

преобладания микроформ тромбоцитов в мазке периферической крови (размер тромбоцитов 1 мкр. — 1,5 мкр.). Для купирования геморрагического синдрома эффективны терапевтические средства, улучшающие тромбоцитарно-сосудистый гемостаз. В классификации наследственных тромбоцитопатий мы отнесли наследственную микро-тромбоцитарную тромбоцитопатию к смешанным или трудноклассифицируемым формам.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Тромбоцитопении: патогенез, дифференциальная диагностика и основы терапии / С. А. Васильев [и др.] // Тромбоз, Гемостаз и Реология, 2000. — № 4. — С. 5–15.

2. Пособие по изучению адгезивно-агрегационной функции тромбоцитов / А. Л. Берковский [и др.] / НПО Ренам. — М., 1999. — 29 с.

3. Васильев, С. А. Наследственные дефекты мембранных гликопротеинов тромбоцитов / С. А. Васильев, Л. В. Жердева, А. В. Мазуров // Гематология и трансфузиология. — 1994. — № 1. — С. 34–39.

4. Мазуров, А. В. Структура и функции мембранных гликопротеинов тромбоцитов / А. В. Мазуров, С. А. Васильев // Гематология и трансфузиология. — 1994. — № 1. — С. 29–34.

5. Васильев, С. А. Классификация, основы диагностики и терапии наследственных тромбоцитопатий / С. А. Васильев, А. В. Мазуров // Проблемы гематологии и переливания крови. — 1997. — № 3. — С. 29–38.

6. Наследственная микротромбоцитарная тромбоцитопатия / С. А. Васильев [и др.] // Атеротромбоз и артериальная гипертензия: VI Нац. конф., Москва, 21–23 мая 2001 г. — 2001. — С. 78–79 (прил. Тромбоз, гемостаз и реология).

УДК 616.155.32-07

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА CD107A ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЛИМФОЦИТОВ

Е. П. Вашкевич, Т. В. Шман

¹Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, г. Минск

Оценка противоопухолевой активности цитотоксических клеток является важным показателем их функционального статуса при проведении клеточной иммунотерапии. В последнее время для этих целей широко используется определение экспрессии маркера CD107a методом проточной цитофлуориметрии.

Проведенные нами исследования по определению противоопухолевой активности мононуклеарных клеток периферической крови (МНК), в т. ч. стимулированных интерлейкином-2, показали, что инкубация МНК в присутствии опухолевой линии К-562 способствовала достоверному повышению процента естественных киллерных (ЕК) и ЕК-подобных Т-клеток, экспрессирующих CD107a. Также была выявлена прямая корреляция между процентом CD107a+ ЕК-клеток в присутствии К-562 и количеством погибших мишеней в тесте с использованием окраски флуоресцентной метки CFSE.

Метод оценки экспрессии CD107a позволяет измерять цитотоксическую активность на уровне клетки в конкретной популяции эффекторных клеток и может использоваться наряду со стандартными методами определения лизиса клеток-мишеней.

Ключевые слова: мононуклеарные клетки, цитотоксичность, проточная цитофлуориметрия, естественные киллеры.

TESTING OF CD107A MARKER EXPRESSION FOR THE ASSESSMENT OF ANTITUMOR ACTIVITY OF CYTOTOXIC LYMPHOCYTES

E. P. Vashkevich, T. V. Shman

Republican Research Center for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk

The assessment of antitumor activity of cytotoxic lymphocytes is an important indicator of their functional status in cellular immunotherapy. Testing of CD107a marker expression by the method of flow cytofluorimetry has been widely lately used for these purposes.

The research that we carried out to determine the antitumor activity of mononuclear lymphocytes in peripheral blood including those stimulated by interleukine-2 showed that incubation of mononuclear lymphocytes in peripheral blood in the presence of K-562 tumor line was conducive to the reliable increase in rates of natural killer and killer-like cells expressing CD107a. A straight correlation between CD107a+killer cells percentage and the number of the dead targets in the test with the use of CFSE fluorescent label was detected.

The assessment method of CD107a expression makes it possible to measure the cytotoxic activity in a cell in a concrete population of effector cells and may be used alongside with standard methods for target-cell lysis.

Key words: mononuclear cells, cytotoxicity, flow cytofluorimetry, natural killers.

Введение

Определение цитотоксической активности (ЕК) и Т-клеток проводится при исследованиях иммунологического статуса пациентов с раз-

личными гематологическими и другими заболеваниями, для оценки качества клеточного продукта при проведении иммунотерапии цитотоксическими клетками, для оценки иммунного от-

вета пациентов в процессе противоопухолевой вакцинотерапии и др.

Наиболее распространенным цитотоксическим тестом является определение радиоактивных изотопов (^{51}Cr), высвободившихся из лизированных эффекторами клеток-мишеней [2, 7, 8]. В последнее время все чаще используют нерадиоактивные флуоресцентные красители (PKH-26, CFSE) для окрашивания мишеней с последующей оценкой их жизнеспособности с помощью проточной цитофлуориметрии [4, 5]. Использование этих методов позволяет оценить количество погибших мишеней, однако не дает информации о количестве и фенотипе активных клеток-эффекторов.

CD107a (LAMP-1 — lysosomal associated membrane glycoprotein) является белком мембраны литических гранул, содержащих гранзим и перфорин. При активации цитотоксических клеток происходит высвобождение содержимого таких гранул (дегрануляция) и в этот момент CD107a обнаруживается на поверхности клетки [1, 3].

Цель исследования

Определить противоопухолевую активность цитотоксических клеток по экспрессии CD107a и сравнить с результатами, полученными в стандартном цитотоксическом тесте.

Материалы и методы исследования

Функциональную активность цитотоксических клеток оценивали 2 способами. Первый — по количеству погибших клеток-мишеней, второй — экспрессии CD107a на клетках-эффекторах.

В качестве мишеней использовали клетки опухолевой линии K562, эффекторов — МНК, полученные от 14 здоровых доноров.

Для активации цитотоксических клеток выделенные на градиенте плотности МНК культивировали при 5 % CO_2 , 95 % влажности и 37 °C в полной среде IMDM в концентрации 1×10^6 /мл в присутствии интерлейкина ИЛ-2 (1000 МЕ/мл, препарат «Ронколейкин», «Биотех», Россия) и без него (контроль).

Через 3-е суток культивирования определяли противоопухолевую активность МНК методом проточной цитофлуориметрии в следующих тестах:

1. Клетки линии K-562 отмывали в культуральной среде и окрашивали carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (10 мкг/мл, 20 мин). Затем клетки отмывали в среде, содержащей сыворотку, и смешивали с эффекторными клетками (МНК доноров) в соотношении эффектор:мишень — 5:1. Цитотоксический тест проводили в течение 4-х часов. По окончании реакции в клеточную взвесь добавляли пропидиум иодид, по окрашиванию которого определяли количество погибших мишеней. Специфический лизис вычисляли по формуле, учитывающей процент лизированных клеток-мишеней, инкубированных в присутствии клеток-эффекторов, и спонтанный лизис таких клеток [6].

2. При смешивании эффекторов с мишенями в соотношении 5:1 в культуру добавляли моноклональные антитела (мАТ) к CD107a-PE («Becton Dickinson», США) или изотипический контроль. После 1 ч инкубации добавляли монензин («Sigma-Aldrich», США). По окончании всего процесса культивирования (4 ч) клетки окрашивали мАТ к CD3-FITC, CD56-PC-5 («Becton Dickinson», США; «Beckman Coulter», США). После клетки дважды отмывали в ФСБ и анализировали количество CD107a позитивных клеток среди ЕК-клеток (CD3-CD56+), Т-клеток (CD3+CD56-) и ЕК-подобных Т-клеток (CD3+CD56+).

Статистическую обработку данных проводили с применением непараметрических методов в программе «Statistica» 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные нами исследования показали, что стимуляция МНК в присутствии ИЛ-2 приводила к достоверному увеличению экспрессии CD107a на клетках всех исследуемых популяций лимфоцитов (рисунок 1). Инкубация МНК в присутствии опухолевой линии K-562 также способствовала повышению процента CD107a+ ЕК и ЕКТ-клеток среди мононуклеаров, культивированных с или без ИЛ-2. Процент CD107a+ Т-клеток достоверно повышался в присутствии K-562 только в образцах МНК, стимулированных ИЛ-2. Необходимо отметить, что ЕК-клетки в большей степени по сравнению с Т- и ЕКТ-клетками активировались в присутствии линии K-562, что было заметно по количеству естественных киллеров, экспрессирующих маркер CD107a.

При оценке цитотоксичности в тесте с CFSE выявили увеличение количества погибших клеток K-562 в присутствии МНК, инкубированных с цитокином ($P < 0,01$, $n = 10$). Так, количество погибших клеток-мишеней в контроле составило $4,5 \pm 1,2$, тогда как в присутствии ИЛ-2 — $12,3 \pm 1,8$.

Также была выявлена прямая корреляция между процентом CD107a+ ЕК клеток в присутствии K-562 и количеством погибших мишеней в цитотоксическом тесте ($R=0,64$ и $R = 0,68$ для контрольных и стимулированных ИЛ-2 образцов, соответственно, $P < 0,05$, $n = 10$). При этом подобной зависимости для Т- и ЕКТ-клеток показано не было.

Таким образом, результаты определения противоопухолевой активности цитотоксических клеток по экспрессии маркера CD107a коррелируют с данными, полученными в тесте с лизисом клеток-мишеней. При этом метод определения экспрессии CD107a позволяет измерять цитотоксическую активность на уровне клетки в конкретной популяции эффекторов и может быть использован самостоятельно либо в комбинации с другими методами.

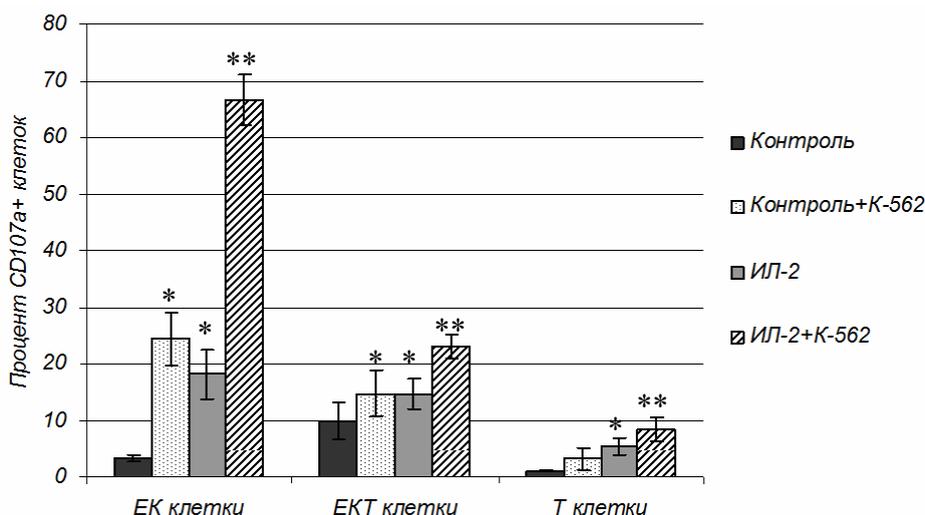


Рисунок 1 — Экспрессия CD107a на цитотоксических клетках, культивированных с или без ИЛ-2, в присутствии опухолевой линии K-562

*Примечание: * P < 0,05 по отношению к контролю, ** P < 0,05 по отношению к ИЛ-2, n = 14.*

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T-cells by a flow cytometric assay for degranulation / M. R. Betts [et al.] // *J. of Immunol. Methods.* — 2003. — Vol. 281. — P. 65–78.
2. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labeled allogeneic target cells in vitro: inhibition by isoantibody and by drugs / K. T. Brunner [et al.] // *Immunology.* — 1968. — Vol. 14. — P. 181–196.
3. A novel flow cytometric assay for evaluating cell-mediated cytotoxicity / M. W. Burkett [et al.] // *J. Immunother.* — 2005. — Vol. 28, № 4. — P. 396–402.
4. Fisher, K. The flow cytometric PKH-26 assay for the determination of T-cell mediated cytotoxic activity / K. Fisher, A. Mackensen // *Methods.* — 2003. — Vol. 31. — P. 135–142.
5. New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T-cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population / I. Jedema [et al.] // *Blood.* — 2004. — Vol. 103, № 7. — P. 2677–2682.
6. Cytokine-induced killer cells against autologous CLL: direct cytotoxic effects and induction of immune accessory molecules by interferon- γ / M. Kornacker [et al.] // *Int. J. Cancer.* — 2006. — Vol. 119. — P. 1377–1382.
7. Morris, D. G. Studies of lymphokine-activated killer (LAK) cells. I. Evidence using novel monoclonal antibodies that most human LAK precursor cells share a common surface marker / D. G. Morris, H. F. Pross // *J. Exp. Med.* — 1989. — Vol. 169. — P. 717–736.
8. Ex-vivo expanded human NK-cells express activating receptors that mediate cytotoxicity of allogeneic and autologous cancer cell lines by direct recognition and antibody directed cellular cytotoxicity / C. J. Voskens [et al.] // *J. of Exp. Clin. Cancer Res.* — 2010. — Vol. 29. — P. 134–146.

УДК 616.155.392+615.324

АЛЛОГЕННАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА

Е. В. Дзюба

9-я городская клиническая больница, г. Минск

В статье приведены собственные данные лечения хронического миелолейкоза с применением аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток является высокоэффективным методом лечения больных хроническим миелолейкозом.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

ALLOGENIC TRANSPLANTATION OF HEMOPOIETIC STEM CELLS IN THE TREATMENT FOR CHRONIC MYELOLEUKEMIA

E. V. Dzyuba

Municipal Clinical Hospital No. 9, Minsk

The article presents the data on the treatment for chronic myeloleukemia with the application of allogenic transplantation of hemopoietic stem cells. The analysis of the received results testifies to the fact that the allogenic transplantation of hemopoietic stem cells is a highly effective method of the treatment of patients with chronic myeloleukemia.

Key words: chronic myeloleukemia, allogenic transplantation of hemopoietic stem cells.