

- tor-beta, and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with long-term kidney allograft survival. *Iran. J. Kidney Dis.* 2010; 4 (2): 141–6.
10. Gupta R.K., Jain M., Sharma R.K. Serum & urinary IL-2 levels as predictors in acute renal allograft rejection. *Indian J. Med. Res.* 2004; 119 (1): 24–7.
  11. Dieterle F., Perentes E., Cordier A., Roth D.R., Verdes P., Grenet O. et al. Urinary clusterin, cystatin C, beta2-microglobulin and total protein as markers to detect drug-induced kidney injury. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28 (5): 463–9.
  12. Pereira A.B., Teixeira A.L., Rezende N.A., Pereira R.M., Miranda D.M., Oliveira E.A. et al. Urinary chemokines and anti-inflammatory molecules in renal transplanted patients as potential biomarkers of graft function: a prospective study. *Int. Urol. Nephrol.* 2012; 44 (5): 1539–48.
  13. Emanuel' V.L. *Laboratory diagnosis of kidney disease [Laboratornaya diagnostika zabolevaniy pochek]* Ed. 2nd, rev. and ext. SPb. Tver': OOO «Izdatel'stvo "Triada"». 2006. (in Russian)
  14. Westhuyzen J., Endre Z.H., Reece G., Reith D.M., Saltissi D., Morgan T.J. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003; 18: 543–51.
  15. Amirzargar A., Lessan-Pezeshki M., Fathi A., Amirzargar M., Khosravi F., Nikbin B. TH1/TH2 cytokine analysis in Iranian renal transplant recipients. *Transplant. Proc.* 2005; 37 (7): 2985–7.
  16. Ozer J.S., Dieterle F., Troth S., Perentes E., Cordier A., Verdes P. et al. A panel of urinary biomarkers to monitor reversibility of renal injury and a serum marker with improved potential to assess renal function. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28: 486–94.
  17. Keown P. A. Predicting long-term outcome in renal transplantation. *Kidney International.* 2013; 84: 650–2.
  18. McDaniel D.O., Rigney D.A., McDaniel K.Y., Windham W.J., Redmond P., Williams B. et al. Early expression profile of inflammatory markers and kidney allograft status. *Transplant. Proc.* 2013; 45(4): 1520–3.
  19. Migal' L. Ya., Bagdasarova I. V., Dashchenko O. O., Korol' L. V., Lavrenchuk O. V., Fomina S. P. *The method of diagnostics of the degree of pyelonephritic process activity in children with pyelonephritis published. Patent UA N 82170, 2008.* (in Ukrainian)
  20. Schoenbach V.J. *Understanding the Fundamentals of Epidemiology: an Evolving Text.* Chapel Hill; 2001: 59–81.
  21. Sheu J.N., Chen S.M., Meng M.H. The role of serum and urine interleukin-8 on acute pyelonephritis and subsequent renal scarring in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2009; 28 (10): 885–90.
  22. Sekine H., Kawasaki Y., Ohara S., Suyama K., Hosoya M. Focal bacterial nephritis without pyuria in a boy presenting with high urinary  $\beta$ 2-MG and NAG levels. *Fukushima J. Med. Sci.* 2014; 60(1): 91–4.
  23. Schaub S., Mayr M., Hönger G., Bestland J., Steiger J., Regeniter A. et al. Detection of subclinical tubular injury after renal transplantation: comparison of urine protein analysis with allograft histopathology. *Transplantation.* 2007; 84(1): 104–12.

Received 27.05.15

© АБАКУШИНА Е.В., 2015

УДК 616-018.1-076.5

Абакушина Е.В.

## МЕТОД ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ НК-КЛЕТОК И ИХ АКТИВНОСТИ

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 249036, г. Обнинск, Калужская область

В обзоре описаны основные характеристики клеток естественных киллеров (НК-клетки) человека, их фенотип и методы определения функциональной активности с помощью проточной цитометрии. НК-клетки играют важную роль во врожденном и адаптивном иммунитете против инфекций и опухолей, и первоначально были охарактеризованы на основе способности лизировать злокачественные и инфицированные клетки без предварительной сенсибилизации или иммунизации. НК-клетки человека имеют фенотип  $CD3^+CD56^+CD16^+$  и могут быть разделены на две субпопуляции в зависимости от уровня экспрессии  $CD56$ .  $CD56^{bright}$  НК-клетки преимущественно участвуют в иммунорегуляции, продуцируя цитокины.  $CD56^{dim}$  НК-клетки в основном обладают цитолитической активностью. НК-клетки опосредуют уничтожение инфицированных и опухолевых клеток через несколько эффекторных механизмов: по средству перфорин/гранзимсодержащих гранул, рецепторов апоптоза и антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности. Цитотоксичность НК-клеток и продукция цитокинов обеспечивают регуляторную роль НК-клеток, как важных участников адаптивной иммунной системы. НК-клетки снабжены различными рецепторами, которые стимулируют или ингибируют их активность. Активация НК-клеток зависит от баланса между ингибирующими и активирующими рецепторами. «Золотым стандартом» определения функциональной активности НК-клеток человека является тест по высвобождению радиоактивного хрома из клеток-мишеней. Этот метод нелегко выполнить в клинической практике из-за трудностей в утилизации радиоактивных отходов, короткого времени полураспада изотопов, дороговизне и сложности в стандартизации. В статье описываются цитофлуориметрические методы для клинического определения активности НК-клеток. Эти методы позволяют избежать ряда проблем, связанных с использованием радиоактивности, а также они быстрые и подлежат стандартизации.

Ключевые слова: клетки естественные киллеры (НК-клетки); фенотип; функция; цитотоксичность; проточный цитометр; цитофлуориметрические методы.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60(11): 37–44.

Abakushina E.V.

THE TECHNIQUE OF FLOW CYTOMETRY IN EVALUATION OF NK-CELLS AND THEIR ACTIVITY

The A.F. Tsiba medical radiological research center - branch of the P.A. Herten Federal medical research center of Minzdrav of Russia, 249036 Obninsk, Russia

Для корреспонденции: Абакушина Елена Вячеславовна, abakushina@mail.ru

For correspondence: Abakushina E.V., abakushina@mail.ru

*The review presents main characteristics of human natural killer cells (NK-cells), their phenotype and methods of detection of functional activities using flow cytometry. The NK-cells play important role in inherent and adaptive immunity against infections and tumors. Initially these cells were characterized on the basis of capacity to lyse malignant and infected cells without preliminary sensibilization or immunization. The human NK-cells have phenotype CD3-CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> and can be separated in two subpopulations depending on level of expression CD56. The CD56<sup>bright</sup> NK-cells predominantly participates immunoregulation producing cytokines. The CD56<sup>dim</sup> NK-cells predominantly have cytolytic activity. The NK-cells mediate destruction of infected and neoplastic cells through several effector mechanisms: by means of perforins/granzyme containing granules, receptors of apoptosis, antibody-dependent cellular mediated cytotoxicity. The cytotoxicity of NK-cells and production of cytokines provide regulatory role of NK-cells as important participants of adaptive immune system. The NK-cells are fitted with various receptors stimulating and inhibiting their activity. The activation of NK-cells depends on balance between inhibiting and activating receptors. The activation of NK-cells depends on balance between inhibiting and activating receptors. "The golden standard" of detection of functional activity of human NK-cells is a test of releasing of radioactive chrome from target cells. To apply this technique in clinical practice is not an easy task because of difficulties of utilization of radioactive waste products, short half lifetime, expensiveness and complicated standardization. The article presents cyto-fluorimetric techniques for clinical detection of activity of NK-cells. These techniques permit to avoid a number of problems related to application of radioactivity. They also are fast and can be standardized.*

**Key words:** *natural killer cells; phenotype; function; cytotoxicity; flow cytometer; cyto-fluorimetric techniques*

**Citation:** *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2015; 60 (11): 37–44. (in Russ.)*

Иммунная система состоит из комплекса сетей клеточных и гуморальных компонентов, которые в первую очередь направлены на борьбу с чужеродными патогенами. Одним из важных компонентов этой системы являются клетки – естественные киллеры (ЕК), или NK-клетки (natural killer cells) [1]. Они относятся к большим гранулярным лимфоцитам, но не имеют на своей поверхности рецепторов Т-клеток (TCR–CD3) или В-клеток (BCR). NK-клетки выделены в особый класс лимфоцитов благодаря их уникальной способности быстро и без предварительной иммунизации лизировать вирусинфицированные и трансформированные клетки-мишени независимо от антител и комплемента. Они опосредуют цитолитическую реакцию в отсутствие молекул главного комплекса гистосовместимости – МНС класса I или II, на поверхности клеток-мишеней [2].

Поверхностные маркеры естественных киллеров. Использование моноклональных антител позволило идентифицировать уникальные поверхностные антигены на NK-клетках, а точнее уникальные комбинации антигенов, которые могут встречаться и у других клеточных типов, таких, как Т-клетки, миеломоноцитарные клетки и В-клетки. Основными антигенными маркерами естественных киллеров являются Fc-рецепторы для иммуноглобулинов, адгезионные молекулы, лектиноподобные рецепторы типа-C (кальцийзависимые), иммуноглобулиноподобные рецепторы (KIR – killer-cell immunoglobulin-like receptor) и рецепторы для цитокинов. Циркулирующие зрелые NK-клетки имеют фенотип CD3-CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD2<sup>dim</sup> и отличаются от Т-клеток отсутствием Т-клеточного рецептора и CD3 [3]. В свою очередь отличие от В-клеток заключается в том, что NK-клетки никогда не экспрессируют мембранные иммуноглобулины (Ig), однако за счет экспрессии FcγRIII они могут быть позитивными при окрашивании антителами.

Фенотип NK-клеток состоит из таких антигенных детерминант, как CD56<sup>+</sup> (N-CAM), CD16<sup>+</sup> (FcγRIIIA), CD122<sup>+</sup> (β-цепь рецептора ИЛ-2), CD161<sup>+</sup> (NKR-P1). Перечень других маркеров, экспрессируемых на своей поверхности NK-клетками, достаточно широк. Это молекулы CD2, CD5, CD7, CD8, CD94, CD96, CD158, CD159, α-цепь рецептора ИЛ-15, семейство молекул NKG2 и другие. Поверхностные маркеры, экспрессируемые активированными NK-клетками, включают целый ряд молекул, таких как CD25, β<sub>1</sub> (CD29) и β<sub>2</sub> (CD18) интегрин, различные активационные антигены, включая HLA-DR, рецептор трансферрина CD71 и CD69. В зависимости от степени активации NK-клеток поверхностные рецепторы могут изменять свою экспрессию за счет повышения или понижения [3].

Одним из основных маркеров, используемых для выявления NK-клеток, является молекула CD16. Антиген CD16 представляет собой низкоаффинный рецептор для IgG (FcγRIII). Другим антигеном является молекула CD56. Данный антиген умеренно экспрессируется на субпопуляциях клеток перифе-

рической крови, таких как большие гранулярные лимфоциты, и всех клетках с NK-активностью. У человека были идентифицированы 2 субпопуляции NK-клеток. Большинство CD56<sup>dim</sup> NK-клеток экспрессируют высокий уровень FcγRIII (CD16) и перфорина, в то время как CD56<sup>bright</sup> NK-клетки являются CD16<sup>neg/low</sup> и перфориннегативными. CD56<sup>dim</sup> NK-клетки обладают непосредственной цитотоксической активностью, в то время как CD56<sup>bright</sup> NK-клетки приобретают ее только после добавления ИЛ-2. CD56<sup>bright</sup> субпопуляция составляет приблизительно 10–20% от общего количества NK-клеток и преимущественно локализованы в лимфатических узлах и экспрессируют L-селектин и рецепторы хемокинов CCR5 и CCR7. CD56<sup>dim</sup> NK-клетки, наоборот, практически отсутствуют в лимфатических узлах, но составляют 95% NK-клеток крови и 85% NK-клеток селезенки. Они экспрессируют рецепторы для хемокинов CCR4, CXCR1 и CX3CR1 [4].

NK-клетки обладают двумя основными функциями. Первая – это лизис опухолевых и инфицированных вирусами клеток. Вторая – регуляция врожденного и адаптивного иммунных ответов за счет секреции цитокинов (IFN-γ, TNFα и ИЛ-10), ростовых факторов (GM-CSF, G-CSF и ИЛ-3) и хемокинов (CCL3, CCL4, CCL5, XCL1 и CXCL8) [4].

Активация NK-клеток регулируется динамическим балансом сигналов, получаемых от активирующих и ингибирующих рецепторов при взаимодействии с потенциальной клеткой-мишенью [5]. NK-клетки способны определять различную плотность поверхностных молекул, экспрессируемых на клетке-мишени. Одновременное взаимодействие множества лигандов с рецепторами NK-клеток приводит к интеграции различных внутриклеточных сигналов, совокупность которых и диктует качество и интенсивность эффекторного ответа NK-клетки. Снижение или отсутствие ингибирующих сигналов приводит к преобладанию сигналов активации, что в конечном итоге ведет к лизису клетки-мишени и выбросу цитокинов. С другой стороны, высокая экспрессия лигандов активации на клетках-мишенях может привести к запуску цитолитической активности NK-клеток и продукции цитокинов, несмотря на нормальную экспрессию молекул МНС класса I на клетке-мишени.

Большинство ингибирующих рецепторов на NK-клетках человека относятся к семействам иммуноглобулиноподобных рецепторов киллерных клеток – KIR и лейкоцитов – LILR (leukocyte Ig-like receptor), а также представлены лейкоцит-ассоциированным иммуноглобулиноподобным рецептором LAIR-1 (leukocyte-associated Ig-like receptor-1) и гетеродимером CD94/NKG2A, который принадлежит к семейству лектинов С-типа [6]. Все ингибирующие рецепторы распознают молекулы антигенов главного комплекса гистосовместимости первого класса (МНС I).

Активирующие рецепторы NK-клеток включают молекулу CD16, а также лектиноподобный рецептор NKG2D,

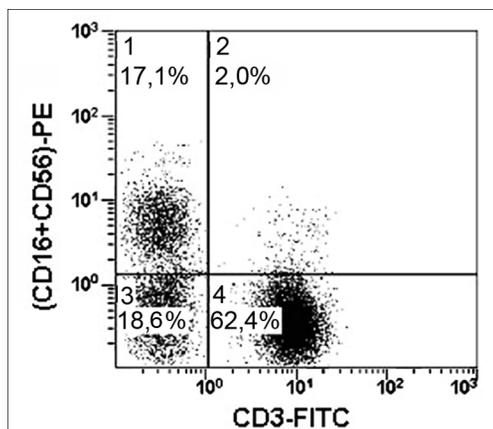


Рис. 1. Гистограмма распределения лимфоцитов периферической крови с использованием моноклональных антител CD3-FITC и CD16<sup>+</sup>CD56-PE.

На гистограмме отображены только CD45<sup>+</sup> лимфоциты.

Квадранты: 1 – NK-клетки; 2 – NKT-клетки; 3 – негативные по CD3 и CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-лимфоциты; 4 – CD3<sup>+</sup> T-клетки.

гетеродимер CD94/NKG2C, рецепторы естественной цитотоксичности NCR (natural cytotoxicity receptors) – NKp46, NKp30, NKp44, NKp80, молекулу адгезии DNAM1 и 2B4 (CD244) [6]. Некоторые рецепторы ЕК-клеток также были обнаружены на  $\alpha\beta$ T- и  $\gamma\delta$ T-клетках.

В основе цитотоксической активности NK-клеток лежат литические механизмы и перфорация мембраны клетки-мишени. Механизм цитотоксичности лимфоцитов связан с активирующими мембранными рецепторами, которые индуцируют секреторный процесс в NK-клетках, где локализируются цитоплазматические везикулы, которые содержат ферменты сериновые эстеразы (гранзим А и В). Они высвобождаются локальным экзоцитозом в пространство между эффекторной клеткой и ее мишенью.

Специализированный механизм киллинга у NK-клеток, также как и у цитотоксических Т-лимфоцитов, связан с содержимым гранул, которые обладают литической активностью. Они способны делать трансмембранные поры в клетке-мишени за счет перфорина [7]. Сразу после связывания цитотоксического лимфоцита с клеткой-мишенью в мембране клетки-мишени образуются поры, происходит экзоцитоз гранул NK-клеток и выход их содержимого – гранзимов. Далее в клетке-мишени запускается каскад литических процессов, что приводит к деградации ДНК и последующей клеточной смерти [8].

В периферической крови NK-клетки составляют от 5 до 20 % циркулирующих лимфоцитов. Существует взаимосвязь между изменением активности NK-клеток и их количеством с клиническими признаками заболеваний у людей. Так, относительное количество NK-клеток и их активность существенно изменяется не только при опухолевых процессах и вирусной инфекции, но и при гнойном воспалении, нарушении функций центральной нервной системы, аутоиммунных заболеваниях и др. [3]. Вероятно, в результате применения более тонких и точных методов исследований, таких как проточная цитометрия и многопараметрический анализ, будут выявлены и другие изменения в субпопуляциях этих клеток при иных патологиях.

До недавнего времени специфичность NK-клеток к мишеням определялась в функциональном тесте *in vitro* по высвобождению радиоизотопа Cr<sup>51</sup> из меченых клеток-мишеней. В настоящее время с применением современных методов проточной цитометрии использование радиоактивных изотопов утрачивает свою популярность. Цитофлуориметрический анализ дает результаты цитотоксической активности NK-клеток сравнимые с тестами по высвобождению радиоактив-

ного Cr<sup>51</sup> с высокой корреляцией ( $r = 0,85$ ), а также метод зарекомендовал себя как быстрый и более простой [9].

Проточная цитометрия является мощным инструментом системного мультипараметрического анализа клеточных популяций и продуктивно используется в клеточной биологии, иммунологии и медицинской диагностике. Цитофлуориметры позволяют исследовать тысячи клеток в секунду и дают достоверную информацию о морфологии клеток, их поверхностных антигенах, активности внутриклеточных ферментов, содержании ДНК и т. д. Большой выбор предлагаемых моноклональных антител, меченных различными флуорохромами, позволяет подобрать такое их сочетание, чтобы в одном исследовании получить максимальную информацию сразу о нескольких поверхностных антигенах, что дает возможность в одной пробе определить субпопуляционный состав исследуемого образца и судить о наличии или отсутствии различных патологий.

В настоящее время для локализации и характеристики NK-клеток наиболее широко используют двухпараметрический анализ экспрессии CD16 и/или CD56 на CD3-негативных клетках (рис. 1). Данная комбинация моноклональных антител позволяет локализовать общую популяцию NK-клеток и количественно ее охарактеризовать, однако двухпараметрический анализ не охватывает субпопуляции естественных киллеров и их подтипы.

Достаточно часто NK-клетки экспрессируют на своей поверхности  $\alpha$ -цепь CD8 (рис. 2), но в более низкой плотности, чем цитотоксические Т-клетки. Было показано, что субпопуляции NK-клеток человека, экспрессирующие  $\alpha\alpha$ -гомодимер CD8 обладают большей цитотоксичностью, чем CD8<sup>+</sup> NK-клетки.

В последние годы исследователи уделяют большое внимание экспрессии CD38 на поверхности NK-клеток. Молекула CD38 – это мембранный гликопротеин, представляющий собой фермент, регулирующий концентрацию цитоплазматического кальция, также обладает АДФ-циклазой и НАД-гидролазой активностью. Данная молекула также играет роль рецептора, модулируя межклеточные взаимодействия, и является переносчиком трансмембранных сигналов. Молекула CD38 экспрессируется на активированных Т-, В-, NK-клетках и некоторых других типах клеток. В ряде работ приведены данные о том, что обработка CD38<sup>+</sup> NK-клеток антителами против CD38 приводит к активации их литической способности. Однако это происходило только в тех случаях, когда было возможно взаимодействие CD38 со специализированными сигнальными молекулами. В случае NK-клеток роль такой молекулы играет CD16.

Таким образом, для наиболее полной характеристики NK-клеток необходимо определить на CD3-негативных клетках

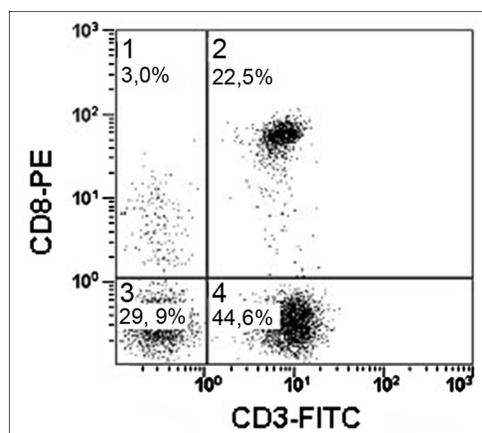


Рис. 2. Гистограмма распределения лимфоцитов периферической крови с использованием моноклональных антител CD3-FITC и CD8-PE. На гистограмме отображены только CD45<sup>+</sup>-лимфоциты. В зоне 1 находятся CD8<sup>+</sup> NK-клетки.

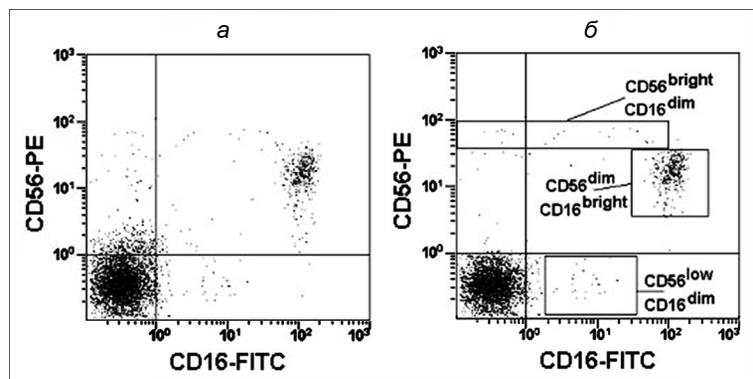


Рис. 3. Гистограммы распределения лимфоцитов периферической крови с использованием моноклональных антител CD16-FITC и CD56-PE. *a* – отображены все CD45<sup>+</sup>-лимфоциты; *б* – отображены только CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-лимфоциты.

следующие поверхностные маркеры: CD16, CD56, CD38 и CD8. Следует отметить, что CD38 и CD8 позволяют оценить цитотоксическую активность НК-клеток пациента и, как следствие этого, более корректно представлять картину, происходящую на данном этапе развития иммунного ответа. Для этих целей рекомендуют использовать следующие комбинации антител: CD3/CD16/CD56/CD45 и CD3/CD8/CD38/CD45 [10].

Применение двухцветного окрашивания лимфоцитов с использованием комбинации антител CD3, CD56 и CD16 позволяет локализовать НК-клетки и оценить их абсолютное и относительное количество (см. рис. 1). Однако в этом случае отсутствует возможность определить подтипы НК-клеток.

Другим вариантом окрашивания лимфоцитов для выявления НК-клеток является использование комбинации антител CD16 и CD56. На рис. 3, *a* представлена двухпараметрическая гистограмма распределения лимфоцитов периферической крови с использованием моноклональных антител против CD16 и CD56, меченных FITC и PE. Но в этом случае результат получается несколько завышенным, поскольку дополнительный вклад вносят Т-клетки, так как они могут экспрессировать на своей поверхности молекулы CD56 и CD16. Это особенно ярко проявляется при наличии различных патологий, когда резко возрастает количество Т-клеток, экспрессирующих данные

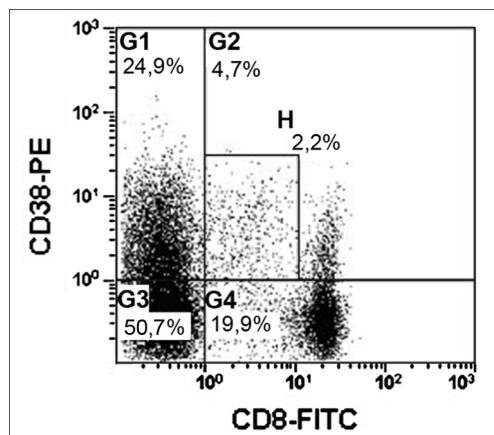


Рис. 4. Гистограмма распределения лимфоцитов периферической крови с использованием моноклональных антител CD8-FITC и CD38-PE. На гистограмме отображены только CD45<sup>+</sup>-лимфоциты.

Область H содержит CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> НК-клетки.

структуры. Данную задачу позволяет решить применение многоцветного анализа и следующей комбинации моноклональных антител CD3/CD16/CD56/CD45. В данном анализе антитела к CD3 позволяют исключить из анализа Т-клетки (рис. 3, *б*).

Для локализации CD38<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> НК-клеток возможно использовать двухпараметрический анализ (рис. 4), но более корректно применять трех- и четырехцветный анализ (CD3/CD8/CD38 и CD3/CD8/CD38/CD45) [10].

Ранее сообщалось, что CD38<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> НК-клетки обладают высокой цитолитической активностью. Таким образом, знание о наличии данной субпопуляции, ее относительном и абсолютном количестве имеет важное диагностическое значение. В случае использования комбинации CD3/CD8/CD38 для выделения лимфоцитов используют морфологические параметры, но в результате этого существует вероятность исключить из анализа часть больших гранулярных лимфоцитов, которые могут не попасть в выделенную зону при гейтировании. Использование антител к CD45 для локализации всей популяции лимфоцитов является более

корректным.

Комбинация моноклональных антител CD3/CD8/CD38/CD45 и многоэтапное позитивное и негативное гейтирование позволяет четко выделить активированные НК-клетки. На рис. 5, *a* представлена двухпараметрическая гистограмма распределения лимфоцитов периферической крови с использованием моноклональных антител против CD3.

Дальнейший анализ проводят на отдельных гистограммах с использованием логических ограничений в зонах позитивных и негативных по CD3. На гистограмме, полученной с использованием гейтирования по CD3<sup>+</sup>, в зоне второго квадранта

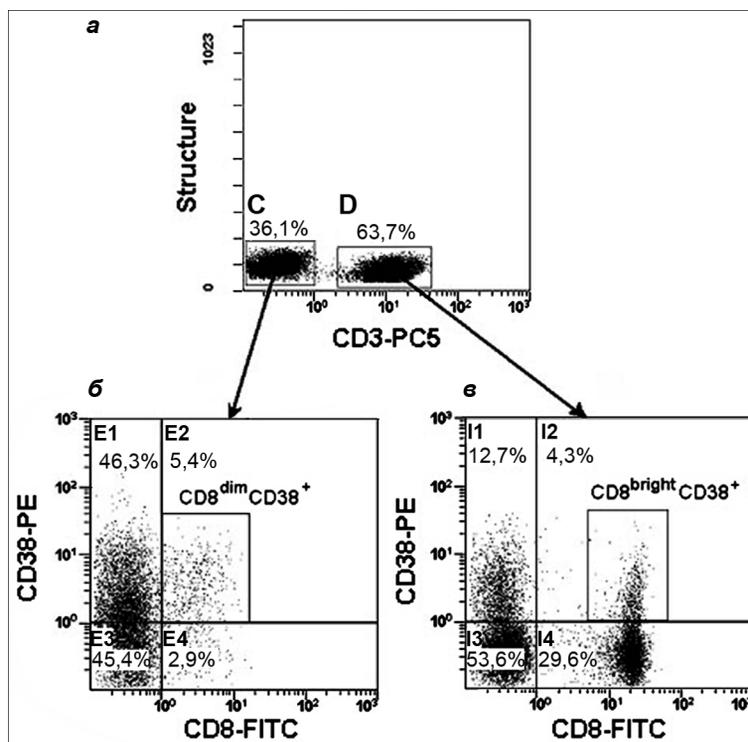


Рис. 5. Многоцветный анализ и последовательное гейтирование для локализации активированных НК-клеток.

*a* – гистограмма распределения лимфоцитов периферической крови с использованием CD3 и светорассеяния под углом 90°. Область D содержит Т-клетки, а область С – CD3<sup>+</sup>-лимфоциты; *б* – гистограмма распределения CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов периферической крови с использованием CD8 и CD38. CD8<sup>dim</sup>CD38<sup>+</sup> активированные НК-клетки; *в* – гистограмма распределения CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов периферической крови с использованием CD8 и CD38. CD8<sup>bright</sup>CD38<sup>+</sup> активированные цитотоксические Т-клетки.

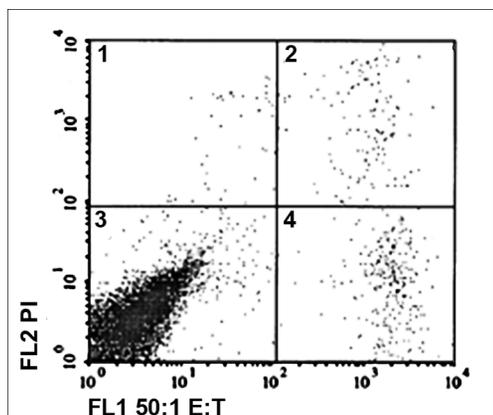


Рис. 6. Двухпараметрический dot plot (FL1 [флуоресценция FITC] и FL2 [флуоресценция PI]) флуоресценции клеточных эффекторов (МНК) и клеток-мишеней, меченных DiO.

Квадрант 1 – мертвые клетки-эффекторы, квадрант 2 – мертвые клетки-мишени, квадрант 3 – живые клетки-эффекторы и живые клетки-мишени, квадрант 4 – живые клетки-мишени.

находятся активированные цитотоксические Т-клетки с фенотипом CD8<sup>bright</sup>CD38<sup>+</sup> (рис. 5, в). Гейтирование по зоне CD3 негативных клеток позволяет выявить активированные НК-клетки с фенотипом CD8<sup>dim</sup>CD38<sup>+</sup> (рис. 5, б). Данное утверждение правомерно, поскольку CD8 экспрессируется не только на Т-клетках, но и на части популяции CD3-негативных клеток, а именно на НК-клетках.

Таким образом, используя данную комбинацию антител возможно в одном образце определить активированные цитотоксические Т-клетки и активированные НК-клетки.

В связи с получением большого количества фактического материала и развитием различных направлений современной иммунологии становится очевидной необходимость при типировании НК-клеток выявлять как общее количество, так и содержание отдельных их субпопуляций, а также определять их функциональную активность.

*Определение цитотоксической активности НК-клеток с помощью проточного цитофлуориметра.* В последнее

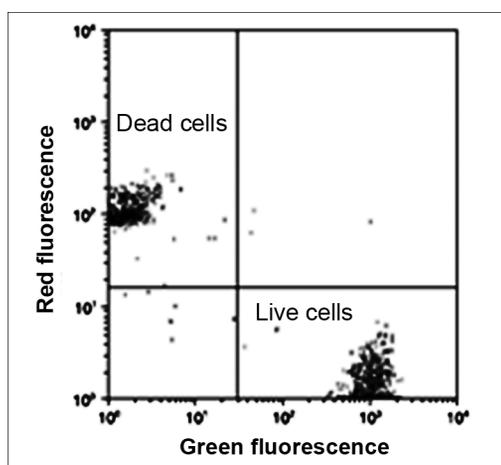


Рис. 7. Цитофлуориметрический анализ (488 нм) живых и мертвых клеток с использованием кита «Live/Dead». Смесь живых и фиксированных спиртом В-клеток (1:1) окрашенных кальцеином-АМ и Eth-1. Двухпараметрическая гистограмма показывает четкое разделение живых клеток с зеленой флуоресценцией (530 нм) от мертвых клеток с красной флуоресценцией (585 нм).

время были определены новые методологические подходы для определения функциональной активности НК-клеток, включая методы двойной люминесценции живых и мертвых клеток [11] или анализ литических гранул мембранного протеина CD107a с помощью проточного цитометра [12].

S. Zimmermann и соавт. [13] классифицировали цитотоксические тесты, описанные в литературе, на следующие категории: 1) выявление умерших клеток-мишеней по высвобождению субстрата или с помощью визуализации клеток; 2) обнаружение выживших клеток-мишеней, поглотивших/удержавших вещества или с помощью визуализации клеток; 3) определение эффекторной активности клеток по высвобождению веществ или с помощью визуализации клеток.

Одним из распространенных методов определения активности НК-клеток является клеточно-опосредованная цитотоксичность с использованием флуоресцентных красителей диоктадецилоксакарбоцианин перхлората (DiO<sub>18</sub>) и пропидиум йодида (PI). Данный метод был описан в начале 90-х годов [14, 15]. Он основан на встраивании зеленого липофильного флуоресцентного красителя DiO<sub>18</sub> (Molecular Probes, США) в мембрану клеток-мишеней, растущих в культуре. Этот краситель позволяет быстро выделять субпопуляцию клеток-мишеней от клеточной суспензии клеток-эффекторов с помощью проточного цитофлуориметра. Второй красный краситель – пропидиум йодид (PI) проникает внутрь клетки только через поврежденные мембраны и связывается с ядерной ДНК, таким образом указывая на мертвые клетки [16]. Анализ двойной флуоресценции позволяет определить процент клеток-мишеней поврежденных НК-клетками и вычислить их цитотоксическую активность.

На рис. 6 представлены результаты фенотипирования клеточной смеси клеток-эффекторов и клеток-мишеней (в соотношении 50:1) как dot plot FL1 (флуоресценция FITC) против FL2 (флуоресценция PI) для идентификации клеток меченых DiO (живые) и PI (мертвые). Процент лизиса можно определить по формуле:

$$\text{Лизис} = \left[ \frac{\text{количество событий в квадранте 2}}{\text{сумма событий в квадрантах 2 и 4}} \right] \times 100.$$

Цитолитическую активность НК-клеток можно оценить с использованием флуоресцентных красителей кальцеина-АМ (САМ) и этидиума гомодимера-1 (Eth-1) цитофлуориметрически, используя специальный кит, содержащий два вида красителей для живых и мертвых клеток-мишеней (L-3224) «Live/Dead» (Molecular Probes, США) (рис. 7). Кальцеин АМ (САМ) окрашивает живые клетки, этидиум гомодимер-1 (Eth-1), проникая в ядро, окрашивает мертвые клетки [18]. После постановки цитотоксического теста и инкубации клеток-эффекторов с мишенями проводят цитофлуориметрический анализ. Живые клетки-мишени флуоресцируют в зеленой области спектра, мертвые эффекторы – в красной области спектра. Литическую активность НК-клеток против клеток-мишеней обычно оценивают в различных соотношениях. Данный тест является хорошо воспроизводимым при наличии клеток-мишеней с жизнеспособностью более 95%.

Оценить апоптоз в клетках-мишенях, который индуцируют НК-клетки через запуск внутриклеточных каспаз можно цитофлуориметрически по активации каспазы-6 в клетках-мишенях с использованием набора CyToxiLux (OncoImmunin, США) [19] (рис. 8). Анализ активности каспазы-6 проводят с помощью проточного цитометра при длине волны 488 нм, при этом оценивают долю клеток-мишеней с активированной каспазой-6 среди TFL-2-позитивных клеток. Флуоресценцию субстрата для каспазы-6 измеряют через канал FL1 (фильтр 530/30 нм), а окрашенные TFL2 клетки-мишени – через канал FL2 (фильтр 575/26 нм) [20, 21]. Данный метод наиболее точно характеризует цитотоксическую активность НК-клеток.

Еще одним методом оценки функциональной активности НК-клеток является обнаружение поверхностного маркера дегрануляции – CD107. В НК-клетках здоровых доноров

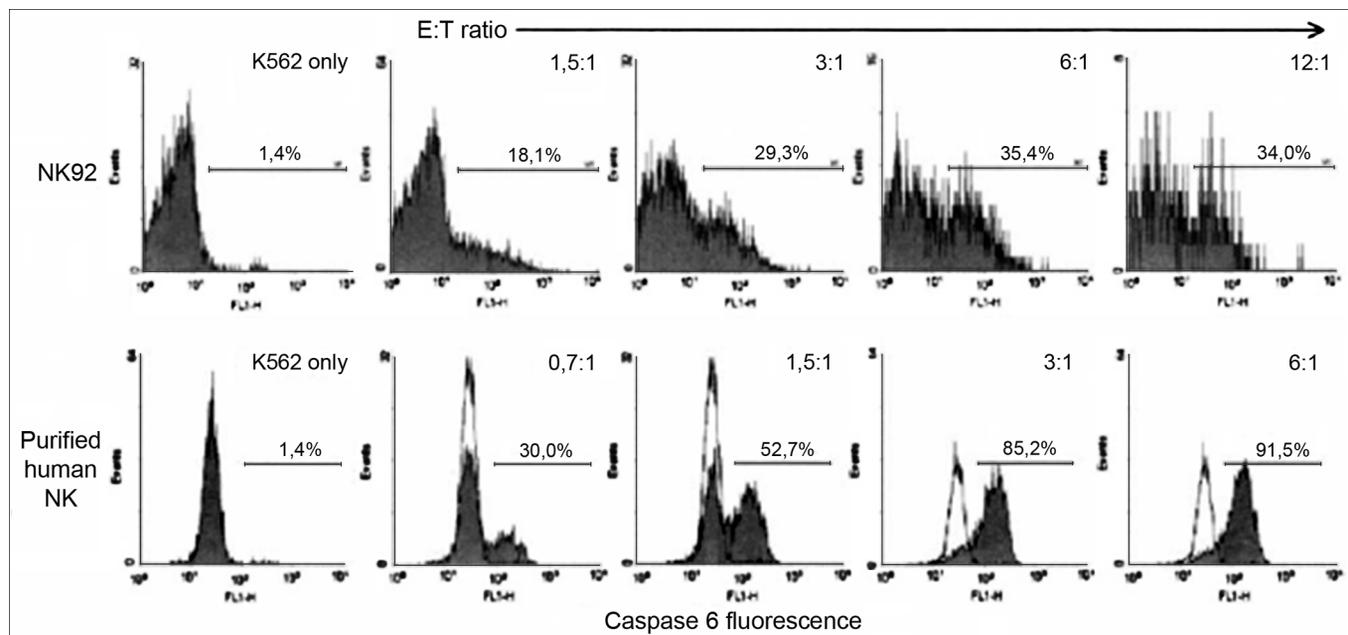


Рис. 8. Анализ активации каспазы-6 у клеток-мишеней K562 после инкубации с клетками линии NK-92 (вверху) и очищенной популяцией NK-клеток (внизу). На гистограммах слева контрольные клетки-мишени, правее увеличение соотношения эффектор:мишень от 0.7:1 к 6:1. На каждой гистограмме показано соотношение эффекторов и мишеней и процент лизированных клеток-мишеней.

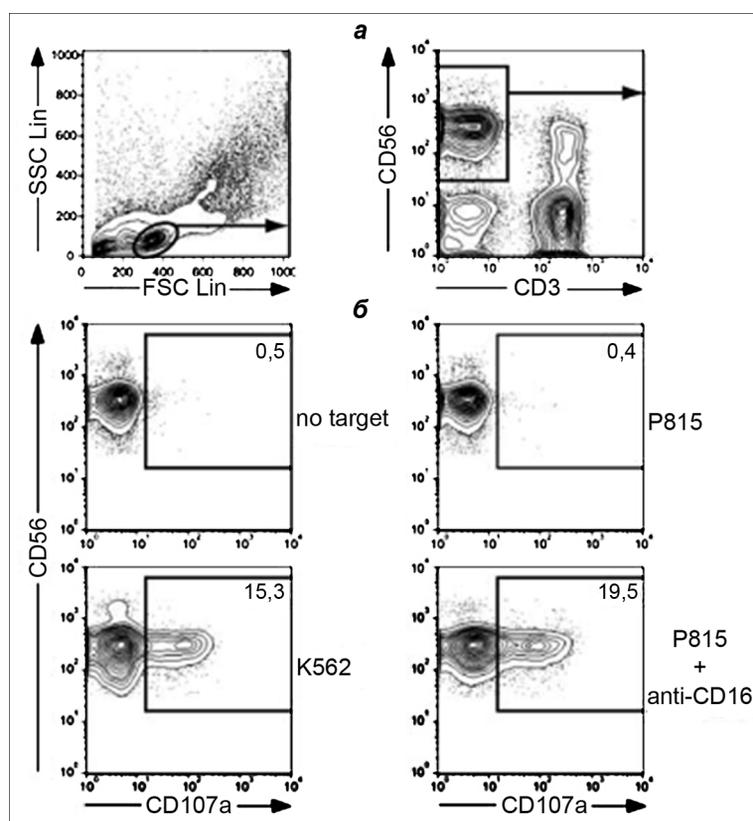


Рис. 9. Цитофлуориметрический анализ дегрануляции NK-клеток человека. МНК были инкубированы с клетками-мишенями 2 ч при 37°C, после чего окрашены антителами CD3-PerCP, CD56-PE и CD107a-FITC.

*a* – для идентификации CD3–CD56<sup>+</sup> NK-клеток показано боковое светорассеяние (SSC) против прямого (FSC) и CD56 против CD3 с использованием программы FlowJo; *б* – экспрессия молекул CD56 против CD107a на CD3–CD56<sup>+</sup> NK-клетках донора после инкубации МНК с клетками-мишенями K562 и P815.

молекула CD107a колокализована с перфорином, поэтому по ее обнаружению на клеточной поверхности можно судить о процессе лизиса клеток-мишеней [23, 24]. Экспрессия молекул CD107a соотносится с внутриклеточным содержанием перфорины и гранзимов, в то время как экспрессия молекулы CD63 не свидетельствует об этом [24]. Оценить дегрануляцию NK-клеток можно путем постановки 2 часового цитотоксического теста с использованием стандартных клеток-мишеней и МНК [24, 25] (рис. 9). Изменения экспрессии CD107 могут также наблюдаться при различных патологических состояниях [26]. Этот метод является наиболее дешевым и простым в исполнении.

В заключение хочется отметить, что NK-клетки играют важную роль как во врожденном, так и в адаптивном иммунном ответе, а также их количество и функция могут меняться при различных патологических состояниях. Хорошо известно, во-первых, ведущее значение NK-клеток и их цитотоксической функции при опухолевых и вирусных процессах [27]. Во-вторых, наличие регуляторной функции у отдельных субпопуляций NK-клеток ставит вопрос об их клиническом и патогенетическом значении. В-третьих, данные о наличии активирующих рецепторов NK-клеток позволяют по-новому оценить их функциональную активность, не ставя трудоемких и дорогостоящих экспериментов по киллингу клеток-мишеней. В-четвертых, появилась возможность оценить степень воздействия лекарственной терапии на NK-клетки как в норме, так и при патологии. Это позволяет значительно расширить возможности клинической фармакологии по поиску средств, напрямую влияющих на данную группу клеток (химиотерапия опухолей, антивирусная терапия, иммунотерапия и др.). И, в-пятых, изучение субпопуляций NK-клеток и их функциональной активности может повлиять на наши представления о природе патологических процессов [28]. Это весьма важно, как для известных патологий, где значение NK-клеток уже опреде-

лено, так и для других процессов, при которых значимость врожденных и приобретенных механизмов иммунитета недостаточно изучена. Как следствие этого, новые данные могут способствовать более корректной иммунотерапии различных патологических состояний с учетом ее влияния на данные клетки.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Trincheri G. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 1989; 47: 187–376.
- Абакушина Е.В., Кузьмина Е.Г., Коваленко Е.И. Основные свойства и функции НК-клеток человека. *Иммунология.* 2012; 33 (4): 210–6.
- Whiteside T.L., Herberman R.B. Role of human natural killer cells in health and disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1994; 1 (2): 125–33.
- Walzer T., Dalod M., Robbins S.H., Zitvogel L., Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: “l’union fait la force”. *Blood.* 2005; 106 (7): 2252–8.
- Vivier E., Nunes J.A., Vely F. Natural killer cell signaling pathways. *Science.* 2004; 306: 1517–9.
- Vivier E., Tomasello E., Paul P. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr. Opin. Immunol.* 2002; 14: 306–11.
- Henkart P.A. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Ann. Rev. Immunol.* 1985; 3: 31–58.
- Podack E.R. The molecular mechanism of lymphocyte-mediated tumor cell lysis. *Immunol. Today.* 1985; 6: 21–7.
- Kane K.L., Ashton F.A., Schmitz J.L., Folds J.D. Determination of natural killer cell functions by flow cytometry. *Clin. Diagnost. Lab. Imm.* 1996; 3 (3): 295–300.
- Хайдуков С.В. Многоцветный анализ в проточной цитометрии для медико-биологических исследований: Дис. ... докт. биол. наук. С-Пб., 2008.
- Ogbomo H., Hahn A., Geiler J., Michaelis M., Doerr H.W., Cinatl Jr.J. NK sensitivity of neuroblastoma cells determined by a highly sensitive coupled luminescent method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 339 (1): 375–9.
- Penack O., Gentilini C., Fischer L., Asemissen A.M., Scheibenbogen C., Thiel E. et al. CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. *Leukemia.* 2005; 19 (5): 835–40.
- Zimmermann S.Y., Esser R., Rohrbach E., Klingebiel T., Koehl U. A novel four-colour flowcytometric assay to determine natural killer cell or T-cell-mediated cellular cytotoxicity against leukaemia cells in peripheral or bonemarrow specimens containing greater than 20% of normal cells. *J. Immunol. Methods.* 2005; 296 (1–2): 63–76.
- Chang, L., Gusewitch G.A., Chritton D.B.W., Folz J.C., Lebeck L.K., Nehlsen-Cannarella S.L. Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods.* 1993; 166: 45–54.
- Hatam L., Schuval S., Bonagura V.R. Flow cytometric analysis of natural killer cell function as a clinical assay. *Cytometry.* 1994; 16: 59–68.
- Riley R.S., Mahin E.J., Ross W., ed. *Clinical applications of flow cytometry.* New York: Igaku-Shoin; 1993.
- Абакушина Е.В. Влияние углеводов, представленных на поверхности клеток-мишеней, на цитолитическую активность естественных киллеров человека: Дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2002.
- Paradopoulos N.G., Dedoussis G.V.Z., Spanakos G., Gritzapis A.D., Vaxevanis C.N., Paramichail M. An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* 1994; 177: 101–11.
- Саидов М.З., Ковальчук Л.В. Использование принципа серийных клеточных разведений для диагностики нарушения активности естественных киллеров человека. *Иммунология.* 1986; 4: 76–8.
- Packard B.Z., Telford W.G., Komoriya A., Henkart P.A. Granzyme B activity in target cells detects attack by cytotoxic lymphocytes. *J. Immunol.* 2007; 179: 3812–20.
- Kovalenko E.I., Abakushina E.V., Telford W., Kapoor V., Korchagina E.Yu., Khaidukov S.V. et al. Clustered carbohydrates as a target for natural killer cells: A model system. *Histochem Cell Biol.* 2007; 127 (3): 313–26.
- Абакушина Е.В., Климова А.В., Каневский Л.М., Коваленко Е.И. Увеличение растворимых форм стресс-индуцированных молекул МІСА при онкологических заболеваниях. *Молекулярная медицина.* 2014; 3: 34–8.
- Alter G., Malenfant J.M., Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods.* 2004; 294: 15–22.
- Bryceson Y. T., March M. E., Barber D. F., Ljunggren H. G., Long E. O. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J. Exp. Med.* 2005; 202: 1001–12.
- Gonzalez V.D., Björkström N.K., Malmberg K.J., Moll M., Kuylenstierna C., Michaëlsson J. et al. Application of nine-color flow cytometry for detailed studies of the phenotypic complexity and functional heterogeneity of human lymphocyte subsets. *J. Immunol. Methods.* 2008; 330: 64–74.
- Marcanaro S., Gallo F., Martini S., Santoro A., Griffiths G. M., Arico M. et al. Analysis of natural killer-cell function in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL): defective CD107a surface expression heralds Munc13-4 defect and discriminates between genetic subtypes of the disease. *Blood.* 2006; 108: 2316–23.
- Bonavida B. NK cell phenotypic and functional heterogeneities and molecular mechanisms of cytotoxicity. *Crit. Rev. Oncog.* 2014; 19(1–2): 21–45.
- Bryceson Y.T., Fauriat C., Nunes J.M., Wood S.M., Björkström N.K., Long E.O. et al. Functional analysis of human NK cells by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* 2010; 612: 335–52.

Поступила 05.02.15

#### REFERENCES

- Trincheri G. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 1989; 47: 187–376.
- Abakushina E.V., Kuz'mina E.G., Kovalenko E.I. The main characteristics of human natural killer cells. *Immunologiya.* 2012; 33 (4): 210–6. (in Russian)
- Whiteside T.L., Herberman R.B. Role of human natural killer cells in health and disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1994; 1 (2): 125–33.
- Walzer T., Dalod M., Robbins S.H., Zitvogel L., Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: “l’union fait la force”. *Blood.* 2005; 106 (7): 2252–8.
- Vivier E., Nunes J.A., Vely F. Natural killer cell signaling pathways. *Science.* 2004; 306: 1517–9.
- Vivier E., Tomasello E., Paul P. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr. Opin. Immunol.* 2002; 14: 306–11.
- Henkart P.A. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Ann. Rev. Immunol.* 1985; 3: 31–58.
- Podack E.R. The molecular mechanism of lymphocyte-mediated tumor cell lysis. *Immunol. Today.* 1985; 6: 21–7.
- Kane K.L., Ashton F.A., Schmitz J.L., Folds J.D. Determination of natural killer cell functions by flow cytometry. *Clin. Diagnost. Lab. Imm.* 1996; 3 (3): 295–300.
- Khaidukov S.V. *Multicolor flow cytometry analysis for biomedical research.* Diss. Sankt-Petersburg; 2008. (in Russian)
- Ogbomo H., Hahn A., Geiler J., Michaelis M., Doerr H.W., Cinatl Jr.J. NK sensitivity of neuroblastoma cells determined by a highly sensitive coupled luminescent method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 339 (1): 375–9.
- Penack O., Gentilini C., Fischer L., Asemissen A.M., Scheibenbogen C., Thiel E. et al. CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. *Leukemia.* 2005; 19 (5): 835–40.
- Zimmermann S.Y., Esser R., Rohrbach E., Klingebiel T., Koehl U. A novel four-colour flowcytometric assay to determine natural killer cell or T-cell-mediated cellular cytotoxicity against leukaemia cells in peripheral or bonemarrow specimens containing greater than 20% of normal cells. *J. Immunol. Methods.* 2005; 296 (1–2): 63–76.
- Chang, L., Gusewitch G.A., Chritton D.B.W., Folz J.C., Lebeck L.K., Nehlsen-Cannarella S.L. Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods.* 1993; 166: 45–54.
- Hatam L., Schuval S., Bonagura V.R. Flow cytometric analysis of natural killer cell function as a clinical assay. *Cytometry.* 1994; 16: 59–68.

16. Riley R.S., Mahin E.J., Ross W., ed. Clinical applications of flow cytometry. New York: Igaku-Shoin; 1993.
17. Abakushina E.V. *Effect of carbohydrates presented on the target cells surface on cytolytic activity of human natural killer cells*. Diss. Moscow; 2002. (in Russian)
18. Paradopoulos N.G., Dedoussis G.V.Z., Spanakos G., Gritzapis A.D., Baxevanis C.N., Paramichail M. An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry. *J. Immunol. Methods*. 1994; 177: 101–11.
19. Saidov M.Z., Koval'chuk L.V. Using the principle of serial cell dilutions for the diagnosis of the activity of human natural killer cells. *Immunologiya*. 1986; 4: 76–8. (in Russian)
20. Packard B.Z., Telford W.G., Komoriya A., Henkart P.A. Granzyme B activity in target cells detects attack by cytotoxic lymphocytes. *J. Immunol*. 2007; 179: 3812–20.
21. Kovalenko E.I., Abakushina E.V., Telford W., Kapoor V., Korchagina E.Yu., Khaidukov S.V. et al. Clustered carbohydrates as a target for natural killer cells: A model system. *Histochem. Cell Biol*. 2007; 127 (3): 313–26.
22. Abakushina E.V., Klinkova A.V., Kanevskiy L.M., Kovalenko E.I. Elevation of serum levels of soluble forms of stress-induced molecules MICA in oncological diseases. *Molekulyarnaya meditsina*. 2014; 3: 34–8. (in Russian)
23. Alter G., Malenfant J.M., Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods*. 2004; 294: 15–22.
24. Bryceson Y. T., March M. E., Barber D. F., Ljunggren H. G., Long E. O. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J. Exp. Med*. 2005; 202: 1001–12.
25. Gonzalez V.D., Björkström N.K., Malmberg K.J., Moll M., Kuylenstierna C., Micha'elsson J. et al. Application of nine-color flow cytometry for detailed studies of the phenotypic complexity and functional heterogeneity of human lymphocyte subsets. *J. Immunol. Methods*. 2008; 330: 64–74.
26. Marcenaro S., Gallo F., Martini S., Santoro A., Griffiths G. M., Arico M., et al. Analysis of natural killer-cell function in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL): defective CD107a surface expression heralds Munc13-4 defect and discriminates between genetic subtypes of the disease. *Blood*. 2006; 108: 2316–23.
27. Bonavida B. NK cell phenotypic and functional heterogeneities and molecular mechanisms of cytotoxicity. *Crit. Rev. Oncog*. 2014; 19(1–2): 21–45.
28. Bryceson Y.T., Fauriat C., Nunes J.M., Wood S.M., Björkström N.K., Long E.O. et al. Functional analysis of human NK cells by flow cytometry. *Methods Mol. Biol*. 2010; 612: 335–52.

Received 05.02.15

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.921.5+616.2-022.6]-078.33

Петрова Е.Р., Суховецкая В.Ф., Писарева М.М., Майорова В.Г., Сверлова М.В., Даниленко Д.М., Петрова П.А., Кривицкая В.З., Сомнина А.А.

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ БЫСТРЫХ ТЕСТОВ В ДИАГНОСТИКЕ ГРИППА А И РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ

ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург

Проведен анализ диагностических параметров коммерческих быстрых тестов (иммунохроматографических тестов (ИХТ) *VinaxNOW Influenza A&B* и *VinaxNOW RSV* (Alere, Scarborough Inc., США) и системы *tarIPOC* (ArcDia Int. Ltd., Финляндия)) при выявлении антигенов вируса гриппа А и респираторно-синцициального вируса (РСВ) в клинических материалах. Методами сравнения служили полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени и выделение вирусов в культурах клеток. Исследование назофарингеальных мазков, полученных от 116 детей, показало, что чувствительность и специфичность детекции вируса гриппа А с помощью прибора *tarIPOC* при сравнении с ПЦР составили 93,8 и 99,0% соответственно при общем совпадении результатов двух методов 98,3%. При диагностировании РСВ-инфекции на приборе *tarIPOC* эти параметры составили по сравнению с ПЦР 77,3; 98,9 и 86,2%. Чувствительность, специфичность и общее совпадение результатов ИХТ *VinaxNOW* составили по сравнению с ПЦР 86,7; 100 и 96,2% соответственно при выявлении вируса гриппа А и 80,9; 97,4 и 91,6% соответственно при детекции РСВ. При сравнении с методом изоляции в культурах клеток чувствительность системы *tarIPOC* и ИХТ оказалась в 1,3–1,4 раза выше при детекции вируса гриппа А и в 1,7–2 раза при выделении РСВ. Статистически значимых различий между диагностическими параметрами, полученными для *tarIPOC* и ИХТ при диагностировании гриппа А и РСВ-инфекции, не выявлено. Исследованные диагностические системы *tarIPOC* и ИХТ могут успешно применяться для быстрой диагностики гриппа А и РСВ-инфекции в клинической практике.

**Ключевые слова:** быстрые диагностические тесты «у постели больного»; иммунохроматографические тесты; *tarIPOC*; полимеразная цепная реакция; грипп А; респираторно-синцициальная вирусная инфекция; назофарингеальные мазки.

**Для цитирования:** Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60(11): 44–49.

Для корреспонденции: Петрова Екатерина Романовна, degidrataza@gmail.com

For correspondence: Petrova E.R., degidrataza@gmail.com