

РАСШИРЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ КЛИНИКО- ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

Хайдуков С.В.¹, Зурочка А.В.²

¹ Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, лаборатория иммунохимии, Москва

² ГОУ ВПО Челябинская государственная медицинская академия Росздрава, г. Челябинск

Резюме. Целью данной статьи было ознакомить широкий круг специалистов с новыми разработками метода проточной цитометрии, нашедшими применение в медико-биологической практике для возможности последующего внедрения их в практическую работу. К ним можно отнести следующее: определение антиген-специфических клеток с использованием технологии тетрамеров, цитометрическое определение цитокинов в биологических жидкостях, определение чувствительности базофилов *in vitro* в ответ на действие аллергенов, определение по мембранным маркерам хелперов первого типа и Т-регуляторных клеток. Используя многопараметрический анализ, многоэтапное «гейтирование» и новые технологии, проточная цитометрия позволяет локализовать и отследить большинство процессов в результате развития иммунного ответа. Изучив его протекание, мы получаем возможность адекватно реагировать на все изменения, разрабатывать новые подходы к коррекции активности патологически измененных клеток и процессов, которые они определяют.

Ключевые слова: проточная цитометрия, тетрамеры, базофилы, цитокины, мультиплексный анализ.

Khaidukov S.V., Zurochka A.V.

EXPANSION OF OPPORTUNITIES OF THE FLOW CYTOMETRY METHOD FOR CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL PRACTICE

Abstract. The purpose of this article was to make a broad audience of experts familiar to new developments in the method of flow cytometry that have found applications in medical and biologic studies, in order of their further implementation into everyday practice. These applications include the following approaches: detection of antigen-specific T-cells by using of tetramer technology, flow cytometric determination of cytokines in biological liquids, determination of *in vitro* sensitivity of basophilic granulocytes to allergen effects, detection of Th1 and T-reg cells by their cell surface markers. When using multi-parametric analysis, a multi-step gating and other new technologies, the flow cytometry technique allows of location and tracing the majority of processes occurring in development of immune response. When studying these dynamic events, we get an opportunity to react adequately to appropriate changes, and to develop new approaches to correct altered cellular activities, that they should determinate. (*Med. Immunol.*, 2008, vol. 10, N 1, pp 5-12)

Проточная цитометрия как многопрофильная технология быстрого анализа все шире и шире входит в медико-биологическую практику. В свою

очередь, методологическая база проточной цитометрии продолжает интенсивно развиваться, и ее применение уже не ограничивается только определением мембранных маркеров, мониторингом иммунного статуса [10, 19, 36], диагностикой лейкозов и лимфопролиферативных заболеваний [1, 3, 28]. В последнее время появился целый ряд новых приложений данной технологии, которые, используя многоцветный анализ, получили широкое распространение и активно входят в практику медико-биологических исследований.

Адрес для переписки:

Хайдуков Сергей Валерьевич

Институт биоорганической химии

им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

Тел.: (495) 336-02-55.

E-mail: khsv@mail.ibch.ru.

К ним можно отнести следующее: определение антиген-специфических клеток с использованием технологии тетрамеров [31], цитометрическое определение цитокинов внутри клеток [12] и в биологических жидкостях [9], определение чувствительности базофилов *in vitro* в ответ на действие аллергенов [7] и многое другое.

Многopараметрический, многоцветный анализ позволяет не только определить наличие тех или иных маркеров популяции клеток в исследуемом образце, но и локализовать и полностью охарактеризовать отдельные субпопуляции. Это стало возможно за счет «гейтирования» (от английского «gate» – ворота), то есть за счет введения логических ограничений в протокол исследования. Под термином «гейтирование» мы понимаем зону анализа популяции клеток с заданными характеристиками. «Гейтирование» может быть многоступенчатым. Примером этого может служить анализ распределения CD38, CD62L, CD95 и HLA-DR маркеров на CD4⁺T-лимфоцитах, экспрессирующих рецепторы CD25 в разной плотности [4].

Целью данной статьи было ознакомить широкий круг специалистов с новыми разработками для возможности последующего внедрения их в практическую работу.

Технология тетрамеров. Антиген-специфические CD8⁺T-клетки играют существенную роль в устранении вирусных инфекций и клеток опухолей [15, 23]. Поэтому появление методов их детекции, с учетом наиболее полной характеристики этих клеток, позволяют наиболее точно расшифровать механизмы адаптивного (специфического) клеточного иммунного ответа [23]. Возможность локализовать и охарактеризовать антиген-специфические CD8⁺T-клетки стала возможна только в последнее время благодаря использованию тетрамеров. В основе этой технологии лежит создание тетрамеров главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I, с помощью которых стала возможной визуализация антиген-специфических CD8⁺T-клеток [31].

Тетрамер МНС – это комплекс четырех молекул МНС, которые ассоциированы со специфическим пептидом и помечены флуоресцентным красителем. Аффинность взаимодействия молекул МНС с T-клеточным рецептором (TCR) невысока, поэтому необходима мультимеризация мономера в тетрамерную молекулу. Такой тетрамер значительно эффективнее взаимодействует с TCR на лимфоцитах и позволяет детектировать клетки, специфичные к данному комплексу пептида и молекул МНС. Для того, чтобы получить тетрамер, поступают следующим образом. Рекомбинантные мономерные молекулы МНС конъюгируют с биотином и ассоциируют

со специфическим пептидом. Данные комплексы объединяют в тетрамер за счет молекул стрептавидина, который имеет четыре активных центра. Так как стрептавидин до получения тетрамера мечен флуорохромом, то регистрируют именно его флуоресценцию.

Существенными недостатками использования технологии тетрамеров являются эпитопная специфичность и МНС-рестрикция. Для развития T-клеточного ответа требуется одновременное распознавание специфического пептида и молекулы МНС. Это означает, что T-клетка распознает антиген только в том случае, если он представлен МНС-молекулой соответствующего гаплотипа. Таким образом, необходимо знать МНС-фенотип пациента и выбирать тетрамеры, соответствующие его гаплотипу. С другой стороны, чтобы охватить всю интересующую популяцию индивидов, необходимо использовать панели разных тетрамеров в соответствии с частотой встречаемости разных аллелей МНС. Иными словами, если мы имеем дело с однородными национальными группами людей, то достаточно просто создать тетрамеры, специфичные практически для всей популяции. В свою очередь, если исследование проводится на многонациональной популяции, с большим количеством детей от смешанных браков, необходимо иметь широкую панель тетрамеров в соответствии с встречающимися в данной популяции аллелями МНС.

Применение технологии тетрамеров на лабораторных животных, в клинических исследованиях привело к значительному прогрессу в понимании основного механизма дифференцирования и формирования долгосрочной памяти CD8⁺T-клеток [23, 24, 46]. Такие исследования, несомненно, приведут к новой стратегии как минимум для иммунотерапии опухолей и окажут влияние на механизмы получения новых вакцин.

Не смотря на то, что технология МНС-тетрамеров широко использовалась в научных исследованиях для анализа фенотипа и функций CD8⁺T-клеток [31], в медицинской практике этому значительно препятствовали сложности получения тетрамеров [5] и дороговизна реагентов коммерческого происхождения. Однако позднее была разработана упрощенная процедура для подготовки тетрамеров [16] в случае исследования HCMV-специфических CD8⁺T-клеток [17, 47, 49].

Таким образом, на сегодняшний день созданы значительные предпосылки для внедрения технологии тетрамеров в широкую клиническую практику для количественной оценки антиген-специфических эффекторных цитотоксических клеток. Необходимость определения последних очень важна для назначения этиотропной тера-

пии (например, для прогноза и лечения HCMV-инфекции в трансплантологии, при патологии, связанной только с клеточными типами реакции иммунной системы и т.д.).

Мультиплексный анализ содержания цитокинов в биологических жидкостях и супернатантах клеточных культур методом проточной цитометрии. Мультиплексный анализ представляет собой метод, позволяющий в одном образце идентифицировать и количественно определить сразу несколько аналитов. Возможность проточной цитометрии различать индивидуальные микросферы на основе размера, интенсивности флуоресценции и/или длин волн флуоресценции позволяет проводить мультиплексные анализы. Использование микросфер, отличающихся по размерам, для мультиплексного анализа было описано для различных аналитов и в многочисленных публикациях [6, 25, 26]. Однако дискриминация микросфер по флуоресценции описана сравнительно недавно [14, 22].

В основе мультиплексного анализа лежит принцип, подобный ELISA. Микросферы с конъюгированными антителами к определенным цитокинам или каким-либо другим белкам добавляют к жидкости, содержащей исследуемые антигены. Происходит взаимодействие антиген-антитело. После этого добавляют вторые антитела, направленные против другого эпитопа данного антигена, связанные с биотином, и полученный комплекс проявляют конъюгатом стрептавидин-фикоэритрин или каким-либо другим флуорохромом.

Таким образом, если взять два типа микросфер, различающихся как по размерам (4,4 мкм и 5,5 мкм), так и по интенсивности флуоресценции (каждый тип флуоросфер имеет 5 вариантов интенсивности флуоресценции в определенной области спектра), их можно разнести на разные гистограммы, отображающие частицы одного размера. В свою очередь, если каждый тип флуоросфер (различающихся одновременно по размерам и флуоресценции) несет антитела к определенному объекту, появляется возможность определить в одном образце наличие сразу 10 цитокинов или каких-либо других растворимых факторов. Значения интенсивности флуоресценции сравнивают с калибровкой и в результате получают концентрацию исследуемых аналитов в растворе [9]. Существует возможность значительно увеличить количество исследуемых аналитов при использовании данного подхода. Например, если взять сразу нескольких типов микросфер с разными диаметрами, то можно в одном образце одновременно определять до 100 видов различных белков.

Данные, полученные путем определения концентрации цитокинов в сыворотке на основе

микросфер, вполне сопоставимы с результатами, полученными с использованием ELISA [35].

Мультиплексный анализ с успехом был применен и к другим объектам, таким как β_2 -микроглобулин [6], ростовые факторы [29], существуют наборы для определения Th1/Th2-клеток и кардиоваскулярная панель (Bender MedSystems GmbH, Австрия) и т.д.

Реагенты для мультиплексного анализа производят целый ряд фирм, такие как Bender MedSystems GmbH (Австрия), Becton Dickinson (США), LINCO Research, Inc. (США), Bio-Rad Laboratories, Inc. (США), R&D Systems, Inc. (США), BioSource International, Inc. (США) и др.

Все это уже сегодня позволяет широко применять этот методический подход и значительно удешевить аналитическое определение различных субстратов в исследуемом материале (кровь, сыворотка крови, выделения человека и животных, супернатанты клеточных культур и т.д.). Мультиплексный анализ увеличивает скорость и точность исследования, а в некоторых случаях и повышает чувствительность методов за счет того, что проточная цитометрия обладает огромной производительностью. Таким образом, использование данного подхода позволит значительно расширить возможности лабораторной аналитики, особенно при массовых многоплановых (многопараметровых) обследованиях.

Определение Th2-клеток по мембранным маркерам. До последнего времени наличие Th1 и Th2-клеток определяли исключительно по продукции внутриклеточных цитокинов [11, 33, 37, 38], поскольку не было известно мембранных маркеров, характерных для каждого из этих типов Т-клеток. Однако в последнее время в результате поиска молекул, различающих Th1 от Th2-клеток, были получены антитела, которые взаимодействовали с Т-клетками, причем исключительно с Th2 [34]. Данная молекула относится к семейству рецепторов хемоаттрактантов и получила название CRTH2 (Chemoattractant Receptor TH2). Фенотип $CD4^+$ клеток, экспрессирующих данный маркер, представляет собой следующее сочетание $CD45RA-CD45R0^+CD25^+$. Они продуцируют IL-4 (а также IL-5 и IL-13), но не IFN γ . Таким образом, это антиген-активированные эффекторные Th-клетки. В последствии CRTH2 была обнаружена и на других типах клеток периферической крови, таких как базофилы, эозинофилы, активированные моноциты и на небольшом количестве $CD8^+$ Т-клеток. Моноклональные антитела против CRTH2 были изучены и класифицированы, а на 8-м рабочем совещании HLDA-8 (Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Аделаида, Австралия) отнесены к CD294 [51].