One) контроли для коректного встановлення воріт у багатоколірних панелях.

Підбір конкретних клонів антитіл та постачальників має спиратися на валідацію у науковій літературі або рекомендації виробників для проточної цитометрії. Одна й та сама цільова молекула може бути доступна в різних клональних варіантах із різною спорідненістю та поведінкою у фарбуванні; тому кожен клон обов’язково тестують на контрольних матеріалах. Для кожного антитіла проводять титрування з метою визначення оптимальної дози, яка забезпечує максимальне співвідношення сигнал/шум (staining index) без підвищення неспецифічного фону.

Валідація панелі виконується поетапно. Першою пробує невелика «скелетна» панель із 3–4 ключових маркерів; після підтвердження коректності роботи приладу та налаштувань до неї по черзі додають інші маркери з повторною перевіркою кожної комбінації. Оцінка розділення здійснюється за допомогою показників якості (stain index, S/N ratio). Валідацію слід проводити на кількох біологічних контрольних зразках (здорові донори, відомі позитивні проби, лабораторні клітинні лінії) і документувати всі параметри: титри антитіл, налаштування детекторів (voltages), матрицю компенсації та результати FMO.

Контроль якості передбачає регулярне використання QC-зразків (контрольні кулі, стабільні клітинні зразки) для моніторингу чутливості та стабільності приладу. При зміні партій реактивів або клонів антитіл необхідно повторити титрування та базову валідацію панелі. Для клінічних застосувань

бажано використовувати стандартизовані набори та рекомендації (наприклад, розроблені колективами EuroFlow), що підвищують міжлабораторну порівнянність результатів.

Приклади типових панелей ілюструють практичну реалізацію цих принципів. Для базового імунологічного профілю периферичної крові часто застосовується панель CD45-FITC / CD3-PE / CD4-PerCP / CD8-PC5(табл 1); для фенотипування нейтрофілів одна з ефективних комбінацій - CD64-FITC, CD32-PE, CD16-ECD, CD11b-PC5; у гематоонкологічній діагностиці класифікація ГМЛ може опиратися на маркери CD13 (PerCP), CD33 (FITC), CD117 (APC), MPO (PE), тоді як для B-ALL типовими є CD19 (PE), CD10 (FITC), CD22 (APC) з внутрішньоклітинним визначенням TdT. Сучасні багатоколірні реагенти (наприклад восьмиколірні набори) використовуються для детекції рідкісних або аномальних субпопуляцій, зокрема аномальних плазматичних клітин у кістковому мозку.

***Таблиця 1.*** Панель моноклональних антитіл для аналізу основних і малих популяцій лімфоцитів периферичної крові пацієнтів (Хайдуков С.В., 2010)

| Досліджувані популяції | FTIC | PE | PerCP/PC5 | PC7 |
|---|---|---|---|---|
| Т-лімфоцити, Т-хелпери, цитотоксичні Т-лімфоцити | CD3<br>CD4<br>CD8 | CD8<br>CD25<br>CD38<br>CD45RA<br>CD45RO<br>TcRab<br>TcRgd<br>CD5 | CD3 | CD45 |
| В-лімфоцити, В1-, В2-клітини | CD19 | CD19 | CD45 | CD5 |
| NK-клітини, NK-Т-лімфоцити | CD3 | CD(16 + 56) | CD45 | - |
| Th2-лімфоцити | CD4 | CD25<br>CD294 | CD3 | CD45 |

***Таблиця 2.*** Чотирьохкольорова панель моноклогнальних антитіл для визначення иммунного статусу (Хайдуков С.В., 2009)

| | FITC | PE | ECD/APC | PC5/PerCD |
|---|---|---|---|---|
| Ізотиповий контроль | IgG | IgG | IgG | CD45 |
| B1, B2, B-клітини пам'яті | CD19 | CD5 | CD27 | CD45 |
| T-NK-клітини і субпопуляції NK-клітин | CD16 | CD56 | CD3 | CD45 |
| Субпопуляції Т клітин | CD8 | CD4 | CD3 | CD45 |
| Активовані Т-хелпери | CD4 | CD25 | HLA-DR | DC45 |
| Наівні і активовані Т-хелпери, Т-клітини пам'яті | CD45RA | CD45RO | CD4 | CD45 |
| αβ- і γδ-Т-клітини | TcR- αβ | TcR- γδ | CD3 | CD45 |
| Регуляторні Т-клітини | CD4 | CD25 | CD127 | CD45 |

***Таблиця 3.*** Характеристика кластерів диференціювання основних і малих популяцій клітин периферичної крові пацієнтів (Хайдуков С.В., 2010)

| Популяція лімфоцитів | Фенотип клітини |
|---|---|
| Загальна популяція лімфоцитів | CD45 + CD14- |
| Основні популяції лімфоцитів | |
| Т-лімфоцити | CD3 + CD45+ |
| В-лімфоцити | CD3 − CD19 + CD45+ |
| Т-хелпери | CD3 + CD4 + CD45+ |
| Цитотоксичні Т-лімфоцити | CD3 + CD8 + CD45+ |
| NK-клітини | CD3 − CD16 + CD56+ |
| NK-Т-лімфоцити | CD3 + CD16 + CD56+ |
| Популяції Т-лімфоцитів | |
| Th2-лімфоцити | CD3 + CD4 + CD294+ |
| Регуляторні Т-лімфоцити | CD4 + CD25 + FoxP3 |
| Популяції В-лімфоцитів | |
| B1-лімфоцити | CD3 − CD19 + CD5+ |
| B2-лімфоцити | CD3 − CD19 + CD5- |

## 2.3 Флуоресцентне мічення клітин

Система реєстрації флуоресценції складається з набору світлофільтрів і фотопомножувачів, кожен з яких вловлює світло в певному спектральному діапазоні, що відповідає конкретному флуорохрому. Вибір типу і кількості флуоресцентних барвників визначається метою дослідження. Найпоширенішими є кон'югати моноклональних антитіл із такими флуорофорами, як флуоресцеїн (FITC - fluorescein isothiocyanate), фікоеритрин (PE - phycoerythrin), тандемні барвники (ECD, PC5, PC7), алофікоціанін (APC), перидинін-хлорофіл протеїн (PerCP) та інші.

Флуоресцеїн ізотіоціанат або FITC активується аргоновим лазером при 488 нм та випромінює зелену флуоресценцію у діапазоні 515–525 нм яка фіксується детектором FL1. Фікоеритрин також збуджується при 488 нм проте випромінює світло в оранжевій області спектра в межах 575–585 нм що дає змогу відокремити його сигнал за допомогою детектора FL2. Перидинін-хлорофіл протеїн та тандемний барвник PE-Cy5 випромінюють у дальньо-червоній зоні при 670 нм що відповідає каналу FL3 тоді як алофікоціанін працює у ще довшохвильовому діапазоні 660 нм та реєструється каналом FL4.

Використання різних комбінацій таких флуорохромів дозволяє одночасно аналізувати кілька маркерів у межах одного досліджуваного зразка.

Окрім фарбування поверхневих структур методика передбачає можливість визначення внутрішньоклітинних антигенів таких як цитокіни або ферменти. У цьому разі клітини піддають процесам фіксації та пермеабілізації що дозволяє антитілам проникати крізь клітинну мембрану.

Флуоресцентні барвники також успішно застосовуються для оцінки життєздатності клітин. Для виконання таких завдань використовують фарбники що здатні зв'язуватися з нуклеїновими кислотами наприклад 7-AAD пропідіум йодид DAPI або Hoechst. Крім того застосовують pH-чутливі флуорофори на кшталт Fluo-3 або іон-залежні сполуки як Indo-1. Ці реагенти допомагають відокремити живі клітини від неживих а також оцінити важливі фізіологічні

параметри зокрема рівень кальцію або мембранний потенціал.

Процес флуоресцентного мічення клітин у лабораторній практиці включає кілька етапів. Спершу клітини готують до фарбування шляхом виділення й промивання у відповідному буфері, після чого додають необхідний об'єм моноклонального кон'югату антитіл проти вибраного антигену. Суміш інкубують у темряві при кімнатній температурі (зазвичай 20–25 хвилин), після чого клітини відмивають, щоб видалити надлишок антитіла. У разі внутрішньоклітинного фарбування проводиться додатковий етап пермеабілізації.

Далі проводять аналіз отриманого зразка на проточному цитометрі. Реєстрація флуоресценції у різних каналах дає змогу одночасно визначати експресію кількох антигенів на одній клітині.

Для прикладу, використовуючи антитіла до CD3, CD4 і CD8, мічені різними флуорохромами, можна одночасно визначити кількість Т-лімфоцитів, Т-хелперів і цитотоксичних Т-лімфоцитів у зразку периферичної крові. Оскільки сучасні проточні цитометри оснащені кількома фотоелектронними помножувачами (від 3 до 9), вони здатні аналізувати багато параметрів одночасно, що дозволяє детально охарактеризувати клітинний склад біологічного матеріалу.

Таким чином, флуоресцентне мічення клітин є ключовим етапом у проточній цитометрії, який забезпечує селективність і точність аналізу. Правильний вибір флуорохромів, оптимізація умов фарбування та проведення контролів є необхідними передумовами для отримання достовірних результатів при характеристиці клітинних популяцій.

## 2.4 Контроль якості підготовки зразків

Контроль якості підготовки зразків є критичним етапом у проведенні проточної цитометрії, оскільки саме від нього залежить точність, відтворюваність та достовірність отриманих результатів. Порушення технології

підготовки може призвести до гемолізу, агрегації клітин або появи неспецифічного фону, що ускладнює подальший аналіз і може спричинити хибну інтерпретацію даних.

На етапі відбору матеріалу необхідно забезпечити належні умови транспортування та зберігання зразків. Кров повинна бути взята у пробірки з антикоагулянтом (найчастіше - ЕДТА або гепарин), уникаючи гемолізу. Оптимальний час між забором і аналізом не повинен перевищувати 24 години. Зразки слід зберігати при температурі +4…+8 °С у темному місці, щоб запобігти деградації флуорохромів.

Під час підготовки зразка необхідно дотримуватися чистоти та асептики. Використання неконтамінованих реактивів і посуду зменшує ризик появи сторонніх сигналів. Для відмивання клітин застосовують ізотонічні буфери, найчастіше - PBS (phosphate-buffered saline, фосфатно-сольовий буфер) або спеціальні буфери для цитометрії з додаванням білка (BSA, fetal bovine serum), які запобігають налипанню клітин і неспецифічному зв’язуванню антитіл.

Важливо контролювати концентрацію клітин у суспензії - оптимально близько $10^6$ клітин/мл. Занадто висока концентрація може спричинити утворення агрегатів, тоді як занадто низька - призвести до статистично недостовірних результатів. Для запобігання агрегації клітин зразки можна короткочасно центрифугувати або фільтрувати через нейлонові сита з розміром пор 40–70 мкм.

Ключовим етапом контролю якості є використання контрольних зразків - як негативних, так і позитивних. Негативний контроль (unstained control) дозволяє оцінити рівень природної флуоресценції клітин, тоді як позитивний - підтвердити специфічність зв’язування антитіл. Також застосовують компенсаційні контролі (single-stained controls), які потрібні для корекції спектрального перекриття між каналами детекції.

Контроль життєздатності клітин проводять за допомогою флуоресцентних барвників, що вибірково проникають у мертві клітини (наприклад, 7-AAD, пропідіум йодид або DAPI). Наявність великої кількості неживих клітин у зразку може суттєво спотворювати результати, тому життєздатність має перевищувати

90 %.

Важливим елементом контролю якості є також перевірка коректності калібрування приладу. Для цього застосовують стандартні флуоресцентні мікросфери (calibration beads), які дозволяють контролювати стабільність сигналу та відтворюваність вимірювань у часі.

Крім того, під час роботи слід враховувати потенційні джерела похибок: некоректне співвідношення об’єму антитіла до кількості клітин, надмірна тривалість інкубації, недотримання температурного режиму, неповне видалення надлишку реактивів або залишків лізисного буфера.

Після завершення підготовки зразка проводиться його візуальна оцінка: суспензія має бути однорідною, без згустків і осаду. Перед завантаженням у проточний цитометр бажано короткочасно перемішати зразок, щоб забезпечити рівномірний розподіл клітин.

## 2.5 Проблеми перекриття спектрів і методи компенсації

Перекриття спектрів створює серйозні труднощі під час інтерпретації результатів, оскільки флуоресценція, що реєструється в одному каналі, може частково походити від іншого барвника. Наприклад, флуорохром фікоеритрин (PE) має широкий спектр випромінювання, який частково потрапляє в область реєстрації PerCP або PE-Cy5. Це призводить до хибного підвищення сигналу у відповідному каналі, що може бути помилково інтерпретовано як позитивна експресія антигену.

Для усунення або мінімізації впливу спектрального перекриття застосовують метод компенсації. Компенсація - це математичний процес корекції флуоресцентних сигналів, який дозволяє виділити внесок кожного флуорохрому у відповідному каналі детекції. Суть методу полягає у відніманні частини сигналу, спричиненого spillover з інших каналів, із загального зареєстрованого сигналу.

Компенсація може здійснюватися як апаратно (під час вимірювання), так і

програмно (після збору даних). Сучасні цитометри здебільшого використовують програмну компенсацію, яка реалізується у спеціалізованому програмному забезпеченні (наприклад, CXP, FlowJo, Kaluza, FCS Express тощо).

Процес побудови матриці компенсації базується на використанні контрольних зразків, мічених лише одним флуорохромом (single-stained controls). Для кожного каналу визначають ступінь впливу сигналу з інших каналів, після чого програма розраховує коефіцієнти компенсації. Ці коефіцієнти описують, яку частину сигналу потрібно відняти з кожного каналу, щоб отримати чистий сигнал конкретного флуорохрому.

Важливо, щоб контролі для компенсації були підготовлені за тими самими умовами, що й основні зразки, і щоб використовувалися ті самі клони антитіл та ті самі флуорохроми. Для цього часто застосовують компенсаційні мікросфери (compensation beads), які мають стандартну поверхню, здатну специфічно зв’язувати антитіла, що дозволяє отримати стабільні й відтворювані сигнали.

Правильність проведення компенсації перевіряють за допомогою двовимірних гістограм: після внесення коефіцієнтів компенсації флуоресценція одного барвника не повинна змінювати положення клітин у каналах, не пов’язаних із цим барвником. Якщо компенсація виконана неправильно (надмірна або недостатня), клітинні популяції набувають нахиленого або розмитого вигляду на діаграмах розсіювання.

Крім класичних методів компенсації, сучасна проточна цитометрія розвиває підхід спектрального розділення (spectral unmixing), який застосовується в новітніх спектральних цитометрах. Цей метод базується на тому, що кожен флуорохром має унікальний повний спектр випромінювання. Прилад реєструє сигнали у багатьох вузьких спектральних каналах, після чого за допомогою математичних алгоритмів відокремлює внесок кожного барвника. Це дозволяє використовувати більше флуорохромів одночасно, ніж у класичній цитометрії, з мінімальними артефактами від перекриття спектрів.

Для мінімізації спектрального перекриття вже на етапі проєктування панелі необхідно ретельно підбирати комбінації флуорохромів, уникаючи

сумісного використання барвників із близькими спектрами випромінювання. Також варто розташовувати яскраві флуорохроми на маловиражених антигенах, а слабкі - на високоекспресованих. Це підвищує роздільну здатність і полегшує корекцію сигналів при компенсації.

## 2.6 Обробка та інтерпретація результатів

Після проведення вимірювань на проточному цитометрі дані записуються у цифровому вигляді у форматі FCS (Flow Cytometry Standard). Цей формат зберігає усю інформацію про параметри вимірювання, налаштування приладу, флуоресцентні канали та інтенсивність сигналів для кожної клітини.

Першим етапом обробки даних є **гейтинг** (gating) - процес виділення популяцій клітин, що цікавлять дослідника. На двовимірних гістограмах розсіювання (FSC/SSC) виділяють основні групи клітин за їх розміром та гранулярністю: лімфоцити, моноцити та гранулоцити. Надалі аналіз флуоресценції проводиться лише для обраної популяції.

Після цього переходять до аналізу експресії антигенів за допомогою флуоресцентних каналів. Результати подають у вигляді гістограм (одновимірних або двовимірних), на яких кожна точка представляє одну клітину. За рівнем флуоресценції визначають частку позитивних клітин (експресія антигену) та її інтенсивність (mean fluorescence intensity - MFI, середня інтенсивність флуоресценції).

Для кожного маркера встановлюють межі позитивності, використовуючи контрольні зразки - unstained control, ізотипічні контролі або FMO (fluorescence minus one). Це дозволяє уникнути хибнопозитивних результатів і правильно розмежувати негативну та позитивну популяції.

Дані аналізуються за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення (FlowJo, Kaluza, FCS Express, CytExpert тощо), яке дає змогу створювати багатовимірні діаграми, визначати відсотковий вміст клітинних субпопуляцій і розраховувати співвідношення між ними.

Для статистичної інтерпретації результатів зазвичай використовують такі параметри:

- **% positive cells** - відсоток позитивних клітин;
- **MFI (Mean Fluorescence Intensity)** - середня інтенсивність флуоресценції, що характеризує рівень експресії антигену;
- **SI (Staining Index)** - показник розділення між позитивною і негативною популяціями;
- **CV (Coefficient of Variation)** - коефіцієнт варіації, що відображає однорідність сигналу в популяції.

На основі отриманих даних формують імунологічний профіль клітин. Наприклад, у клінічній практиці при аналізі лімфоцитів периферичної крові визначають відсотковий вміст Т-клітин (CD3+), Т-хелперів (CD4+), цитотоксичних Т-клітин (CD8+), В-клітин (CD19+) та NK-клітин (CD16+/CD56+). За співвідношенням CD4/CD8 оцінюють імунорегуляторний стан організму.

Інтерпретація результатів базується на порівнянні отриманих показників із референтними значеннями. Важливо враховувати біологічні особливості пацієнта, вік, стать, стан імунної системи та супутні патології. У випадку онкогематологічних захворювань імунофенотипування допомагає визначити належність пухлинних клітин до певної лінії кровотворення (мієлоїдної, В- або Т-лімфоїдної), стадію їх диференціювання і наявність атипових антигенів.

Результати оформлюються у вигляді протоколу, що містить таблицю з відсотковим вмістом основних субпопуляцій клітин, показники інтенсивності флуоресценції та графічні зображення (гістограми, діаграми розсіювання). Такий протокол підписується відповідальним спеціалістом і додається до історії хвороби пацієнта.

# РОЗДІЛ 3 ІМУНОФЕНОТИПУВАННЯ КЛІТИН ТА ЙОГО КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

## 3.1 Основні субпопуляції лімфоцитів: Т-, В- та NK- клітини

Розподіл лімфоцитів людини на Т-лімфоцити, В-лімфоцити та натуральні кілери засновано на їх біологічних функціях та експресії ними поверхневих клітинних антигенів. Виділення популяцій клітин, що несуть на своїй поверхні певні маркери нині здійснюють методом проточної цитофлюориметрії та з використанням клітинного сортера. В історичному плані можна згадати методи розеткоутворення та метод визначення субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів з використанням еритроцитарних діагностикумів.

**Т-лімфоцити**

Т-лімфоцити становлять центральну ланку клітинного імунітету. Їхня основна характеристика - наявність комплексу **TCR-CD3**, який є специфічним для цієї популяції та відсутній у В- або NK-клітин.

Серед Т-лімфоцитів розрізняють кілька функціональних субпопуляцій. Найчисленнішою є група **CD4+ Т-хелперів (T-helper)**, що становить близько 55–60% усіх Т-клітин. Вони координують імунну відповідь шляхом активації В-лімфоцитів, макрофагів та інших ефекторних клітин. Залежно від продукції цитокінів Т-хелпери поділяються на підтипи: **Th1**, **Th2**, **Th17** та **Treg** (регуляторні Т-клітини). Для активованих Т-хелперів характерна експресія маркерів **CD25**, **HLA-DR**, **CD69**.

Друга за чисельністю субпопуляція - **CD8+ цитотоксичні Т-лімфоцити (T-cytotoxic)**, які становлять 20–30% усіх Т-клітин. Їх основна функція полягає у знищенні клітин, інфікованих вірусами або трансформованих пухлинних клітин. Активовані цитотоксичні клітини експресують **CD38** та **HLA-DR**.

Особливу роль відіграють **регуляторні Т-клітини (Treg)** фенотипу **CD4+CD25+CD127−**, які пригнічують надмірну імунну відповідь і попереджають розвиток аутоімунних реакцій. Їх активність контролюється транскрипційним фактором **FoxP3**, що є специфічним маркером цієї субпопуляції.

Т-клітини також класифікують за ступенем диференціювання: **наївні**

**клітини (CD45RA+)**, які ще не контактували з антигеном, та **клітини пам'яті (CD45RO+)**, здатні до швидкої реактивації при повторному контакті з антигеном. Залежно від типу Т-клітинного рецептора (TCR) виділяють **αβ-** та **γδ-Т-лімфоцити**; перші переважають у периферичній крові, другі - у слизових оболонках, де відіграють роль у мукозальному імунітеті.

**В-лімфоцити**

В-лімфоцити відповідають за гуморальну ланку імунітету, оскільки диференціюються у плазматичні клітини, що синтезують антитіла. Основними маркерами В-клітин є **CD19**, **CD20**, **CD5** та **CD27**.

Антиген **CD19** виявляється на всіх етапах розвитку В-клітин, крім плазматичних клітин, і бере участь у передачі сигналів активації. **CD20** експресується на зрілих В-клітинах, але втрачається під час перетворення у плазмоцити. **CD5** визначає субпопуляцію **В1-клітин**, які продукують природні антитіла і часто беруть участь у розвитку аутоімунних процесів. **CD27** є маркером клітин пам'яті, що дозволяє відрізняти їх від наївних В-лімфоцитів.

Серед В-клітин виділяють три основні популяції: **В1-клітини (CD19+CD5+)**, які забезпечують початкову відповідь на антиген і часто асоційовані з аутоімунними захворюваннями; **В2-клітини (CD19+CD5−)**, що беруть участь у вторинній імунній відповіді; та **клітини пам'яті (CD27+)**, відповідальні за формування тривалого імунітету. Підвищення рівня CD5+ В-клітин спостерігається при ревматоїдному артриті, системному червоному вовчаку, синдромі Шегрена та тиреоїдиті Хашимото.

**NK-клітини**

Природні кілери (NK-клітини) становлять близько 10–15% лімфоцитів периферичної крові і є важливим компонентом вродженого імунітету. Вони здійснюють цитотоксичний вплив на клітини-мішені без попередньої сенсибілізації. Основними поверхневими маркерами NK-клітин є **CD16** (Fcγ-рецептор, відповідальний за антитілозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність - ADCC) та **CD56 (NCAM)** - адгезійна молекула, притаманна всім NK-клітинам.

Класичний фенотип NK-клітин - **CD3− CD16+ CD56+**, тоді як **CD3+ CD16+ CD56+** клітини становлять проміжну популяцію, відому як NK-Т-лімфоцити, що поєднують властивості обох типів клітин. NK-клітини беруть участь у протипухлинному і противірусному імунному захисті, а також регулюють імунну відповідь шляхом секреції цитокінів (інтерферон-γ, TNF-α).

***Таблиця 4.*** Основні фенотипи лімфоцитів

| Популяція лімфоцитів | Фенотип клітини |
|---|---|
| Загальна популяція лімфоцитів | CD45+ CD14− |
| Т-лімфоцити | CD3+ CD45+ |
| В-лімфоцити | CD3− CD19+ CD45+ |
| Т-хелпери | CD3+ CD4+ CD45+ |
| Цитотоксичні Т-клітини | CD3+ CD8+ CD45+ |
| NK-клітини | CD3− CD16+ CD56+ |
| NK-Т-лімфоцити | CD3+ CD16+ CD56+ |
| Th2-лімфоцити | CD3+ CD4+ CD294+ |
| Регуляторні Т-клітини | CD4+ CD25+ FoxP3 |
| В1-лімфоцити | CD3− CD19+ CD5+ |
| В2-лімфоцити | CD3− CD19+ CD5− |

**Діагностичні набори для визначення субпопуляцій лімфоцитів**

У сучасній лабораторній практиці широко використовуються стандартизовані набори антитіл для мультипараметричного аналізу лімфоїдних клітин. Зокрема:

- **ClearLLab LS (Lymphoid Screening)** - призначений для одночасної ідентифікації Т-, В- і NK-клітин у крові, кістковому мозку та лімфовузлах. Містить антитіла до CD45, CD3, CD4, CD8, CD56, CD5, CD19, CD20, CD10, CD34.
- **tetraCHROME CD45-FITC/CD4-PE/CD8-ECD/CD3-PC5** - використовується для визначення основних Т-клітинних субпопуляцій.
- **Lineage-PE** - набір антитіл CD3, CD14, CD19, CD20, CD56 для одночасної ідентифікації п’яти типів клітин.
- **DuraClone B27** - застосовується для визначення антигену HLA-B27 у зразках крові.

- **Th1/Th2/Th17 Human Phenotyping Kit** - призначений для аналізу цитокінового профілю CD4+ Т-клітин, що дозволяє оцінити баланс між різними типами імунних відповідей.

## 3.2 Ключові CD-маркери та їх діагностичне значення

Кластери диференціювання (CD - *Cluster of Differentiation*) - це міжнародна система класифікації поверхневих та внутрішньоклітинних антигенів, що експресуються на лейкоцитах та інших клітинах імунної системи. CD-молекули виконують важливі функції у міжклітинній взаємодії, передачі сигналів, розпізнаванні антигенів та формуванні імунної відповіді. Ідентифікація клітин за допомогою CD-маркерів є основою імунофенотипування у проточній цитометрії.

Кожен CD-антиген відповідає певному етапу розвитку, активації або функціонального стану клітини. Завдяки специфічним моноклональним антитілам (МКА), кон'югованим із флуорохромами, можна одночасно визначити експресію кількох CD-маркерів і, відповідно, встановити субпопуляційний склад клітин крові.

**Основні CD-маркери Т-лімфоцитів**

Т-лімфоцити характеризуються експресією CD3 - універсального маркера Т-клітин, який входить до складу Т-клітинного рецепторного комплексу (TCR-CD3) і бере участь у передачі активаційного сигналу після розпізнавання антигену.

В межах Т-клітинної лінії виділяють кілька ключових субпопуляцій:

- **CD4+ Т-хелпери** - координують імунну відповідь, стимулюють В-лімфоцити до продукції антитіл, активують макрофаги.
- **CD8+ цитотоксичні Т-лімфоцити** - здійснюють лізис вірус-інфікованих і пухлинних клітин.
- **CD25, CD69, HLA-DR** - маркери активації Т-клітин.
- **CD45RA/CD45RO** - маркери наївних і клітин пам'яті відповідно.

- **FoxP3** - внутрішньоклітинний транскрипційний фактор, притаманний регуляторним Т-клітинам (Treg), що пригнічують аутоімунні реакції.
- **TCR αβ і γδ** - визначають тип рецептора Т-клітин; αβ-клітини переважають у крові, γδ - на слизових оболонках.

**Основні CD-маркери В-лімфоцитів**

В-лімфоцити розпізнаються за експресією CD19 і CD20 - основних маркерів В-клітинної лінії.

- **CD19** бере участь у сигнальній передачі через В-клітинний рецептор (BCR) і зберігається на всіх стадіях розвитку В-клітин, окрім плазматичних клітин.
- **CD20** з'являється на пре-В-клітинах і зникає після їх трансформації у плазмоцити.
- **CD27** відрізняє клітини пам'яті (CD27+) від наївних В-клітин (CD27−).
- **CD5** притаманний субпопуляції В1-клітин, асоційованих із продукцією природних аутоантитіл.

***Таблиця 5.*** Основні маркери В-лімфоцитів та їхнє значення

| Маркер | Стадія / субпопуляція | Біологічна роль |
|---|---|---|
| CD19 | Усі В-клітини (крім плазматичних) | Регуляція сигналів активації В-клітин |
| CD20 | Пре-В, зрілі В-клітини | Іонний транспорт, активація |
| CD27 | Клітини пам'яті | Вторинна імунна відповідь |
| CD5 | В1-клітини | Продукція природних аутоантитіл |
| CD38, CD138 | Плазматичні клітини | Секреція імуноглобулінів |

**Основні CD-маркери природних кілерів (NK-клітин)**

NK-клітини (CD3− CD16+ CD56+) є важливою складовою природного імунітету.

- **CD16 (FcγRIII)** - рецептор до Fc-фрагмента IgG, забезпечує антитілозалежну клітинну цитотоксичність (ADCC).
- **CD56 (NCAM)** - маркер адгезії, що відображає рівень цитолітичної

активності; CD56bright клітини переважно секретують цитокіни, тоді як CD56dim - цитотоксичні.

- **CD57** - маркер зрілих, високоактивних NK-клітин.
- **CD3+CD56+** - NKT-клітини, що поєднують властивості Т- і NK-клітин.

**Діагностичне значення CD-маркерів**

CD-маркери мають ключову роль у лабораторній діагностиці, зокрема:

- **CD4/CD8-співвідношення** - показник імунорегуляторного стану організму (норма 1,8 ± 0,4). Його зниження характерне для вірусних інфекцій (наприклад, ВІЛ), пересадки кісткового мозку; підвищення - при аутоімунних захворюваннях.
- **CD19/CD20** - допомагають діагностувати В-клітинні лімфопроліферативні процеси.
- **CD56/CD16** - застосовуються для оцінки функціональної активності NK-клітин при імунодефіцитах і пухлинних процесах.
- **HLA-DR** - маркер активації лімфоцитів, який використовується для оцінки імунної реактивності.
- **CD34** - антиген гемопоетичних стовбурових клітин, застосовується при моніторингу трансплантації кісткового мозку.

**Приклад клінічного використання CD-маркерів**

Для первинної діагностики імунодефіцитів застосовують стандартні чотирьохкольорові панелі (наприклад, Beckman Coulter, EuroFlow):

***Таблиця 6***

| Панель | FITC | PE | ECD/APC | PC5/PerCP |
|---|---|---|---|---|
| Субпопуляції Т-клітин | CD8 | CD4 | CD3 | CD45 |
| В-клітини пам’яті | CD19 | CD5 | CD27 | CD45 |
| NK-клітини | CD16 | CD56 | CD3 | CD45 |
| Регуляторні Т-клітини | CD4 | CD25 | CD127 | CD45 |

## 3.3 Імунофенотипування в клінічній практиці

Імунофенотипування є одним із ключових методів у клінічній практиці для встановлення діагнозу та детальної характеристики як нормальних, так і неопластичних гематолімфоїдних клітинних популяцій. Цей процес базується на одночасному визначенні численних молекулярних та функціональних характеристик окремих клітин, що забезпечує високоточну класифікацію клітинних субпопуляцій.

Визначення клітинних ліній здійснюється за допомогою специфічних моноклональних антитіл, що виступають як маркери лінії для ідентифікації Т-клітин, В-клітин, мієлоїдних клітин та інших субпопуляцій. Така ідентифікація є фундаментальною для класифікації гематологічних новоутворень, дозволяючи відрізнити різні типи лейкозів та лімфом на основі характерного набору експресованих антигенів.

Характеризація новоутворень здійснюється через аналіз експресії специфічних маркерів, що дозволяє диференціювати патологічні клітини та уточнювати тип пухлини. Зокрема, імунофенотипування допомагає встановити стадію диференціації клітин, визначити їх функціональний стан і передбачити можливі шляхи розвитку патології. Це особливо важливо при диференціальній діагностиці між різними формами гострих лімфобластних та мієлоїдних лейкозів, а також при класифікації рідкісних або агресивних субтипів.

Одним із важливих аспектів імунофенотипування є виявлення аберантних фенотипів, коли експресія антигенів не відповідає нормальним стадіям дозрівання. Такі аберантні патерни є характерними для ряду злоякісних процесів і можуть виступати прогностичними маркерами. Наприклад, детекція специфічних маркерів, таких як TSLPR/CRLF2, дозволяє ідентифікувати Ph-подібний B-ALL (B-cell acute lymphoblastic leukemia) та уточнити подальшу класифікацію і тактику лікування.

### 3.3.1 Імунодефіцитні стани

Імунодефіцитні стани характеризуються зниженою здатністю організму протидіяти інфекційним агентам та регулювати імунні відповіді. Вони можуть бути **первинними** (генетично зумовленими) або **вторинними** (набутими), що виникають у результаті хронічних захворювань, терапії цитостатиками, імуносупресантами або інфекційних агентів, таких як вірус імунодефіциту людини (HIV, human immunodeficiency virus).

Імунофенотипування є ключовим методом оцінки імунного статусу пацієнта, оскільки дозволяє кількісно визначити основні субпопуляції лімфоцитів, їх функціональні характеристики та співвідношення. Основний акцент робиться на визначенні **Т-, В- та NK-клітин**, а також на співвідношенні субпопуляцій CD4+ і CD8+ Т-лімфоцитів.

У пацієнтів з первинними імунодефіцитами часто спостерігається зниження кількості або функціональної активності певних субпопуляцій клітин. Наприклад, при **SCID (severe combined immunodeficiency, тяжка комбінована імунна недостатність)** відзначають виражений дефіцит Т- і/або В-клітин. У випадках **первинної дефіцитності NK-клітин** можлива підвищена схильність до вірусних інфекцій та розвитку пухлин.

Вторинні імунодефіцити зазвичай характеризуються більш варіабельними змінами клітинних популяцій, що залежать від етіології стану. Наприклад, при ВІЛ-інфекції ключовим маркером прогресування хвороби є зниження кількості **CD4+ Т-лімфоцитів**, тоді як співвідношення CD4+/CD8+ може слугувати індикатором відновлення імунного статусу під час антиретровірусної терапії.

Імунофенотипування дозволяє не лише кількісно оцінити дефіцитні субпопуляції, а й виявити аберантні фенотипи клітин, що можуть свідчити про компенсаторні механізми або супутні патології. Це робить метод незамінним у діагностиці, прогнозуванні та моніторингу пацієнтів з імунодефіцитами.

Для наочності результати імунофенотипування при різних імунодефіцитних станах часто представляють у вигляді таблиці, де зазначаються ключові маркери, характерні зміни та клінічне значення:

***Таблиця 7.*** Основні зміни клітинних субпопуляцій при імунодефіцитних станах

| **Тип імунодефіциту** | **Ключові субпопуляції** | **Зміни** | **Клінічне значення** |
|---|---|---|---|
| SCID | Т- і В-клітини | Виражений дефіцит | Високий ризик інфекцій, потреба в трансплантації |
| Дефіцит NK-клітин | NK-клітини | Зниження | Схильність до вірусних інфекцій, пухлин |
| ВІЛ-інфекція | CD4+ Т-лімфоцити | Зниження кількості, порушене CD4+/CD8+ співвідношення | Прогресування імунодефіциту, контроль терапії |
| Вторинні імунодефіцити (цитостатики, імуносупресія) | Т-, В-, NK-клітини | Варіабельні зміни | Моніторинг відновлення імунітету |

### 3.3.2 Аутоімунні захворювання

Аутоімунні захворювання становлять велику групу патологічних станів, які виникають унаслідок порушення механізмів імунологічної толерантності, коли імунна система починає розпізнавати власні антигени організму як чужорідні. Це призводить до хронічного запалення, пошкодження тканин і порушення функцій органів.

Імунофенотипування є важливим інструментом у вивченні патогенезу та діагностиці аутоімунних захворювань, оскільки воно дозволяє оцінити кількісний і функціональний стан клітин імунної системи, зокрема Т-, В- та NK-

клітин, а також виявити зміни у співвідношенні їх субпопуляцій. Аналіз імунного профілю пацієнта допомагає не лише уточнити тип і стадію захворювання, а й визначити активність патологічного процесу та ефективність імуносупресивної терапії.

У більшості аутоімунних патологій спостерігаються характерні імунофенотипічні зміни. Для **системного червоного вовчака (СЧВ, systemic lupus erythematosus, SLE)** типовим є зниження кількості CD4+ Т-лімфоцитів, порушення співвідношення CD4+/CD8+, збільшення активованих В-клітин (CD19+, CD27+) та підвищення рівня плазматичних клітин. У пацієнтів із **ревматоїдним артритом (РА, rheumatoid arthritis, RA)** спостерігається підвищення кількості CD4+ ефекторних Т-клітин та плазматичних клітин, що продукують аутоантитіла, зокрема ревматоїдний фактор (РФ) і антитіла до циклічного цитрулінованого пептиду (anti-CCP).

При **аутоімунних тиреопатіях** (наприклад, хвороба Грейвса, тиреоїдит Гашимото) характерним є підвищення кількості CD19+ В-лімфоцитів і зростання частки клітин, які експресують маркери активації CD80 і CD86. Це свідчить про гіперактивність гуморальної імунної відповіді та формування антитіл до тиреоїдних антигенів.

Імунофенотипування також має діагностичне значення у виявленні змін у регуляторних Т-клітинах (Treg, CD4+CD25+FoxP3+), які контролюють аутоімунні реакції. Зниження кількості або функціональної активності Treg є загальним патогенетичним механізмом у більшості аутоімунних хвороб і може бути використане як маркер тяжкості перебігу та прогнозу захворювання.

Окрім діагностичної ролі, імунофенотипування має також терапевтичне значення, оскільки дає змогу відстежувати динаміку імунних змін під час лікування імуносупресивними препаратами, моноклональними антитілами або біологічними агентами. Аналіз відновлення нормального імунного профілю пацієнта є одним із критеріїв ефективності лікування.

Для узагальнення типових змін клітинних популяцій при аутоімунних захворюваннях наведено таблицю:

***Таблиця 8.*** Імунофенотипічні зміни при основних аутоімунних захворюваннях

| **Захворювання** | **Основні клітинні зміни** | **Ключові CD-маркери** | **Клінічне значення** |
|---|---|---|---|
| Системний червоний вовчак | Зниження CD4+, порушення CD4+/CD8+, підвищення активованих В-клітин | CD4, CD8, CD19, CD27 | Активність аутоімунного процесу, прогноз ураження органів |
| Ревматоїдний артрит | Підвищення ефекторних Т-клітин, збільшення плазматичних клітин | CD4, CD138 | Маркер системного запалення, контроль ефективності терапії |
| Тиреоїдит Хашимото | Гіперактивність В-клітин, підвищення CD80+, CD86+ | CD19, CD80, CD86 | Надлишкова гуморальна відповідь, аутоантитіла до тиреоїдних антигенів |
| Розсіяний склероз | Дисбаланс Treg та Th17 клітин | CD4, CD25, FoxP3, IL-17 | Маркер тяжкості перебігу, оцінка відповіді на імунотерапію |

### 3.3.3 Онкогематологічні процеси

Онкогематологічні процеси - це група злоякісних захворювань системи крові, що характеризуються порушенням проліферації, диференціації та апоптозу клітин кровотворення. До них належать лейкози, лімфоми, мієлодиспластичні та мієлопроліферативні синдроми, множинна мієлома та інші пухлини лімфоїдного чи мієлоїдного походження.

Імунофенотипування є одним із найважливіших методів у сучасній гематологічній діагностиці, оскільки дозволяє встановити клітинне походження пухлини, визначити стадію диференціації та виявити аберантну експресію антигенів. Метод базується на використанні моноклональних антитіл до специфічних кластерів диференціювання (CD-маркерів), що дає можливість точно охарактеризувати злоякісні клітинні популяції та диференціювати морфологічно подібні новоутворення.

Застосування проточної цитометрії у діагностиці онкогематологічних процесів дозволяє аналізувати одночасно десятки параметрів кожної клітини, включно з експресією поверхневих, цитоплазматичних і ядерних антигенів. Це забезпечує комплексну ідентифікацію клітин пухлинного клону, навіть за наявності мінімальної кількості патологічних елементів у зразку.

У клінічній практиці імунофенотипування має кілька ключових напрямів застосування:

По-перше, метод використовується для **діагностики та класифікації гострих і хронічних лейкозів**. У випадку **гострих лімфобластних лейкозів (ГЛЛ, acute lymphoblastic leukemia, ALL)** визначення експресії маркерів CD19, CD22, CD79a характерне для В-клітинних варіантів, тоді як CD3, CD5, CD7 свідчать про Т-клітинну природу процесу. Для **гострих мієлоїдних лейкозів (ГМЛ, acute myeloid leukemia, AML)** типовими є CD13, CD33, CD117, MPO (мієлопероксидаза). Визначення цих маркерів є основою для уточнення підтипу лейкозу відповідно до класифікації ВООЗ.

По-друге, імунофенотипування є вирішальним для **виявлення мінімальної залишкової хвороби (minimal residual disease, MRD)** після лікування. Виявлення навіть 0,01% патологічних клітин дозволяє прогнозувати ризик рецидиву і своєчасно скоригувати терапевтичну тактику.

По-третє, метод має велике значення для **ідентифікації хронічних лімфопроліферативних процесів**. Наприклад, при **хронічному**

**лімфоцитарному лейкозі (ХЛЛ, chronic lymphocytic leukemia, CLL)** спостерігається характерний фенотип CD5+CD19+CD23+, що дозволяє відрізнити його від інших В-клітинних лімфом. Для **лімфоми з клітин мантії (mantle cell lymphoma, MCL)** типовою є експресія CD5 і CD20 за відсутності CD23, а для **фолікулярної лімфоми (FL, follicular lymphoma)** - експресія CD10, BCL-2 і BCL-6.

Крім того, імунофенотипування застосовується у **моніторингу ефективності лікування** та оцінці **реакції трансплантата проти господаря (GVHD, graft-versus-host disease)** після трансплантації кісткового мозку, де аналіз відновлення нормальних клітинних популяцій є показником репопуляції та імунного відновлення.

***Таблиця 9.*** Імунофенотипічні характеристики основних онкогематологічних процесів

| Захворювання | Клітинне походження | Ключові CD-маркери | Діагностичне значення |
|---|---|---|---|
| Гострий лімфобластний лейкоз (B-ALL) | В-лімфобласти | CD19, CD20, CD22, CD79a, TdT | Підтвердження В-клітинної природи пухлини, прогноз відповіді на терапію |
| Гострий лімфобластний лейкоз (T-ALL) | Т-лімфобласти | CD3, CD5, CD7, CD34, TdT | Визначення Т-клітинної лінії, стратифікація ризику |
| Гострий мієлоїдний лейкоз (AML) | Мієлобласти | CD13, CD33, CD117, MPO, CD34 | Ідентифікація мієлоїдного походження, класифікація підтипів |
| Хронічний лімфоцитарний лейкоз (CLL) | Зрілі В-лімфоцити | CD5, CD19, CD23, CD200 | Диференціація від інших В-клітинних лімфом |
| Лімфома з клітин мантії (MCL) | Зрілі В-клітини | CD5+, CD20+, Cyclin D1+, CD23– | Діагностика MCL, диференціація з CLL |

| Захворювання | Клітинне походження | Ключові CD-маркери | Діагностичне значення |
|---|---|---|---|
| Множинна мієлома | Плазматичні клітини | CD38, CD138, CD56, CD45– | Ідентифікація мієломних клітин, моніторинг MRD |
| Пароксизмальна нічна гемоглобінурія (PNH) | Гемопоетичні клітини | Відсутність GPI-залежних білків (CD55, CD59) | Діагностика клональної GPI-дефіцитності |

# РОЗДІЛ 4 ПРОТОЧНА ЦИТОМЕТРІЯ ПРИ ВРОДЖЕНИХ ІМУНОДЕФІЦИТАХ

## 4.1 Класифікація вроджених імунодефіцитів

Первинні імунодефіцити - вроджені (генетичні або ембріональні) порушення системи імунітету з дефектами одного або декількох її компонентів, а саме: клітинного або гуморального імунітету, фагоцитозу, системи комплементу, які приводять до виникнення інфекційних захворювань.

*Загальні прояви імунодефіциту*

— Інфекції (хронічний, рецидивуючий перебіг, схильність до прогресування,

— політопність, поліетіологічність, неповне очищення організму від збудників,

— неповне одужання) 6 і більше разів на рік

— Алергічні ураження (хвороби)

— Аутоімунні ураження (хвороби)

— Пухлини імунної системи та інші злоякісні новоутворення

— Часте поєднання з вадами розвитку

— Шлунково-кишкові розлади

**Класифікація первинних імунодефіцитів**

*І. Дефіцит гуморального імунітету:*

1. Зчеплена з Х-хромосомою агамма(гіпогамма)глобулінемія(синдром Брутона).
2. Загальний варіабельний імунодефіцит (загальна варіабельна гіпогаммаглобулінемія).
3. Транзиторна гіпогаммаглобулінемія у дітей (повільний імунологічний старт).
4. Селективний дефіцит імуноглобулінів (дисгаммаглобулінемія).

*ІІ. Дефіцит клітинної ланки імунітету:*

1. Синдром Ді Джорджі (гіпо-, аплазія тимуса).
2. Хронічний слизово-шкірний кандидоз.

*ІІІ. Комбіновані Т- і В-імунодефіцити:*

1. Важкий комбінований імунодефіцит:

а) Х-зчеплений;

б) аутосомно-рецесивний.

2. Атаксія – телеангіектазія (синдром Луї–Бар).
3. Синдром Віскотта–Олдріча.
4. Імунодефіцит із підвищеним рівнем імуноглобуліну М (зчеплений із Х-хромосомою).
5. Імунодефіцит із карликовістю.

*ІV. Дефіцит системи фагоцитів:*

1. Хронічний гранулематоз.
2. Синдром Чедіака–Стейнбрінка–Хигасі.
3. Синдром гіперімуноглобулінемії Е (синдром Джоба).
4. Дефіцит експресії молекул адгезії.

*V. Дефіцит системи комплементу.* Вроджений ангіоневротичний набряк.

4. 2 Клінічні форми вроджених імунодефіцитів

## ДЕФІЦИТ ГУМОРАЛЬНОГО (В-ЛАНКА) ІМУНІТЕТУ

### Х-зчеплена агаммаглобулінемія (синдром Брутона)

***Шифр МКХ-10:*** D80.0

Характеристика. Вроджений дефект дозрівання В-лімфоцитів → відсутність або майже повна відсутність антитіл (імуноглобулінів).

***Специфічний дефект.*** Мутація гена BTK (Bruton tyrosine kinase) - блок переходу пре-В → зріла В-клітина.

***Клінічні особливості.*** Маніфест у немовлят після зникнення материнських антитіл: повторні піогенні інфекції (середнє вухо, синуси, пневмонії, сепсис), слабко розвинені лімфоїдні тканини. Хлопчики хворіють частіше (Х-зв'язаний).

***Імунолабораторна діагностика.*** Дуже низькі/відсутні IgG/IgA/IgM (often <100 мг/дл); відсутні/дуже низькі $CD19^+/CD20^+$ В-клітини; нормальні Т-клітини.

***Лікування.*** Довічна замісна імуноглобулінова терапія (внутрішньовенна - IVIG або підшкірна - SCIG), антибіотикотерапія та профілактика; живі вакцини протипоказані.

### Загальна варіабельна імунна недостатність

***Шифр МКХ-10:*** D83.0

***Характеристика.*** Гетерогенна група первинних гуморальних імунодефіцитів зі зниженням одного або декількох класів імуноглобулінів та дефектом вироблення специфічних антитіл.

***Специфічний дефект.*** Різні молекулярні причини (мікросубтипи): дефекти у диференціації В-клітин у плазмоцити, порушення взаємодії Т- і В-клітин. Часто спадкові фактори (різні гени).

***Клінічні особливості.*** Повторні бактеріальні інфекції дихальних шляхів і синуситів, хронічні інфекції, автоімунні захворювання (тромбоцитопенія, гемолітична анемія), лімфаденопатія, підвищений ризик лімфом та гастроінтестинальних проблем (мальабсорбція).

***Імунолабораторна діагностика.*** Зниження сумарного IgG і одного/декількох інших класів (IgA, IgM - Ig - імуноглобулін, Ig - immunoglobulin) при виявленні нездатності виробляти адекватні специфічні антитіла після вакцинації (полісахаридні антигени). Кількість В-лімфоцитів може бути нормальна або знижена; часто дефекти в підкласах IgG.

***Лікування.*** Замісна імуноглобулінова терапія (IVIG/SCIG), антибіотики, лікування автоімунних проявів, скринінг на ускладнення (пухлини).

**Селективний дефіцит IgA**

***Шифр МКХ-10:*** D80.2

***Характеристика.*** Ізольоване зниження або відсутність секреторного і сироваткового IgA (імуноглобулін А). Найпоширеніший первинний імунодефіцит.

***Специфічний дефект.*** Порушення диференціації В-клітин у плазматичні клітини, що продукують IgA; механізми генетично гетерогенні.

***Клінічні особливості.*** Багато хворих без симптомів; у симптомних - рецидивні інфекції дихальних і кишкових шляхів, алергічні та автоімунні захворювання (целіакія). Ризик анафілаксії при переливанні плазми, що містить IgA у хворих з анти-IgA.

***Імунолабораторна діагностика.*** Дуже низький або відсутній IgA при нормальних IgG та IgM; нормальні В- і Т-клітини.

***Лікування.*** Симптоматичне: антибіотики при інфекціях, лікування супутніх алергій/аутоімунних станів; IVIG зазвичай неефективні для відновлення IgA.

**Дефіцит підкласів IgG**

***Шифр МКХ-10:*** D80.3 (залежно від підкласу)

***Характеристика.*** Низькі рівні одного або кількох підкласів IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) при нормальних сумарних IgG іноді.

***Специфічний дефект.*** Генетично гетерогенний; часто порушена відповідь на полісахаридні антигени (наприклад, пневмококові капсульні полісахариди).

***Клінічні особливості.*** Рецидивні бактеріальні інфекції дихальних шляхів, середні вушні інфекції; у дітей може бути тимчасовим.

***Імунолабораторна діагностика.*** Визначення підкласів IgG; оцінка відповіді на полісахаридні вакцини (антипневмококові антитіла).

***Лікування.*** За тяжких або рецидивних інфекцій - IVIG; протокол залежить від клініки.

**Скороминуща гіпогаммаглобулінемія дітей (СГД) (транзиторна дитяча гіпогаммаглобулінемія, транзиторна гіпогаммаглобулінемія раннього віку)**

***Шифр за МКХ-10:*** D80.7

***Характеристика.*** Скороминуща гіпогаммаглобулінемія дітей - це тимчасовий імунодефіцитний стан, який спостерігається у дітей віком від 1 до 5 років. Його основною ознакою є зниження рівнів одного або декількох класів імуноглобулінів (IgG < 500 мг/дл, IgA < 20 мг/дл, IgM < 40 мг/дл) за відсутності інших причин імунодефіциту.

Цей стан є доброякісним і відображає уповільнений розвиток імунної системи, тобто пролонгований варіант фізіологічної гіпогаммаглобулінемії, характерної для дітей 3–6 місяців життя, коли материнські антитіла (IgG) вже зникають, а власний синтез ще не досяг достатнього рівня.

Зазвичай явище зустрічається у 5–8% немовлят і самостійно минає до 1,5–4 років. При цьому зберігаються нормальні розміри лімфатичних вузлів і мигдаликів.

***Специфічний дефект.*** Знижена концентрація сироваткових імуноглобулінів (гіпогаммаглобулінемія) при збереженій кількості В-лімфоцитів.

***Клінічні особливості.*** Початок зазвичай у віці 3–5 місяців, найчастіше проявляється до 2–4 років. У більшості дітей - легкий перебіг або безсимптомний стан, виявлений випадково. У частини пацієнтів - рецидивуючі бактеріальні інфекції, найчастіше: інфекції верхніх дихальних шляхів (бронхіти, синусити, отити); ураження шкіри, слизових оболонок, ЛОР-органів; іноді інфекції сечостатевої системи або кишечника.

Часто спостерігається спадкова схильність до імунодефіциту.

***Імунолабораторна діагностика.*** Зниження рівня одного або кількох класів імуноглобулінів:

- IgG < 500 мг/дл,
- IgA < 20 мг/дл,
- IgM < 40 мг/дл.
- Нормальні показники кількості Т- та В-лімфоцитів.
- Відсутність маркерів інших первинних імунодефіцитів.
- Поступова нормалізація рівня IgG із віком.

***Лікування.*** Патогенетичної імунокорекції не потребує, оскільки стан є самообмежувальним. Проводиться симптоматичне лікування інфекцій відповідно до клінічної ситуації. За наявності частих або тяжких інфекцій можливе тимчасове застосування внутрішньовенного імуноглобуліну (ВВІГ).

Прогноз сприятливий - більшість дітей досягають повного відновлення рівня імуноглобулінів до 4–5 років.

## ДЕФІЦИТ КЛІТИННОГО (Т-ЛАНКИ) ІМУНІТЕТУ

### Синдром Ді Джорджі (Ді Георге) *(гіпо-, аплазія тимуса)*

***Шифр МКХ-10:*** D82.1

***Характеристика.*** Вроджена делеція 22q11.2 → порушення розвитку 3-ї/4-ї зябрових дуг → гіпоплазія тимуса і паращитовидних залоз.

***Специфічний дефект.*** Гаплонедостатність TBX1 та інших генів у 22q11.2 → порушене тимоцитопоез (Т-клітини).

***Клінічні особливості.*** Гіпоплазія тимуса → зниження Т-клітин; вроджені серцеві вади, лицеві аномалії, гіпокальціємія (судоми), часті вірусні й грибкові інфекції; варіабельний фенотип.

***Імунолабораторна діагностика.*** Зниження числа Т-лімфоцитів ($CD3^+$, $CD4^+$), зниження функції Т-клітин; В-клітини та Ig можуть бути нормальні або знижені вторинно.

***Лікування.*** Підтримуюча терапія: корекція гіпокальціємії, профілактика/лікування інфекцій; у виражених випадках - трансплантація тимусної тканини або гемопоетичних стовбурових клітин.

**Дефект активації Т-клітин (наприклад дефекти CD3, ZAP70, MHC класу I/II)**

***Шифр МКХ-10:*** віднесений до D81.* (комбіновані імунодефіцити) залежно від конкретного дефекту

***Характеристика.*** Порушення сигналінгу або молекул поверхні, необхідних для активації/функції Т-лімфоцитів.

***Специфічний дефект.*** Мутації в генах CD3 (компоненти T-cell receptor complex), ZAP70 (tyrosine kinase), дефекти молекул презентації антигену (MHC класу I/II) тощо.

***Клінічні особливості.*** Рецидивні вірусні, опортуністичні і грибкові інфекції; невідповідна відповідь на вакцини; можливі автоімунні прояви і лімфопроліферація.

***Імунолабораторна діагностика.*** Зниження функції Т-клітин при тестах проліферації; відхилення в популяціях $CD4^+/CD8^+$; молекулярна верифікація (генетичний тест).

***Лікування.*** Залежить від дефекту: замісна терапія, антисептична/антибактеріальна профілактика; у важких випадках - трансплантація стовбурових клітин.

**Х-зчеплений гіпер-IgM-синдром (дефект ліганду CD40 / CD40L)**

***Шифр МКХ-10:*** D80.5

***Характеристика.*** Нездатність «перемикатися» з виробництва IgM на інші ізотипи (IgG, IgA, IgE), через дефект взаємодії Т-хелперів і В-клітин.

***Специфічний дефект.*** Мутація CD40L (CD154) на Т-клітинах (Х-зчеплена форма) або дефекти самого CD40 на В-клітинах; порушена соматична гіпермутація і клас-світчинг.

***Клінічні особливості***. Рецидивні бактеріальні інфекції, опортуністичні інфекції (Pneumocystis jirovecii), хронічні гепатити. Часто підвищений рівень IgM.

***Імунолабораторна діагностика.*** Підвищений/нормальний IgM, низькі IgG/IgA; нормальні або підвищені В-клітини; верифікація дефекту CD40L на Т-клітинах.

***Лікування.*** IVIG, профілактика Pneumocystis (наприклад триметоприм-сульфаметоксазол), антибіотики; в окремих випадках - трансплантація кісткового мозку.

## КОМБІНОВАНІ (Т- І В-ЛІМФОЦИТАРНІ) ІМУНОДЕФІЦИТИ

Частота – 10–25 % загальної кількості первинних імунодефицитів.

### Важкий комбінований імунодефіцит. Х-зчеплений тип

***Специфічній дефект.*** Порушення диференціювання стовбурової клітини у В- і Т-лімфоциті. Дефект гамма-ланцюга рецептора до інтерлейкіну-2 на Т-лімфоцитах. Гамма-ланцюг – трансдуктор сигналу при зв’язуванні рецептора з інтерлейкіном-2.

***Аутосомно-рецесивний тип. Специфічний дефект.*** Мутація гена тирозинкінази ZAP-70 – трансдуктора сигналу в Т-лімфоцитах, необхідного для їх проліферації. Характерна відсутність CD8+ клітин у периферичній крові. Локалізація дефекту в хромосомі. Xq 13-21.1.

***Клінічні особливості.*** Рецидивуючі інфекційні захворювання, схуднення, затримка розвитку. Характерні лімфопенія і гіпоплазія тимуса. Кількість і функція Т-лімфоцитів знижена. Гіпогаммаглобулінемія, зниження рівня В-лімфоцитів. Знижені шкірні тести і продукція антитіл. Хворі вмирають у перші 1–2 роки життя від вірусної, бактеріальної, протозойної інфекції або мікозу.

***Лікування.*** Трансплантація кісткового мозку, антибіотикотерапія, внутрішньовенна імуноглобулінотерапія, пересадка клітин ембріональної печінки і тимуса.

**Синдром Луї-Бар (атаксія-телеангіектазія)**

***Шифр МКХ-10:*** D82.3

***Характеристика.*** Аутосомно-рецесивний комбінований імунодефіцит з неврологічними порушеннями.

***Специфічний дефект.*** Мутація гена ATM (11q22.3) → порушення репарації ДНК.

***Клінічні особливості.*** Атаксія, телеангіектазії (судинні «зірочки») на склері та шкірі, хронічні синусити, бронхіти, схильність до злоякісних пухлин.

***Імунолабораторна діагностика.***

- Зниження IgA, IgE, IgG2.
- Т-клітинна недостатність.

***Лікування.*** Переважно симптоматичне: ВВІГ, антибіотики, підтримка функцій нервової системи.

**Синдром Віскотта–Олдріча**

***Шифр МКХ-10:*** D82.0

***Характеристика.*** Х-зчеплений комбінований імунодефіцит, що поєднує імунну недостатність, тромбоцитопенію і екзему.

***Специфічний дефект.*** Мутація гена WASp у локусі Xp11.22–p11.23 → порушення актинового цитоскелета лімфоцитів.

***Клінічні особливості.*** Маніфестує в ранньому дитинстві: кровотечі, екзема, часті інфекції (особливо пневмококи), автоімунні ураження.

***Імунолабораторна діагностика.*** Зниження IgM, підвищення IgA та IgE. Дефект функції Т-лімфоцитів, зменшення їх кількості. Тромбоцити - малі й знижені.

***Лікування.*** Трансплантація кісткового мозку - метод вибору. До того - ВВІГ, антибіотики, контроль кровотеч.

**Синдром Німегена (синдром мікроцефалії з імунодефіцитом)**

Код за МКХ-10: D81.8 - Інші комбіновані імунодефіцити.

***Характеристика.*** Синдром Німегена - це рідкісна форма комбінованого первинного імунодефіциту, що має аутосомно-рецесивний тип спадкування. Захворювання зумовлене мутацією гена NBS1, розташованого на 8-й хромосомі, який кодує білок нібрин. Цей білок бере участь у репарації (відновленні) ДНК. Порушення його функції призводить до накопичення пошкоджень ДНК, геномної нестабільності та підвищеного ризику злоякісних новоутворень.

Синдром ендемічний для Центральної та Східної Європи, особливо серед осіб слов'янського походження, зокрема в Україні та Польщі.

***Специфічний дефект.*** Мутація гена NBS1 (nibrin) на 8q21. Дефект механізмів репарації ДНК. Комбінований імунодефіцит із переважним ураженням Т-лімфоцитів.

***Клінічні особливості.*** Мікроцефалія, яка прогресує з віком. Диспластичні риси обличчя: низьке чоло, виступаючі вилиці, великий ніс, великі відстовбурчені вуха ("пташине обличчя"). Неврологічні аномалії: субарахноїдальні кісти, агенезія мозолистого тіла, гідроцефалія. Затримка фізичного та статевого розвитку, іноді - розумова відсталість (олігофренія). Порушення пігментації шкіри - плями типу «кави з молоком», телангіектазії, невуси, гемангіоми. Передчасна сивина. Рецидивуючі інфекції дихальних шляхів (бронхіти, пневмонії) з подальшим формуванням бронхоектазів. Висока схильність до злоякісних новоутворень (лімфоми, гострий лімфобластний лейкоз, лімфогранулематоз).

***Імунолабораторна діагностика:***

- Лімфопенія, переважно за рахунок зниження $CD4^+$ Т-лімфоцитів.
- Інверсія співвідношення $CD4^+/CD8^+$.
- Підвищення кількості NK-клітин.
- Дефіцит IgA і субкласів IgG, що може призводити до гіпогаммаглобулінемії.

- IgM - у нормі або підвищений.
- Цитогенетичні дослідження можуть виявляти аномалії хромосом у лімфоцитах.

***Лікування.*** Трансплантація стовбурових клітин кісткового мозку (ТСКМ) - основний метод лікування. Симптоматична терапія інфекційних ускладнень (антибіотики, протигрибкові препарати). Уникнення опромінення (рентгенологічні процедури небажані через підвищену чутливість клітин до радіації). Імунопідтримувальна терапія - за показаннями внутрішньовенний імуноглобулін (ВВІГ). Регулярний моніторинг на наявність злоякісних новоутворень.

**Імунодефіцит з підвищеним рівнем імуноглобуліну М (зчеплений з Х-хромосомою)**

***Шифр МКХ-10:*** D81.0.

Х-зчеплена форма імунної недостатності з аномалією ліганду CD40 і гіперімуноглобулінемією М є комбінованим первинним імунодефіцитом.

***Специфічній дефект.*** Відсутність на Т-хелперах CD40 ліганду. Взаємодія Т- і В-лімфоцитів за рахунок контакту молекул Cd40 ліганд – CD40 є критичною подією, необхідною для перемикання В-клітин із синтезу IgM на синтез імуноглобулінів інших ізотипів і формування клона плазматичних клітин відповідної специфічності. Низькі рівні IgG, A і E. Локалізація в хромосомі. Xq 26.27. Х-зчеплена форма.

***Клінічні особливості.*** Хворіють хлопчики. Характерні рецидивуючі бактеріальні інфекції, підвищена частота опортуністичних інфекцій, зокрема, обумовлених Pneumocystis carinii.

***Лікування.*** Замісна терапія. Антибактеріальні препарати. Введення розчинного CD40 ліганда.

**Імунодефіцит із карликовістю**

***Клінічні особливості.*** Синдром кишкової мальабсорбції, рецидивуючі інфекційні захворювання.

# ДЕФІЦИТ СИСТЕМИ ФАГОЦИТІВ

## Хронічна гранулематозна хвороба

***Шифр МКХ-10:*** D71

***Характеристика.*** Функціональний дефект фагоцитів (нейтрофілів/мікрофагів) через неспроможність утворювати реактивні кислородні радикали для знищення внутрішньоклітинних бактерій і грибків.

***Специфічний дефект.*** Мутації в генах NADPH-оксидази (CYBB - X-зв'язаний; NCF1, NCF2 тощо) → дефект вироблення супероксид-аніону.

***Клінічні особливості.*** Рецидивні інфекції абсцесів шкіри, печінки, кісток; внутрішньоклітинні інфекції; гранулеми; проблеми з загоєнням.

***Імунолабораторна діагностика.*** Негативний/знижений NBT-тест (nitroblue tetrazolium) або DHR-тест (dihydrorhodamine flow cytometry) - показник дефекту окислювального вибуху; молекулярна верифікація.

***Лікування.*** Антибіотична/протигрибкова профілактика, інтерферон-γ (IFN-γ) у деяких пацієнтів, хірургічний дренаж абсцесів; HSCT у важких випадках.

## Синдром Чедіака-Хігасі

***Шифр МКХ-10:*** віднесений до D82.* (синдроми імунодефіциту з аномаліями органел).

***Характеристика.*** Аутосомно-рецесивне захворювання з дефектом лізосомального/везикулярного трафіку → утворення гігантських гранул у лейкоцитах; поєднання імунодефіциту і альбінізму.

***Специфічний дефект.*** Мутація в гені LYST (also CHS1) → порушений лізосомальний транспорт.

***Клінічні особливості.*** Часті бактеріальні інфекції, часткова альбінізм (гіпонічні волосся/очі), нейропатія, високий ризик «гемофагоцитарної фази» (прогресивний лімфогістіоцитарний синдром).

***Імунолабораторна діагностика.*** Великий періодичний гранулярний (гігантські везикули) фенотип у нейтрофілах; клітинні тести і генетика.

***Лікування.*** HSCT - єдиний довгостроковий метод при тяжкому імунодефіциті; підтримуюча терапія.

**Синдром Джоба (вроджений гіпер-IgE-синдром)**

***Характеристика.*** HIES - клінічний синдром із дуже високим рівнем IgE (імуноглобулін Е) і репетитивними стафілококовими інфекціями шкіри/легенів; існують різні генетичні підтипи (STAT3, DOCK8 та ін.).

***Специфічний дефект.*** Зокрема мутації STAT3 (аутосомно-доминантна форма) або DOCK8 (аутосомно-рецесивна форма) → порушення сигналінгу цитокінів/цитоскелету.

***Клінічні особливості.*** Рецидивний абсцесуючий дерматит, пневмонії з утворенням абсцесів, певні скелетні аномалії, затримка нормальної імунної відповіді.

***Імунолабораторна діагностика.*** Дуже високий IgE; еозинофілія; молекулярне тестування для ідентифікації підтипу.

***Лікування.*** Симптоматичне: антибіотики, контроль екземи; при DOCK8-дефіциті - HSCT показаний.

**Дефект адгезії лейкоцитів**

***Шифр МКХ-10:*** D72.8 (залежно від підтипу).

***Характеристика.*** Порушений вихід нейтрофілів у вогнище інфекції через дефект молекул адгезії → відсутність гною, відтерміноване загоєння ран.

***Специфічний дефект.*** Мутації ITGB2 → відсутність β2-інтегрину (CD18) (LAD I); інші підтипи мають дефекти в селектазах/адгезинах.

***Клінічні особливості.*** Рецидивні інфекції шкіри і слизових, відсутність гнійного процесу всупереч тяжким інфекціям, затримка загоєння пуповини у новонароджених, лейкоцитоз.

***Імунолабораторна діагностика.*** Відсутність/зниження CD18 на нейтрофілах за допомогою потокової цитометрії; клінічні ознаки.

***Лікування.*** HSCT при тяжких формах; агресивна антибактеріальна терапія, рання хірургічна санація інфекцій.

**ДЕФЕКТИ СИСТЕМИ КОМПЛЕМЕНТУ**

## Дефіцит компонентів комплементу (C3, C4, класичний/альтернативний шлях) та спадковий ангіоневротичний набряк (HAE)

***Шифр МКХ-10:*** D84.* (інші вроджені імунодефіцити), для HAE часто D84.1 або специфічні рубрики залежно від національної номенклатури.

***Характеристика.*** Вроджені дефекти окремих компонентів комплементу → підвищена сприйнятливість до певних інфекцій та/або схильність до імунокомплексних захворювань; при дефіциті C1-інгібітора - спадковий ангіоневротичний набряк.

***Специфічний дефект.*** Дефіцит C3 → тяжкі бактеріальні інфекції (особливо менінгококові); дефіцит компонентів класичного шляху (C1q, C1r, C1s, C4) → імунокомплексні захворювання; дефіцит C1-інгібітора (SERPING1 мут.) → HAE.

***Клінічні особливості.*** Рецидивні інфекції при дефіциті C3; рецидивні імунокомплексні захворювання (наприклад системний червоний вовчак) при дефіциті класичного шляху; HAE - напади безклітинного набряку (обличчя, рук, дихальних шляхів), біль у животі.

***Імунолабораторна діагностика.*** Оцінка CH50 (загальна активність класичної ланки), AH50 (альтернативна ланка), пряме визначення окремих компонентів (C3, C4), рівень C1-інгібітора (функція і кількість).

***Лікування.*** Для HAE - гостра терапія C1-інгібітором (концентрат), іонгибітори брадикинину (інакші препарати), профілактика (антиандрогени/ланінаксимаб/ингибітори). Для дефіциту комплементу - профілактика інфекцій (вакцинація проти пневмокока, менінгокока), антибіотики при інфекціях; у деяких випадках - замісна терапія компонентами (украй рідко).

## 4.3 Діагностика вроджених імунодефіцитів

Основу становлять **анамнез** і **фізикальне дослідження**, що допомагають визначити уражену ланку імунітету та спланувати лабораторні тести. Первинні імунодефіцити зазвичай є вродженими і проявляються у перший рік життя.

### 4.3.1 Анамнез

**Рецидивуючі інфекції дихальних шляхів** - типовий прояв, спричинюваний Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis тощо. У дітей, які часто контактують з іншими (садок, школа), часті застуди можуть бути нормою.

**Атопія** (алергічні захворювання) нехарактерна для імунодефіцитів, хоча може імітувати їх.

**Затримка розвитку** частіше спостерігається при клітинних дефіцитах, особливо за наявності хронічної діареї чи інфекцій.

**Хронічна діарея** або синдром мальабсорбції можуть бути зумовлені інфекціями (Giardia lamblia, Cryptosporidium spp., Escherichia coli, ротавіруси тощо).

Враховують **перебіг вагітності матері**, **гестаційний вік** (у недоношених можлива гіпогаммаглобулінемія через нестачу материнських IgG).

**Переливання крові** у хворих із клітинними дефіцитами може спричинити реакцію «трансплантат проти господаря».

**Живі вакцини** небезпечні при клітинних імунодефіцитах.

З’ясовують ефективність **антимікробної терапії** та призначення імуноглобулінів.

Уточнюють **хірургічні втручання** (тонзилектомія, дренування пазух), аналізують гістологічні зміни мигдалин.

Оцінюють **ризики ВІЛ-інфекції** (статеві контакти, наркоманія, переливання).

**Сімейний анамнез:** випадки ранньої смерті, інфекцій, автоімунних хвороб; враховують можливість споріднених шлюбів.

**Алергічні захворювання** чи **муковісцидоз** у родичів зменшують ймовірність первинного імунодефіциту.

Враховується **раса**, адже деякі патології частіші в певних етнічних групах.

### 4.3.2 Фізикальне дослідження

У тяжких випадках – блідість, млявість, втрата ваги.

Ріст і маса: відставання притаманне клітинним дефіцитам, при гуморальних – розвиток зазвичай нормальний.

Лімфатична система: при імунодефіцитах мигдалики і лімфовузли зменшені або відсутні; іноді, навпаки, збільшені (наприклад, при синдромі гіпер-IgM).

Кандидоз тривалий і тяжкий, рецидивує без провокуючих чинників.

Часті отити, синусити, риніти, хронічний бронхіт, бронхоектази.

При дефектах фагоцитів – пародонтит, гнійники, абсцеси.

Виразки слизових, артралгії, кон’юнктивіт, вірусний енцефаліт можуть бути проявами імунодефіциту.

Пізнє відпадання пуповини свідчить про дефіцит адгезії лейкоцитів (CD11/CD18).

### 4.3.3 Лабораторні методи дослідження

**Загальний аналіз крові** дає змогу виявити анемію, лейкопенію або тромбоцитопенію. У нормі кількість нейтрофілів має бути не менше **1 800/мкл**, лімфоцитів - **1 000/мкл**, а в дітей до 2 років - не менше **2 800/мкл**. Оскільки **Т-лімфоцити** становлять близько 75 % усіх лімфоцитів, **лімфопенія** зазвичай вказує на зниження їх кількості.

**Нейтропенія** та **лімфопенія** можуть бути вторинними - при інфекціях, автоімунних хворобах або внаслідок прийому певних ліків, особливо імунодепресантів. У таких випадках аналіз слід повторити. Для пацієнтів із **дефіцитом клітинного імунітету** характерна **еозинофілія**, а при **порушенні адгезії лейкоцитів** спостерігається **постійний лейкоцитоз**.

**Синдром Віскотта–Олдріча** супроводжується зменшенням кількості й розміру тромбоцитів, тоді як при **синдромі гіпер-IgM** та **важкому комбінованому імунодефіциті** може розвиватися **автоімунна тромбоцитопенія**.

Кількісне визначення імуноглобулінів **IgG, IgM і IgA** здійснюють за допомогою методів **простої радіальної імунодифузії** та **нефелометрії**. Отримані результати інтерпретують з урахуванням вікових норм: нормальними вважають показники, що знаходяться в межах **двох стандартних відхилень** від середнього значення для відповідного віку. Якщо рівень імуноглобулінів знижується більш ніж на два стандартних відхилення, діагностують **гіпогаммаглобулінемію**.

Визначення загального рівня **IgE** у сироватці проводять за допомогою **радіоімунного аналізу (РІА)** або **твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА)**. Це дозволяє відрізнити **алергічні захворювання** від **імунодефіцитних станів**. Водночас підвищення рівня IgE можливе і при **імунодефіцитах**, особливо пов’язаних із **дефіцитом клітинного імунітету**. Значне збільшення IgE характерне для **гельмінтозів** та **алергічного бронхолегеневого аспергільозу**. Під час оцінки результатів враховують як метод дослідження, так і **вік пацієнта**.

***Визначення ізогемаглютинінів*** застосовують для орієнтовної оцінки рівня **IgM** у сироватці. У більшості дітей віком понад 6 місяців титр антитіл до **еритроцитарного антигену А** перевищує **1:8**, а до **антигену В - 1:4** (за винятком осіб із групою крові **АВ**). У дітей старше 18 місяців ці показники зазвичай сягають **1:16** і **1:8** відповідно. Інтерпретація результатів ускладнюється, якщо протягом місяця до обстеження вводили **імуноглобуліни**, або якщо в дітей до 6

місяців у сироватці зберігаються **материнські антитіла IgG** до еритроцитарних антигенів.

У дітей обов'язково визначають **рівень хлору в поті** та оцінюють **екзокринну функцію підшлункової залози**, особливо при **рецидивуючих інфекціях дихальних шляхів**, **синдромі мальабсорбції** чи **затримці розвитку**. Нормальний рівень хлору в поті не перевищує **60 мекв/л**. Оскільки в дітей важко отримати вміст дванадцятипалої кишки, функцію підшлункової залози оцінюють за рівнем **каротину в сироватці**: при її недостатності він знижений. У сумнівних випадках проводять **ДНК-аналіз** для виявлення генетичних дефектів, характерних для **муковісцидозу (70–75 % випадків)**.

При **хронічних інфекціях** визначають **швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ)** та проводять **мікроскопію і посів біоматеріалів** (мокротиння, мазків із носа, мигдаликів, калу, сечі) для встановлення збудника. За потреби проводять **рентгенографію**, зокрема в **боковій проєкції черепа**, щоб оцінити стан **піднебінних і глоткових мигдаликів** - їх зменшення характерне для **гіпогаммаглобулінемії**. Виявлення **тимуса** на рентгенограмі грудної клітки у новонароджених свідчить **проти** важкої недостатності клітинного імунітету. Однак слід пам'ятати, що зменшення тимуса можливе при тяжких захворюваннях і не є **патогномонічною** ознакою первинних імунодефіцитів.

**Клітинний імунітет** оцінюють за допомогою **шкірних проб**, що ґрунтуються на **реакціях сповільненого типу (гіперчутливість IV типу)**. Антигени для тестування підбирають з урахуванням **анамнестичних даних**. **Позитивна реакція** виключає важкий дефіцит клітинного імунітету, тоді як **негативна** не має діагностичної цінності без підтвердженого контакту з відповідним антигеном.

У близько **85 % здорових дорослих** спостерігається позитивна реакція (пухир понад 5 мм) на один або кілька антигенів. У дітей позитивні реакції трапляються рідше, але з віком їх частота зростає. Для дітей до 2 років зазвичай використовують антигени **Candida albicans** і **правцевий анатоксин**. Позитивна реакція на **Candida albicans** спостерігається у близько **30 % здорових немовлят**,

а у дітей з **дефіцитом клітинного імунітету** кандидоз розвивається частіше, проте шкірні проби зазвичай **негативні**. Після другої вакцинації **АДС** позитивна проба з правцевим анатоксином спостерігається у **67 %**, а після третьої - у **97 % здорових дітей**. Отже, позитивна шкірна реакція виключає тяжку форму клітинного імунодефіциту, тоді як негативна - не має діагностичного значення.

**Дослідження системи комплементу** проводять, якщо в сімейному анамнезі є **випадки імунодефіциту або автоімунних захворювань**, або якщо клінічна картина викликає підозру на дефіцит комплементу. **Гемолітична активність комплементу** дозволяє оцінити функціональну активність компонентів **класичного шляху активації (С1–С9)**. Проте нормальний показник не виключає дефіциту окремих білків або порушення **альтернативного шляху активації**. Рівень **С3** і **С4** у сироватці визначають методом **радіальної імунодифузії**.

# ВИСНОВКИ

1. У результаті проведеного дослідження встановлено, що проточна цитометрія (flow cytometry) є високоефективним методом кількісного й якісного аналізу клітин, який забезпечує об’єктивну оцінку стану імунної системи. Метод дає змогу одночасно визначати кілька десятків параметрів окремої клітини, що дозволяє отримати багатовимірний профіль імунного статусу пацієнта.

2. Імунофенотипування (визначення клітинних маркерів за допомогою моноклональних антитіл) є ключовим напрямом клінічного застосування проточної цитометрії. Воно використовується для класифікації гематологічних захворювань, зокрема гострих і хронічних лейкозів, лімфом, а також для оцінки імунодефіцитних станів.

3. Проведений аналіз показав, що визначення основних субпопуляцій лімфоцитів (Т-, В-, NK-клітин), а також співвідношення CD4+/CD8+ є основою для діагностики і моніторингу первинних і вторинних імунодефіцитів. Виявлення аберантних фенотипів і мінімальної залишкової хвороби (MRD) сприяє своєчасному коригуванню терапії та прогнозуванню перебігу онкогематологічних процесів.

4. Результати дослідження підтверджують, що проточна цитометрія має широкі можливості для діагностики, стратифікації ризику, оцінки ефективності лікування та контролю відновлення імунної системи після трансплантації.

5. Отримані дані можуть бути використані у клінічній імунології, лабораторній діагностиці та наукових дослідженнях, спрямованих на вдосконалення методів оцінки імунного статусу пацієнтів, а також слугувати методичною основою для розробки нових діагностичних панелей та стандартизованих протоколів для моніторингу імунотерапевтичного лікування, включаючи CAR Т-клітинну терапію.

6. Подальші дослідження мають бути зосереджені на інтеграції результатів проточної цитометрії з іншими високопродуктивними методами (наприклад, секвенуванням нового покоління) для створення комплексних

біомаркерів, що забезпечить більш точне прогнозування та персоналізацію терапевтичних підходів у пацієнтів з імунними та онкогематологічними захворюваннями.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Van der Pan et al. *Performance of spectral flow cytometry and mass cytometry for the study of innate myeloid cell populations.* Frontiers in Immunology. 2023. https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1191992/full?utm_source=chatgpt.com

2. Gustafson M.P., Lin Y., Ryder M. et al. *Strategies for improving the reporting of human immunophenotypes by flow cytometry.* Journal for ImmunoTherapy of Cancer. 2014. https://jitc.biomedcentral.com/articles/10.1186/2051-1426-2-18

3. *Flow Cytometry Unveiled: Expert Perspectives on Multi-Parameter Cell Analysis.* Wiley/Bio-Rad. 2024.

4. Природжені імунодефіцитні захворювання : метод. вказ. для студентів V курсу / упоряд. : П. Г. Кравчун, В. Д. Бабаджан, О. Ю. Борзова, П. І. Ринчак. — Харків : ХНМУ, 2013. — 32 с. https://repo.knmu.edu.ua/server/api/core/bitstreams/f3c97961-ee01-4736-9d56-6bca2d9544ea/content

5. Таблиця 15.17-1. Класифікація первинних імунодефіцитів (вроджених помилок імунітету) та окремі приклади за IUIS (2022). https://empendium.com/ua/table/027_9917

6. ДФУ_1.4_OCR. *2.7.24. Проточна цитометрія* [Електронний ресурс]. - Одеса: Одесский национальный медицинський університет, 2016. - С. 135. https://studfile.net/preview/5164671/page:13/

7. Du X., Chen X., Gao C. et al. *Recent Developments (After 2020) in Flow Cytometry Worldwide and Within China.* Biosensors. 2025. https://www.mdpi.com/2079-6374/15/3/156?utm_source=chatgpt.com