

Метод проточной цитометрии с визуализацией для оценки естественных киллеров человека

Аннотация

Рассмотрено применение лазерной проточной цитометрии с визуализацией для оценки поверхностных маркеров естественных киллеров (НК-клеток) человека. Клетки выделяли из лимфоцитов периферической крови здоровых доноров. Показаны возможности многоцветной цитометрии с визуализацией для определения уровня экспрессии поверхностных маркеров НК-клеток и их активации в процессе культивирования *in vitro*.

Введение

Особое место среди лимфоцитов занимает субпопуляция естественных киллеров (НК-клеток – natural killer), обладающих цитотоксической активностью в отношении вирусинфицированных и трансформированных клеток [1]. Имея противовирусное и противоопухолевое действие, иммунотерапия на основе НК-клеток представляет собой перспективное направление исследований [2]-[5]. Она потенциально более безопасна, чем другие виды клеточной иммунотерапии, потому что НК-клетки не вызывают развития «цитокинового шторма» [3]. Для рационального использования НК-клеток в противоопухолевой терапии необходимо знать морфологические особенности и функциональные характеристики этих лимфоцитов врожденного иммунитета [6]. Экспрессия CD56 и CD16 и отсутствие CD3-рецепторов являются основными фенотипическими характеристиками НК-клеток [7].

У онкологических больных функция НК-клеток, как правило, ингибируется из-за сниженной экспрессии рецепторов, активирующих НК-клетки, что уменьшает их активность по уничтожению опухолей [8], [9]. Поэтому общепринятым подходом является активация лимфоцитов *in vitro*. Культивирование субпопуляций лимфоцитов в присутствии различных комбинаций цитокинов, факторов роста и/или фидерных клеток остается основным методом получения функционально активных НК-клеток [10], [11].

Противоопухолевая и цитотоксическая функция НК-клеток зависит от комбинации различных поверхностных рецепторов, которые можно идентифицировать при помощи проточной цитометрии. По функциональным характеристикам различают активационные и ингибиторные рецепторы [12]. Многие из них принадлежат к семейству иммуноглобулин-подобных рецепторов (KIR) или лектин-подобных рецепторов. Основными активационными рецепторами являются CD38, HLA-DR, NKG2D, NKp30, NKp44 и NKp46. Среди ингибирующих рецепторов, идентифицирующих молекулы MHC класса I, выделяют KIR2DL и KIR3DL; CD94/NKG2A и LIR [13], [14].

В настоящее время нет единого стандарта для стимуляции лимфоцитов *in vitro*, поэтому необходимо проводить дальнейшие исследования по подбору условий культивирования НК-клеток с обязательной оценкой рецепторов активации на клеточной поверхности.

Целью рассматриваемой работы было оценить количество Т- и НК-клеток и уровень поверхностной экспрессии маркеров активации на них после культивирования лимфоцитов здоровых доноров на протяжении 10 суток при помощи проточной цитометрии с визуализацией.

Материалы и методы

В исследовании участвовали 5 человек в возрасте от 34 до 67 лет (средний возраст – 46 лет). Все пациенты были проинформированы о целях исследования. Образцы периферической крови собирали в утренние часы в лаборатории «Инвитро» (Россия) в вакутейнеры с гепарином натрия.

Выделение лимфоцитов из периферической крови

Периферические мононуклеарные клетки (МНК) выделяли по стандартной методике из гепаринизированной венозной крови на градиенте плотности «Histopaque-1077» («SigmaAldrich», Великобритания). Для этого разбавленную в два раза физиологическим раствором венозную кровь наслаивали на градиент плотности и центрифугировали в течение 20 мин при 400 G. Собирали МНК и двукратно отмывали в PBS центрифугированием. Выделенные лимфоциты подсчитывали и ресуспендировали в полной питательной среде RPMI-1640 («SigmaAldrich», Великобритания), содержащей 100 мМ пирувата натрия, 10 мг/мл гентамицина («Carbicogn Scientific», США), 5 % фетальной бычьей сыворотки («Capricorn Scientific», США) и 500 МЕ/мл ронколейкина («Биотех», Россия).

Культивирование клеток

Выделенные МНК культивировали в течение 10 дней в концентрации $(1,5 \dots 2) \cdot 10^6$ кл/мл в условиях CO₂-инкубатора при температуре 37 °С с периодической заменой среды через каждые 72 ч. Сразу после выделения МНК и на 10-й день после начала культивирования проводили цитофлуориметрический анализ клеток.

Проточная цитометрия с визуализацией

Для количественного определения маркеров активации НК-клеток и Т-клеток человека использовали «Amnis Image Stream MkII» («Luminex», США) – проточный цитометр с мультиспектральной визуализацией.

Применяли семицветную панель антител против кластеров дифференцировки: CD45, CD3, CD56, CD16, CD38, HLA-DR с соответствующими флуоресцентными красителями FITC, PE, PE-Cy7, BV510, AF700, APC-H7, 7AAD («BD Biosciences», США).

В процессе пробоподготовки клетки отмывали от питательной среды в фосфатном буфере (PBS), после чего вносили коктейль моноклональных антител. Окрашивание проводили при 25 °С в темноте в течение 15 мин. После окрашивания клетки промывали двукратно в PBS. Для стандартизации процессов сбора и анализа данных была подобрана оптимальная концентрация клеток в образце – 500 000 (при необходимости возможно уменьшить концентрацию до 20 000 клеток).

Проточный цитометр «Amnis Image Stream MkII» обеспечивает анализ большого количества изображений каждой клетки в потоке, включая 2 канала в светлом поле и до 10 флуоресцентных каналов на высокой скорости (всего 12 каналов). Для данной панели маркеров задействованы 7 каналов флуоресценции (2, 3, 5, 6, 8, 11, 12 каналы) и 2 канала в светлом поле (1 и 9 канал).

«Amnis Image Stream MkII» имеет следующую комплектацию лазеров: синий лазер (488 нм), красный лазер (642 нм) и фиолетовый лазер (405 нм). Лазеры были настроены на следующие мощности: 405 нм – 80 мВт, 488 нм – 200 мВт, 642 нм – 150 мВт. Изображения в светлом поле были получены в 1 и

9 каналах с автоматически установленной мощностью. Все изображения фиксировались 2 камерами с объективом при увеличении 60х, когда каждый пиксель соответствует области клетки 0,3 x 0,3 мкм. Сбор данных произведен в программном обеспечении «INSPIRE200» («Luminex», США). С каждого образца собирали 10 000 событий (изображений). Анализ изображений проводили при помощи программного обеспечения «IDEAS v6.3» («Luminex», США).

Статистический анализ и обработку данных осуществляли посредством «MS Excel 2016» и «GraphPad Prism 8». Сравнение между группами субпопуляций лимфоцитов на разные дни культивирования проводили при помощи *t*-критерия Стьюдента, отличия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Согласно Федеральному закону от 23.06.2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах», все клеточные линии перед клиническим использованием должны быть охарактеризованы. Основным стандартизованным методом является проточная цитометрия, которая подразумевает количественную характеристику субпопуляций лимфоцитов. Таким образом, основной задачей данного исследования было подобрать условия для использования метода проточной цитометрии с визуализацией для оценки популяции НК-клеток в составе клеточных продуктов.

Для анализа субпопуляций активированных лимфоцитов и оценки доли НК-клеток первоначально был разработан протокол окрашивания для последующего фенотипического анализа при помощи проточного цитометра с визуализацией «Amnis Image Stream MkII».

Для характеристики лимфоцитов была подобрана панель маркеров, которая отражала наличие НК-клеток в суспензии МНК и маркеры их ранней (CD38) и поздней (HLA-DR) активации. При подборе мы учитывали стандартизированные подходы для разработки панелей антител в проточной цитометрии: титрование каждого антитела, используемого в панели; проведение необходимых контролей (ФМО – флуоресценция минус один); подбор оптимальных напряжений на лазерах.

Анализ клеточной популяции начинали с выделения изображений клеток в фокусе с использованием функции «Gradient RMS» с последующим выделением синглетов (Area/Aspect Ratio) по каналам светлого поля и определения количества живых и мертвых клеток по интенсивности окрашивания 7AAD (7-амино-актиномицин D). Полученные данные были проанализированы путем последовательного гейтирования для выявления популяций НК-клеток среди всех CD45+ лимфоцитов (CD3–CD56+CD16+) и Т-клеток (CD45+CD3+), а также маркеров активации для обеих популяций (CD3–CD56+CD38+ и CD3+HLA–DR+). На *рис. 1* показаны единичные клетки, окрашенные подобранным коктейлем антител.

Проточная цитометрия с визуализацией позволяет провести количественное определение локализации и силы флуоресцентного сигнала для таких областей применения, как ядерная транслокация и изменение морфологии в процессе акти-

вазии, и может быть использована для детального изучения иммунологических синопсов. Микроскопический анализ единичных клеток в процессе гейтирования позволяет выполнить «виртуальную сортировку клеток» для оценки и подтверждения клеточного состава внутри специфических популяций в сравнении с классическим методом проточной цитометрии. В рассматриваемой работе при помощи опции визуализации мы показали, что клетки в процессе культивирования изменяют свою форму и морфологию и становятся большими гранулярными лимфоцитами. Размер НК-клеток при этом увеличивается до 20 мкм.

Вторым этапом работы был анализ изменения доли Т- и НК-клеток среди МНК при культивировании на протяжении 10 дней, а также выявление экспрессии поверхностных маркеров после активации. На *рис. 2* представлено распределение субпопуляций лимфоцитов в динамике до начала культивирования и на десятый день. Показано, что количество CD45+CD3+Т-клеток и активированных CD38+, HLA-DR+, HLA-DR+CD38+Т-клеток достоверно увеличивается к десятому дню культивирования ($p \leq 0,05$). Среди проанализированной субпопуляции CD3–CD56+CD16+ НК-клеток значимые отличия выявлены в увеличении доли НК-клеток ($p < 0,05$) и CD38+НК-клеток в 2...3 раза, экспрессирующих ранний маркер активации ($p < 0,01$) к десятому дню культивирования. Количество NKT-лимфоцитов (CD3+CD56+CD16+) достоверно не изменилось.

Заключение

Проточная цитометрия с визуализацией – это инновационная технология, которая позволяет одновременно проводить оценку клеточной популяции, опираясь на статистическую мощность и флуоресцентную чувствительность стандартной проточной цитометрии с пространственным разрешением и морфологическим описанием единичных клеток при помощи микроскопии. Подобранный набор моноклональных антител позволяет охарактеризовать состав клеточных препаратов по содержанию Т-клеток и НК-клеток и их функциональной активности (по наличию маркеров активации CD38 и HLA-DR). Используя данный метод, мы оптимизировали высокопроизводительный и быстрый фенотипический анализ популяции активированных лимфоцитов, включая НК-клетки, который имеет потенциальное клиническое применение в качестве метода оценки эффективности клеточной терапии на основе Т- или НК-клеток.

Список литературы:

1. Vitale M. et al. An Historical Overview: The Discovery of How NK Cells Can Kill Enemies, Recruit Defense Troops, and More // Front Immunol. 2019. Vol. 10. P. 1415.
2. Myers J.A., Miller J.S. Exploring the NK Cell Platform for Cancer Immunotherapy // Nature Reviews Clinical Oncology. 2021. Vol. 18. PP. 85-100.

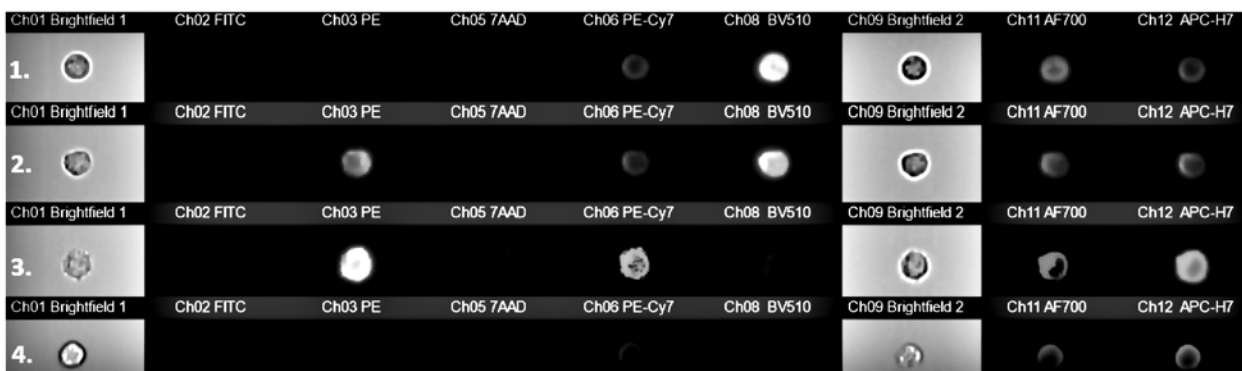


Рис. 1. Микрофотографии единичных НК-клеток среди CD45+ и CD3- клеток со следующими фенотипами CD56+CD16+CD38+ (1), CD56+CD16+HLA–DR+CD38+ (2), CD56+CD16+HLA–DR+ (3) и неактивированных CD56+CD16+ (4), полученные при помощи программного обеспечения «IDEAS v6.3» («Luminex», США)

3. *Rezvani K., Rouse R., Liu E., Shpall E.* Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy // *Molecular Therapy*. 2017. Vol. 25. PP. 1769-1781.
4. *Abakushina E.V., Gelm Y.V., Pasova I.A., Bazhin A.V.* Immunotherapeutic Approaches for the Treatment of Colorectal Cancer // *Biochemistry (Moscow)*. 2019. Vol. 84. PP. 720-728.
5. *Abakushina E.V. et al.* The Advantages and Challenges of Anticancer Dendritic Cell Vaccines and NK Cells in Adoptive Cell Immunotherapy // *Vaccines*. 2021. Vol. 9. P. 1363.
6. *Tarazona R. et al.* Current Progress in NK Cell Biology and NK Cell-Based Cancer Immunotherapy // *Cancer Immunology, Immunother.* 2020. Vol. 69. PP. 879-899.
7. *Liu S. et al.* NK Cell-Based Cancer Immunotherapy: From Basic Biology to Clinical Development // *Journal of Hematology & Oncology*. 2021. Vol. 14. P. 7.
8. *Stringaris K. et al.* Leukemia-Induced Phenotypic and Functional Defects in Natural Killer Cells Predict Failure to Achieve Remission in Acute Myeloid Leukemia // *Haematologica*. 2014. Vol. 99. PP. 836-847.
9. *Pasero C. et al.* Highly effective NK cells are associated with good prognosis in patients with metastatic prostate cancer // *Oncotarget*. 2015. Vol. 6. PP. 14360-14373.
10. *Sangiolo D. et al.* Alloreactivity and Anti-Tumor Activity Segregate within Two Distinct Subsets of Cytokine-Induced Killer (CIK) Cells: Implications for Their Infusion across Major HLA Barriers // *International Immunology*. 2008. Vol. 20. PP. 841-848.
11. *Cheng M. et al.* NK Cell-Based Immunotherapy for Malignant Diseases // *Cellular & Molecular Immunology*. 2013. Vol. 10. PP. 230-252.
12. *Abakushina E.V., Kozlov I.G.* Immunotherapy with the natural killer cells in the treatment of cancer // *Russian Journal of Immunology*. 2016. Vol. 10. PP. 131-142.
13. *Long E.O. et al.* Controlling Natural Killer Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition // *Annual Review of Immunology*. 2013. Vol. 31. PP. 227-258.
14. *Martinet L., Smyth M.* Balancing natural killer cell activation through paired receptors // *Nature Reviews Immunology*. 2015. Vol. 15. PP. 243-254.

Любовь Ильинична Попова,
 канд. биолог. наук, научный сотрудник,
 отдел по исследованию и разработкам
 в области иммунологии,
 ООО «Текон Медицинские приборы»,
 Виктория Александровна Рыбачук,
 магистр,
 кафедра иммунологии,
 биологический факультет,
 ФГБОУ ВО «Московский государственный
 университет им. М.В. Ломоносова»,
 лаборант-исследователь,
 отдел по исследованию и разработкам
 в области иммунологии,
 ООО «Текон Медицинские приборы»,
 Анастасия Петровна Петрикина,
 канд. биолог. наук, научный сотрудник,
 Николай Васильевич Михайловский,
 научный сотрудник,
 Елена Вячеславовна Абакушина,
 д-р мед. наук, руководитель отдела,
 отдел по исследованию и разработкам
 в области иммунологии,
 ООО «Текон Медицинские приборы»,
 г. Москва,
 e-mail: popovali@tecon.ru

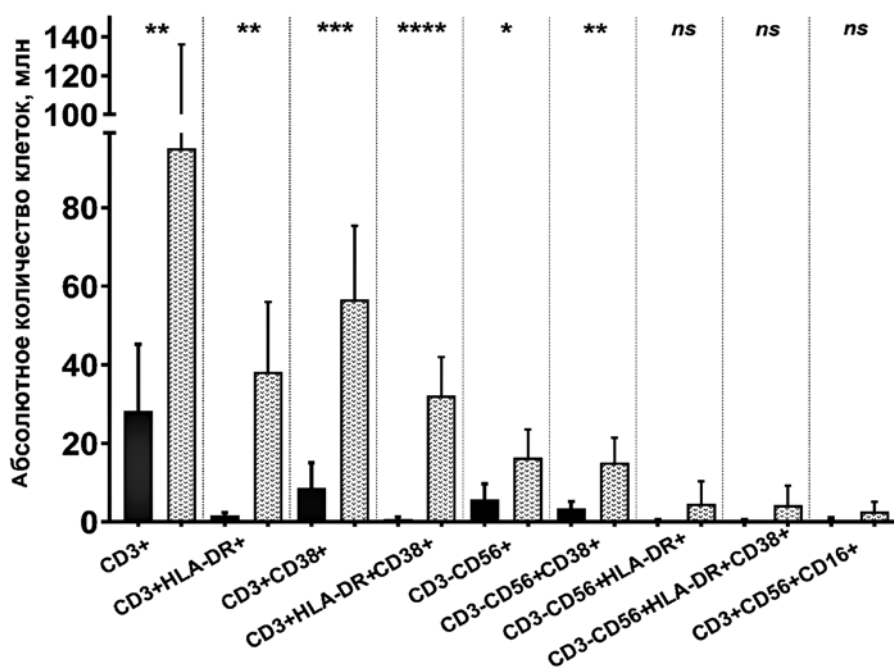


Рис. 2. Распределение субпопуляций Т-клеток и NK-клеток по фенотипу среди активированных *in vitro* CD45+лимфоцитов до активации и через 10 дней культивирования. Обозначения: серый цвет – нулевой день культивирования, белый цвет – десятый день культивирования. На графике отражены медиана+SD; статистический анализ проведен при помощи *t*-теста: **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001; ns – нет статистически значимой разницы