Захын цусны дархлааны эсүүдийн тоог малтиплекс оношлуур ашиглан тодорхойлсон дүн

З.Гэрэлцэцэг[1,2],Б.Бадмаараг[1], Б.Энх-Амар[1], Н.Золмөнх[1,2],С.Цогтсайхан[1], Д.Нямбаяр[1], Т.Хонгорзул[1,2]

АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын Сургуулийн Дархлаа судлалын тэнхим[1],

АШУҮИС-ийн Монгол-Японы эмнэлгийн Эмнэлзүйн Төв Лаборатори[2],

Цахим шуудан: gereltsetseg@mnums.edu.mn

Утас: 80044240, 99157313

Түлхүүр үг:
Иммунофенотип
Флоуцитометр
Туяарагч моноклон эсрэгбие
Холимог эсрэгбие

Товч утга:

Үндэслэл: Улс үндэстэн бүр өөрийн дархлааны эсийн дундаж тоог тодорхойлсон байдаг ба эсийн тоо нь нас, хүйс, амьдралын хэв маягийн ялгаатай байдлаас шалтгаалан өөрчлөгдөж байгааг мэдээлсэн байдаг. Хүний захын цусан дах дархлааны эсүүдийн тоо хэмжээ нь дархлааны байдлыг үнэлэх чухал үзүүлэлт юм. Зорилго: Дархлааны эсүүдийн тоог шинжлэх нь дархлаа тогтолцооны байдлыг үнэлэх, дархлаа хямралт өвчнийг оношлох, эмнэл зүйн ажиглалт хийх, өвчний хүндрэлээс сэргийлэх, тавиланг тодорхойлоход ач холбогдолтой юм. **Арга, аргачлал:** Дархлааны эсийн тоог урсгал эс тоолуурын арга (флоуцитометр)-аар шинжлэх нь эсийн фенотипт үндэслэн тоо, эзлэх хувийг тодорхойлохоос гадна үйл ажиллагааны байдлыг үнэлэх боломжийг олгодог. Дархлааны эсийн шинжилгээ өгөхөөр ирсэн хүмүүсийн захын цусны дархлааны 10 төрлийн эсийн тоог нэг оношлуур ашиглан дэвшилтэт аргаар тодорхойлсонд бидний судалгааны шинэлэг тал оршино. **Үр дүн:** Малтиплекс ба бэлтгэсэн оношлуураар тодорхойлсон эсүүдийн дундаж тоонд статистик ач холбогдол бүхий ялгаа илрээгүй (стюдент т тест, р утга 0.67-0.96). Оношлуурын үр дүнгийн нийцлийг кохен каппа үзүүлэлтээр тооцоход хүчтэй нийцэлтэй (0.80-0.95) байсан нь малтиплекс оношлуурыг бэлтгэсэн эсрэгбиеийн холимгоор орлуулах боломжтойг илтгэж байна. **Дүгнэлт:** Дархлаа хямралт эмгэгийн өгүүлэмжтэй хүмүүсийн дархлааны эсийн дундаж тоог малтиплекс оношлуурын лавламж хэмжээтэй харьцуулахад харилцан адилгүй тодорхойлогдов. Малтиплекс оношлуурыг эсрэгбиеийн холимгоор орлуулан дархлааны эсийн шинжилгээг хийх боломжтой байна.

Үндэслэл: Дархлаа тогтолцооны эсүүдийн үйл ажиллагааны идэвхи гадаад дотоод орчны нөлөө, таргалалт, хавдар, насны онцлог, халдварт өвчин зэргээс шалтгаалан өөрчлөгдөж байдаг. Аутоиммун өвчин, дархлаа дутмагшил, харшил, хавдар зэрэг дархлааны хариу урвалын өөрчлөлтөөр илэрдэг эмгэгүүд, мөн эд эрхтэн шилжүүлэн суулгалтын үед өвчтөний биеийн байдлыг үнэлэх, эмчилгээг сонгох, эмчилгээний үр дүнг хянах, тавиланг тогтоох зорилгоор дархлааны түвшинг тодорхойлох шинжилгээг хийдэг байна.[1,2] АНУ-ын дархлаа судлаач Хонг нар дархлааны идэвхийг гурван түвшинд тодорхойлох зарчмыг санал болгосон. Үүнд: нэгдүгээр түвшинд захын цусны лимфоцитийн бүлэг, дэд бүлгийн тоо, бүтэц, ийлдсийн иммуноглобулины анги, дэд бүлгийг, хоёрдугаар түвшинд лимфоцитийн болон мононуклеар эсийн гадаргуугийн маркерийг тодорхойлох, дархлааны эдийн шинжилгээ (иммуногистохими), гуравдугаар түвшинд залгиур эсийн идэвхи, хавсаргын бүрдлийг тодорхойлох зэрэг шинжилгээ ордог байна.

Дархлааны эсүүдийн тоог уламжлалт арга буюу фиколлын уусмал ашиглан нягтын зөрүүгээр ялган, будаж тоолох шинжилгээг 2014 оныг хүртэл хийж эмнэлзүйн тусламж үйлчилгээ үзүүлж байсан. Дархлааны эсийг урсгал эс тоолуурын аргаар шинжлэх нь эсийн фенотипт үндэслэн тоо ба эзлэх хувиас гадна үйл ажиллагааны байдлыг үнэлэх боломжийг олгодог.[3] Эсийн шинжилгээний малтиплекс цомог нь Т эс, Т эсийн дэд бүлэг,[4] В эс, моноцит, NK эс, эозинофил, нейтрофил зэрэг 10 төрлийн эсийг нэгэн зэрэг шинжлэх боломж олгодог.[5-7] Малтиплекс цомог ашиглан урсгал эс тоолуурын аргаар дархлааны эсийг шинжлэх нь дархлаа хямралт эмгэгүүдийн оношилгоо, эмчилгээнд ач холбогдолтой юм.[8,9]

Зорилго: Дархлааны эсийн тоог малтиплекс оношлуур болон эсрэгбиеийн холимгоор харьцуулан шинжлэх

Арга, аргачлал: Энэхүү судалгааг АШУҮИС-ийн ШУТДС-ийн санхүүжилттэй хэрэгжсэн “Дархлаа хяналтын дэвшилтэт технологийг нутагшуулах, арга зүйг боловсруулан эмнэлзүйн практикт нэвтрүүлэх нь” төслийн хүрээнд Био-Анагаахын сургуулийн Эмнэлзүйн эмгэг судлалын лабораторийг түшиглэн туршилт судалгааны загвараар хийж гүйцэтгэв. АШУҮИС-ийн Судалгааны ёс зүйн хяналтын хорооны 2017 оны 06 сарын 21-ний өдрийн №2017/3-09 тоот хурлаар төслийн судалгааг эхлүүлэх ёс зүйн зөвшөөрөл авсан. Судалгаанд дархлаа хямралт өвчний өгүүлэмжтэй 30 оролцогчийг хамруулж, шинжилгээний мэдээллийг 2023 онд боловсруулж эрдэм шинжилгээний зорилгоор ашиглав. Судалгаанд оролцогчийн захын цусыг үл бүлэгнүүлэгчтэй хуруу шилэнд авч, малтиплекс оношлуур (7-color Immunophenotyping kit, Miltenyi Biotec, Germany)-т дагалдуулсан протоколын дагуу эсрэгбиеийн холимгоор үйлчилнэ. Үүний дараа улаан эс задлагч уусмал (BD Pharm lyse lysing buffer)-аас шинжлэгдэхүүн дээр нэмэн, дархлааны эсүүдийг урсгал эс тоолуурын анализатор (MACSQaunt analyzer 10, Miltenyi biotec, Germany)-аар шинжлэв. Урсгал эс тоолуурын шинжилгээний үр дүнг MACSQuantify™, Flowjo 10.6 программ ашиглан боловсруулж, эсийн гадаргуугийн CD маркерт үндэслэн эсийн төрөл, эсийн тоон үзүүлэлт (эс/мкл), эзлэх хувь (%)-ийг тус тус тодорхойлов.[10] Нийт эсийг FSC-H ба FSC-A, лейкоцитийг SSC-H ба CD45, В эсийг CD19, нийт Т эсийг CD3, CD4 Т эсийг CD4, CD8 Т эсийг CD8, моноцитийг CD14, эозинофил болон нейтрофилийг CD56 ба CD16, NK болон CD3+CD56+ эсийг CD3 ба CD56 үзүүлэлтэд үндэслэн хүрээлж эсүүдийн эзлэх хувь ба тоон үзүүлэлтийг (эс/мкл) тус тус тодорхойлов. (Зураг 1)



Зураг 1. А.Малтиплекс оношлуур (Miltenyi Biotec) В.Эсрэгбиеийн холимог (BioLegend)

Дархлааны эсийг гадаргуугийн CD маркерт үндэслэн тодорхойлсон иммунофенотипийг харуулав. (Хүснэгт 1)

Хүснэгт 1. Дархлааны эсийн төрлийг тодорхойлох аргачлал

Д/д	Эсийн төрөл	Иммунофенотип
1	Лейкоцит	CD45+
2	Т эс	CD45+CD3+
3	CD4 Тэс	CD45+CD3+CD4+
4	CD8 Т эс	CD45+CD3+CD8+
5	В эс	CD45+CD19+
6	Моноцит	CD45+CD14+
7	NK эс	SSClowCD45+CD14-CD56+C-D16+CD3-
8	CD3+CD56+эс	SSClowCD45+CD14-CD56+C-D16+CD3+
9	Эозинофил	SSChighCD45+CD14-CD16-
10	Нейтрофил	SSChighCD45+CD14-CD16+

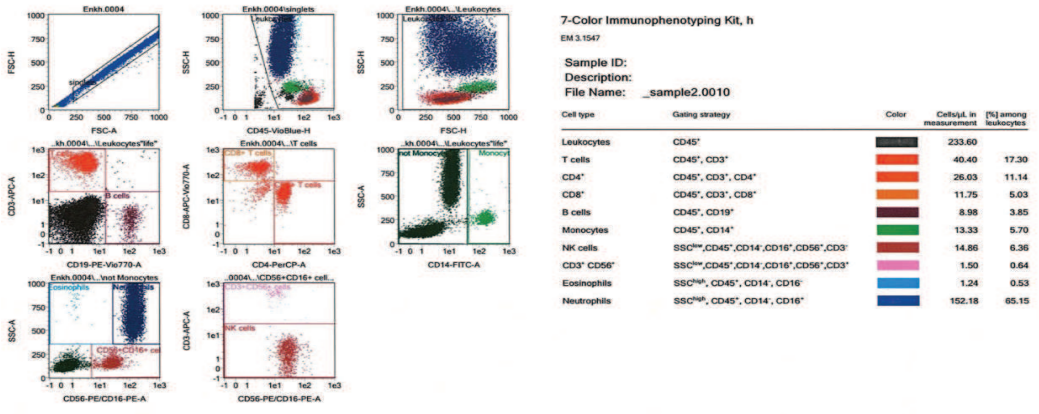
Тайлбар: *SSC хажуугийн шулуутгагч*

Малтиплекс оношлуур (Miltenyi Biotec)-ыг орлуулан бэлтгэсэн эсрэгбиеийн холимог (BioLegend)-ийн найрлагыг харуулав. (Хүснэгт 2)

Хүснэгт 2. Бэлтгэсэн эсрэгбиеийн холимгийн найрлага

Д/д	Эсрэгбие	Клон	Туяарагч бодис	Концентраци (мкг/мл)
1	Анти-CD3	OKT3	BV421	0.62
2	Анти-CD4	SK3	BV510	2.5
3	Анти-CD8	HIT8a	PECy7	0.62
4	Анти-CD14	HCD14	PerCP	1.25
5	Анти-CD16	3G8	FITC	2.5
6	Анти-CD19	HIB19	APC	2.5
7	Анти-CD45	2D1	APC770	2.5
8	Анти- CD56	HCD56	PE	2.5

Үр дүн: Судалгаанд хамрагдагсдын дархлааны эсийг малтиплекс оношлуур ашиглан тодорхойлсон байдлыг харуулав (Зураг 2). Лейкоцит (CD45+)-ийн дотор Т эс (CD19- CD3+) ба В эс (CD19+ CD3-), Т эсийн дотор CD4 Т эс (CD8- CD4+) ба CD8 Т эс (CD8+ CD4-)-ийг тодорхойлов.



Зураг 2. Дархлааны эсийн шинжилгээний хариу

Судалгаанд оролцогчдын захын цусны дархлааны эсүүдийн тоог оношлуурын лавламж хэмжээтэй харьцуулан харуулав (Хүснэгт 3).

Хүснэгт 3. Малтиплекс оношлуур ашиглан тодорхойлсон дархлааны эсийн дундаж тоо (эс/мкл)

Дархлааны эс	Лавламж хэмжээ*	Арифметик дундаж ± стандарт хазайлт	Медиан	Хамгийн их утга	Хамгийн бага утга
Лейкоцит	194.68	300.12±151.7	272.08	678.49	102.72
Т эс	49.57	57.10±20.5	53.12	92.57	31.60
CD4Т эс	34.28	29.96±15.6	29.58	64.23	2.27
CD8Т эс	12.9	22.12±12.7	17.73	59.94	1.07
В эс	12.84	13.24±7.9	11.19	32.64	2.30
Моноцит	18.72	16.89±9.3	14.39	40.07	0.00
NK эс	9.25	15.45±13.1	12.51	73.13	0.61
CD3+ CD56+ эс	2.98	4.93±2.9	4.02	10.22	1.16
Эозинофил	12.76	8.45±6.3	6.25	26.08	1.61
Нейтрофил	85.15	186.52±139.0	144.73	595.73	14.22

Тайлбар: **Үйлдвэрлэгчийн санал болгосон лавламж хэмжээ*

Судалгаанд оролцогчдын эсийн тоог үйлдвэрлэгчийн санал болгосон лавламж хэмжээтэй харьцуулахад лейкоцит, Т эс, CD8 Т эс, В эс, NK эс, CD3+ CD56+ эс, нейтрофилийн тоо хэмжээ өндөр, CD4Т эс, моноцит, эозинофилийн тоо хэмжээ бага байв.

Малтиплекс цомгийг дагалдуулсан лавлах хэмжээнд лейкоцитийн тоог 194.6 эс/мкл гэсэнтэй дүйцүүлэн лейкоцитийн тоог 200 эс/мкл байхаар тооцож, эсүүдийн эзлэх хувиар Т эс, CD4Т эс, CD8Т эс, В эс, моноцит, NK, CD3+56+ эс, эозинофил, нейтрофилийн тоог тодорхойлов (Хүснэгт 4).

Хүснэгт 4. Дархлааны эсийг зэрэгцүүлэн шинжилсэн үр дүн

Дархлааны эс	Лавламж хэмжээ*	Дархлааны эсийн тоо (эс/мкл)		p утга <0.05	кохен каппа
		Малтиплекс (Д±СХ)	Бэлтгэсэн эсрэгбие (Д±СХ)		
Лейкоцит	194.6	200	200		0.95
Т эс	49.5	62.2±15.6	58.1±13.2	0.67	0.9
CD4Т эс	34.2	27.1±5.5	25.9±4.7	0.72	0.9
CD8Т эс	12.9	24.7±9.4	22.7±7.8	0.73	0.85
В эс	12.8	7.3±1.6	7.1±0.7	0.85	0.9
Моноцит	18.7	10.1±4.5	10.0±3.6	0.96	0.9
NK эс	9.2	5.8±1.5	6.2±1.6	0.71	0.8
CD3+ CD56+ эс	2.9	3.1±3.2	2.2±2.1	0.78	0.8
Эозинофил	12.7	0.9±0.4	0.9±0.4	0.94	0.9
Нейтрофил	85.1	52.1±15.2	53.5±14.8	0.87	1.0

***Тайлбар:** *Малтиплекс цомгийн үйлдвэрлэгчийн лавлах хэмжээ*

Малтиплекс ба бэлтгэсэн оношлууpаар тодорхойлсон эсүүдийн дундаж тоонд статистик ач холбогдол бүхий ялгаа илрээгүй (стюдент т тест, р утга 0.67-0.96). Оношлуурын үр дүнгийн нийцлийг кохен каппа үзүүлэлтээр тооцоход хүчтэй нийцэлтэй (0.80-0.95) байсан нь малтиплекс оношлуурыг бэлтгэсэн эсрэгбиеийн холимгоор орлуулах боломжтойг илтгэж байна.

Хэлцэмж: Манай оронд дархлааны эсийг 1989 онд Н.Мөнхтүвшин, Ц.Лхагвасүрэн нар дархан туяаралтын аргаар, 2003 онд Я.Амаржаргал нар, 2005 онд С.Чимидцэрэн нар ХӨСҮТ-д урсгал эс тоолуурын анализаторыг ашиглан тодорхойлж байсан. 2019 онд З.Гэрэлцэцэг, Ц.Номин-Эрдэнэ нар цусны донорын захын цусны дархлааны эсүүдийн дундаж хэмжээг урсгал эс тоолуурын аргаар тодорхойлсон. Энэхүү судалгаа нь туяарагч моноклон эсрэгбиеийн холимог бэлтгэн эсийн шинжилгээ хийсэн үр дүнгээ малтиплекс оношлуурын үр дүнтэй зэрэгцүүлэн судалснаараа шинэлэг ба ач холбогдол өндөртэй юм. Малтиплекс цомгоор нэгэн зэрэг арван төрлийн дархлааны эсийг шинжлэх боломжтой тул бид эдгээр эсийг өөрсдийн бэлтгэсэн туяарагч моноклон эсрэгбиеийн холимгоор тодорхойлж үр дүнг харьцуулан үнэлэв. Захын цусны шинжлэгдэхүүн дэх лейкоцит, В эс, Т эс, CD4Т эс, CD8Т эс, моноцит, эозинофил, нейтрофил, NK эс, CD3+CD56+ эсийн фенотип, тоог малтиплекс ба эсрэгбиеийн холимгоор зэрэгцүүлэн шинжилж, үр дүнг харьцуулан үнэлэхэд эсүүдийн дундаж тоо ойролцоо ($p>0.05$), хүчтэй нийцэлтэй ($k>0.80$) байв. Бидний судалгааны үр дүнгээр бэлтгэсэн цомгоор дархлааны эсийн шинжилгээ хийх нь малтиплекс цомгоос үнийн хувьд хямд байв.

Дүгнэлт: Дархлаа хямралт эмгэгийн өгүүлэмжтэй хүмүүсийн дархлааны эсийн дундаж тоог малтиплекс оношлуурын лавламж хэмжээтэй харьцуулахад харилцан адилгүй тодорхойлогдов. Малтиплекс оношлуурыг эсрэгбиеийн холимгоор орлуулан дархлааны эсийн шинжилгээг хийх боломжтой байна.

Талархал: Энэхүү судалгааг АШУҮИС-ийн ШУТДС-ийн санхүүжилттэй “Дархлаа хяналтын дэвшилтэт технологийг нутагшуулах, арга зүйг боловсруулан эмнэлзүйн практикт нэвтрүүлэх нь” сэдэвт төслийн хүрээнд хийж гүйцэтгэв.

Ном зүй:

1. *Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). European journal of immunology. 2019;49(10):1457-1973.*
2. *Veldhoen ME-I-C. Guidelines for the use of flow cytometry. Immunity, inflammation and disease. 2017;5(4):384-385.*
3. *Actor JK. in Introductory Immunology. . 2014.*
4. *Г.Батбаатар СЦ, С.Чимэдцэрэн, . Дархлаа судлал, 125-227 х,. 2017.*
5. *Stacy Sampson DO. Everything You Should Know About Lymphocytes. 2018; https://www.healthline.com/health/lymphocytes.*
6. *Zaghi E, Calvi M, Marcenaro E, Mavilio D, Di Vito C. Targeting NKG2A to elucidate natural killer cell ontogenesis and to develop novel immune-therapeutic strategies in cancer therapy. Journal of leukocyte biology. 2019;105(6):1243-1251.*
7. *Mocchegiani E, Malavolta M. NK and NKT cell functions in immunosenescence. Aging cell. 2004;3(4):177-184.*
8. *Scheffold A, Kern F. Recent developments in flow cytometry. Journal of clinical immunology. 2000;20(6):400-407.*
9. *Barlogie B, Raber MN, Schumann J, et al. Flow cytometry in clinical cancer research. Cancer research. 1983;43(9):3982-3997.*
10. *Engel P, Boumsell L, Balderas R, et al. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2015;195(10):4555-4563.*

Immunophenotyping of peripheral blood immune cells using a multiplex diagnostic kit

Gereltsetseg Z[1,2],Badmaarag B[1], Enkh-Amar B[1], Zolmunkh N[1,2], Tsogtsaikhan S[1], Nyambayar D[1], Khongorzul D[1,2]

Department of Immunology, School of Biomedicine, MNUMS[1]

Central clinical laboratory, Mongolia-Japan Hospital, MNUMS[2],

E-mail: gereltsetseg@mnums.edu.mn

Tel: +976-80044240,

Keywords:
flow cytometry
Antibody mixture
Immune diagnosis

Background: Flow cytometric immunophenotyping of peripheral blood immune cells is a powerful tool for evaluating cellular immunity, assessing immune status and monitoring immune-mediated diseases.

Aim: The objective of comparing the number of immune cells by flow cytometry with multiplex diagnostic kit and antibody mixture was proposed.

Materials and Methods: The study included 30 participants with a history of immunocompromised diseases, and the number of peripheral blood immune cells was measured using a multiplex diagnostic kit (7-color Immunophenotyping kit, Miltenyi Biotec, Germany) or a mixture of antibodies (BioLegend) analyzed by using a flow cytometry (MACSQuant analyzer 10, Miltenyi Biotec, Germany).

Results: There was no statistically significant difference ($p>0.05$) and the Cohen kappa compatibility coefficient was strong (0.80-0.95) in the mean number of immune cells determined by the multiplex kit and the prepared antibody mixture. The mean immune cell count of the study participants was determined differently compared to the multiplex diagnostic reference range. **Conclusion:** It is now possible to replace the multiplex diagnostic with a mixture of antibodies to perform immune cell analysis.