

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА СЕРИИ ИКО В ТРЕХЦВЕТНОМ АНАЛИЗЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Е. Н. Захарова, Т. Н. Заботина, О. В. Короткова, М. Е. Копырулина, И. В. Паниченко,
В. Т. Циклаури, И. А. Задеренко, Д. Ю. Блохин, П. К. Иванов

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Елена Николаевна Захарова zakharovaen@yandex.ru

Введение. Клинические исследования показали, что у большинства онкологических больных наблюдаются нарушения иммунологической реактивности. Мониторинг состояния иммунной системы больных с солидными опухолями включает субпопуляционный анализ иммунокомпетентных клеток (ИКК), основанный на изучении экспрессии поверхностных антигенов и внутриклеточных структур, и анализ функциональной активности ИКК. В настоящее время для субпопуляционного анализа лимфоцитов человека используют двух-, трех- и даже четырехцветные реакции иммунофлуоресценции (РИФ), позволяющие одновременно определять в одном образце несколько различных антигенов. Для этого используют сбалансированные смеси («коктейли») иммунофлуоресцентных зондов (ИФЗ) различной антигенной специфичности, несущих разную флуоресцентную метку. В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России путем конъюгирования моноклональных антител (МКА) серии ИКО и флуоресцентных красителей — флуоресцеина в форме изотиоцианатного эфира (FITC), моносукцинимидного эфира Alexa-488, цианиновых производных Imd306, Imd506 и растительного белка группы фикобилипротеинов фикоэритрина (PE) получены и охарактеризованы лабораторные образцы ИФЗ. Исследования этих конъюгатов показали их пригодность для одно- и двухцветного анализа субпопуляций лимфоцитов периферической крови человека методом проточной цитометрии.

Цель исследования — оценить возможность совместного использования нескольких ИФЗ на основе различных МКА серии ИКО и красителей FITC, Imd306, Imd506 и PE для трехцветного анализа субпопуляций лимфоцитов здоровых людей и пациентов с онкологическими заболеваниями методом проточной цитометрии.

Материалы и методы. В работе использовали панель ИФЗ, включающую зонды CD3-FITC, CD4-PE, CD8-Imd506, CD4-Imd306, полученные конъюгированием МКА серии ИКО разной специфичности и флуорофоров FITC, PE, Imd306 и Imd506 соответственно. Специфическую активность зондов оценивали в монохромных, двух- и трехцветных РИФ методом проточной цитометрии. Для оптимизации состава смесей ИФЗ и условий постановки РИФ в качестве исследуемого биологического материала использовали образцы венозной крови практически здоровых доноров. Клиническую апробацию полученных «коктейлей» проводили на 2 группах пациентов с онкологическими заболеваниями до и после хирургического лечения. Первая группа включала 64 больных раком слизистой оболочки полости рта. Вторая группа — 35 больных раком яичников.

Результаты. Показано, что для трехцветного анализа лимфоцитов человека методом проточной цитометрии рекомендуется использовать наборы меченых МКА: CD3-FITC (10 мкг/мл) + CD4-Imd306 с концентрацией 5–10 мкг/мл; CD3-FITC + CD4-PE с концентрацией 20 мкг/мл и CD3-FITC + CD8-Imd506 с концентрацией 10 мкг/мл. Указана конечная концентрация иммуноглобулина в растворе ИФЗ. Показано, что еще до начала лечения у больных раком слизистой оболочки полости рта в структуре Т-клеток статистически достоверно снижено содержание CD3⁺CD4⁺, а общий уровень CD8⁺ лимфоцитов достоверно превышает показатели донорской группы. Анализ линейных маркеров, характеризующих основную структуру лимфоидных клеток у первичных больных раком яичников, позволил выявить статистически значимое снижение по сравнению с показателями у доноров общего количества CD3⁺ Т-лимфоцитов. Не выявлено влияния проведенного хирургического лечения на показатели субпопуляционной структуры лимфоидных клеток.

Заключение. Комбинации флуоресцентных зондов CD3-FITC/CD4-Imd306/CD8-Imd506 и CD3-FITC/CD4-PE/CD8-Imd506 могут использоваться для трехцветного анализа методом проточной цитометрии субпопуляций лимфоцитов как практически здоровых доноров, так и онкологических больных. Сравнительные исследования специфической активности комбинаций ИФЗ на основе МКА серии ИКО и референтных коммерческих тест-систем (BD Biosciences) на лимфоцитах здоровых доноров и онкологических больных (рак яичников, рак слизистой оболочки полости рта) показали сопоставимые результаты. Применение полученных зондов позволило выявить нарушения субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови у больных раком яичников и раком слизистой оболочки полости рта, в частности CD3⁺/CD8⁺, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺.

Ключевые слова: моноклональные антитела, иммунофенотипирование, проточная цитометрия, трехцветный анализ, иммунофлуоресцентные зонды

MONOCLONAL ANTIBODIES OF IKO SERIES IN THE THREE-COLOR ANALYSIS OF SUB-POPULATIONS OF PERIPHERAL BLOOD T-LYMPHOCYTES OF ONCOLOGICAL PATIENTS

E.N. Zakharova, T.N. Zabolina, O.V. Korotkova, M.E. Kopyrulina, I.V. Panichenko, V.T. Tsiklauri, I.A. Zaderenko, D.Yu. Blokhin, P.K. Ivanov

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. Clinical studies have shown that the most oncological patients have impaired immunological reactivity. Monitoring of the immune system status of patients with solid tumors includes a subpopulation analysis of immunocompetent cells. It is based on the study of expression of surface antigens and intracellular structures, and an analysis of the functional activity of immunocompetent cells. Today two, three, and even four-color reagents are used for subpopulation analysis of lymphocytes. Fluorescent conjugate with monoclonal antibodies (MAB) of the ICO series and fluorescent dyes Imd-306, Imd-506 (cyanine) and phycoerythrin (a group of phycobiliproteins) was received and characterized in N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. These conjugates have proved themselves in one and two-color analysis of subpopulations of peripheral blood lymphocytes by flow cytometry.

The purpose of this study is to assess the possibility of sharing several immunofluorescent probes (IFP) on the basis of different Mab series of ICO and dyes FITC, Imd306, Imd506 and PE for three-color analysis of lymphocyte subpopulations of donors and patients with oncological diseases by flow cytometry method.

Materials and methods. A panel of immunofluorescent probes (IFP) CD3FITC, CD4PE, CD8-Imd506, CD4-Imd306 was used in the work. Probes are obtained with MAB (ICO series) and fluorophores FITC, PE, Imd-306, Imd-506. The specific activity of the probes was evaluated in the immunofluorescence reaction by flow cytometry. Donor's peripheral blood was used to optimize the conditions of the immunofluorescence reaction. Clinical approbation of the obtained sets was carried out on 2 groups of patients with oncological diseases before and after surgical treatment. The first group included 64 patients with cancer of the oral mucosa. The second group consists of 35 patients with ovarian cancer.

Results. We have shown that for the three-color analysis of human lymphocytes by flow cytometry, it is recommended to use sets of labeled MAB: CD3-FITC (10 µg/ml) + CD4-Imd306 at a concentration of 5–10 µg/ml; CD3-FITC + CD4-PE at a concentration of 20 µg/ml and CD3-FITC + CD8 Imd506 at a concentration of 10 µg/ml. The final concentration of immunoglobulin in the solution of IPS is indicated. It was shown that even before the beginning of treatment in patients with cancer of the oral mucosa the subpopulation CD3⁺ CD4⁺ content was significantly lowered in the structure of T cells, and the total level of CD8⁺ lymphocytes significantly exceeds the parameters of the donor group. Analysis of linear CD markers of lymphoid cells in patients with ovarian cancer revealed a significant decrease in the total number of CD3⁺ T-lymphocytes in comparison with donors. There was no evidence of the effect of surgical treatment on the subpopulation structure of lymphoid cells.

Conclusion. Combinations of fluorescent probes CD3-FITC/CD4-Imd306/CD8-Imd506 and CD3-FITC/CD4-PE/CD8-Imd506 can be used for trichromatic analysis by flow cytometry of the lymphocyte subpopulations of both healthy donors and cancer patients. Comparative studies of the specific activity of combinations of IFP based on Mab ICO series and reference commercial test systems (BD Biosciences) on lymphocytes of healthy donors and oncological patients (ovarian cancer, oral mucosa cancer) showed comparable results. The application of the obtained probes made it possible to reveal violations of the subpopulation structure of peripheral blood lymphocytes in patients with ovarian cancer and cancer of the oral mucosa, in particular, CD3⁺/CD8⁺, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺.

Key words: monoclonal antibodies, flow cytometry, immunofluorescent probes, MAB conjugates, three-color analysis

Введение

Среди иммунологических факторов в противоопухолевой защите доминирующая роль отводится клеточному иммунному ответу. Наиболее активными клетками в разрушении опухоли являются Т-лимфоциты и НК-клетки, оказывающие свое прямое (в результате индукции апоптоза или путем выделения гранзима В и перфорина) или опосредованное продукцией цитокинов действие на клетки-мишени [1], а также макрофаги и дендритные клетки. Клинические исследования показали, что у большинства онкологических больных присутствуют нарушения иммунологической реактивности [2–11]. Мониторинг состояния иммунной системы больных с солидными опухолями включает субпопуляционный анализ иммунокомпетентных клеток (ИКК), основанный на изучении экспрессии поверхностных антигенов

и внутриклеточных структур, и анализ функциональной активности ИКК. Иммунофенотипирование лимфоцитов проводится методом проточной цитометрии с использованием антител к дифференцировочным антигенам лейкоцитов. Если до недавнего времени такого рода исследования проводились в режиме монохроматического анализа, то сегодня для субпопуляционного анализа лимфоцитов используют двух-, трех- и даже четырехцветные реакции. Такой подход позволяет проводить исследование клеточного звена иммунитета в норме и при патологии на современном уровне, оценивать содержание и функциональную активность различных клеточных субпопуляций (клеток эффекторного звена, регуляторных клеток), проводить дифференциальную диагностику патологических состояний. Для выполнения таких анализов применяются смеси нескольких

иммунофлуоресцентных зондов (ИФЗ). Каждый из них обладает собственной антигенной специфичностью и индивидуальными спектральными характеристиками. Флуоресцентные зонды для иммунофенотипирования лейкоцитов человека получают конъюгированием специфических моноклональных антител (МКА) к поверхностным и внутриклеточным антигенам с флуоресцентными красителями. Выбор пригодных для цитометрического анализа флуорофоров напрямую связан с конструкцией цитометра, в первую очередь с длиной волны возбуждающего флуоресценцию светового пучка, а также со спектральными диапазонами каналов регистрации флуоресцентного сигнала.

В нашей стране исследования в области гибридной технологии привели к созданию собственных панелей МКА [12–14]. В Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина (ранее Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина) были получены и охарактеризованы МКА серии ИКО [15–17], на основе которых в дальнейшем получены конъюгаты с флуорофорами в форме изотиоцианатного эфира (FITC), растительного белка группы фикобилипротеинов фикоэритрина (PE), цианиновых производных Imd306, Imd506, моносукцинимидного эфира Alexa-488 [18–21]. Показано, что ИФЗ на основе МКА серии ИКО по специфической активности не уступают коммерческим аналогам в одно- и двухцветном анализе субпопуляций лимфоцитов человека.

Цель данного исследования — оценить возможность совместного использования нескольких ИФЗ на основе различных МКА серии ИКО и красителей FITC, Imd306, Imd506 и PE для трехцветного анализа субпопуляций лимфоцитов здоровых лиц и пациентов с онкологическими заболеваниями методом точной цитометрии.

Материалы и методы

В работе использовали панель ИФЗ CD3-FITC, CD4-PE, CD8-Imd506, CD4-Imd306. Зонды получены на основе соответствующих МКА серии ИКО и флуорофоров FITC, PE, Imd306, Imd506 [18]. Характеристика этих ИФЗ представлена в табл. 1.

В качестве референтного контроля применяли прямо меченные МКА производства BD Biosciences (США): CD3-FITC, CD4-PE, CD8-PE.

Фосфатно-солевой буфер (PBS) (ООО «ПанЭко», Россия) готовили по инструкции производителя, pH готового раствора 7,4.

Эритроциты, содержащиеся в образцах крови, разрушали с использованием лизирующего раствора FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США).

Доноры и больные

Для оптимизации состава смесей ИФЗ и условий постановки реакции иммунофлуоресценции (РИФ) в качестве исследуемого биологического материала использовали образцы венозной крови практически здоровых доноров. Кровь забирали из локтевой вены натошак, в качестве антикоагулянта использовали этилендиаминтетрауксусную кислоту. Клиническую апробацию полученных «коктейлей» проводили на 2 группах пациентов с онкологическими заболеваниями до и после хирургического лечения: 1-я группа включала 64 больных раком слизистой оболочки полости рта, 2-я — 35 больных раком яичников.

Прямая реакция иммунофлуоресценции

В прямой РИФ клетки крови здоровых доноров инкубировали с конъюгатами МКА в течение 20 мин при 18–25 °C в темноте. Эритроциты лизировали раствором FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США). Не связавшиеся с клетками МКА удаляли двукратной отмывкой PBS (pH 7,4) и фиксировали образцы PBS с содержанием 0,4 % формальдегида.

Таблица 1. Характеристика иммунофлуоресцентных зондов на основе моноклональных антител серии ИКО

Антиген	CD3	CD4		CD8
МКА серии ИКО	ИКО 90	ИКО 86		ИКО 31
Распознаваемые клетки/структуры	Т-клетки	Субпопуляции Т-клеток		Субпопуляции Т-клеток
Аналог фирмы BD Biosciences	Leu4	Leu3a		Leu2b
Флуорофор	FITC	Imd306	PE	Imd506
Длина волны возбуждающего света, нм	488	488	488	635
Максимум испускания флуорофора, нм	520	563	573	659
Производитель флуорофора	Sigma (США)	ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия	Sigma (США)	ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия

Метод проточной цитометрии

В работе использовали проточный двухлучевой цитометр FACSCalibur (BD Bioscience, США) с программным пакетом CellQuest. Флуоресценцию учитывали в спектральных диапазонах 512–547 нм (FL1 для FITC), 575–595 нм (FL2 для PE, Imd306) и 650–670 нм (FL4 для Imd506). Для анализа клеточных популяций учитывали также показатели прямого малоуглового (FSC) и бокового (SSC) светорассеивания, на основании которых выполняли гейтирование — программное «выделение» субпопуляции лимфоцитов и дискриминацию иных субпопуляций. В каждом образце анализировали 5000 событий в гейте лимфоцитов. Обработку файлов первичных цитометрических данных проводили с использованием программного пакета WinMDI 2.8, находящегося в свободном доступе в сети Интернет.

Статистическая обработка данных

Использовали программное обеспечение Sigma Plot 11.0 для Windows. Достоверность различий в исследовании оценивали по t-критерию Стьюдента и непараметрическим критериям Вилкоксона—Манна—Уитни и Фишера в зависимости от характера распределения значений выборки. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Для определения достоверности корреляционной связи между данными, полученными с применением эталонных реагентов и экспериментальных флуоресцентных зондов, рассчитывали ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Все результаты представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки.

Результаты

В отличие от монохромной РИФ, при постановке реакции для многоцветного анализа в реакционной смеси с клетками крови одновременно присутствуют 2 и более флуоресцентных зонда, в связи с чем должно учитываться их возможное взаимное влияние на конечные результаты анализа. Так, выявляемые разными зондами антигенные эпитопы могут располагаться на клеточной поверхности в непосредственной близости друг к другу таким образом, что связывание одного зонда со «своим» антигеном создаст стерическое препятствие для связывания с клеткой другого зонда, в результате чего полученный результат анализа может оказаться не равным сумме отдельных монохромных реакций.

Для определения рабочего титра растворов полученных ИФЗ использовали метод титрования антител, предложенный С.С. Stewart [22]. Метод основан на дробном разведении раствора ИФЗ с определением предельного значения фактора разведения, при котором в прямой РИФ еще сохраняется максимальная интенсивность флуоресценции антигенпозитивных клеток.

Ранее нами показано, что для двухцветного анализа лимфоцитов человека методом проточной цитометрии рекомендуется использовать наборы меченых МКА: CD3-FITC (10 мкг/мл) + CD4-Imd306 с концентрацией 5–10 мкг/мл; CD3-FITC + CD4-PE с концентрацией 20 мкг/мл и CD3-FITC + CD8-Imd506 с концентрацией 10 мкг/мл. Указана конечная концентрация иммуноглобулина в растворе ИФЗ.

Для оценки возможности совместного применения различных зондов в одной трехцветной РИФ используется простой методический прием: в 4 пробирки вносят образец исследуемой крови, после чего в 1-ю пробирку добавляют раствор 1-го ИФЗ (например, CD3-FITC) в оптимальной конечной концентрации, во 2-ю пробирку — раствор 2-го ИФЗ (например, CD4-Imd306 или CD4-PE), в 3-ю — раствор 3-го ИФЗ (CD8-Imd506), а в 4-ю — смесь всех 3 зондов в той же конечной концентрации каждого.

После выполнения прямой РИФ все 4 образца анализируют на проточном цитометре. По результатам анализа строят гистограммы распределения зарегистрированных событий по 1-му каналу флуоресценции (FL1) для содержимого пробирки № 1 и 4 (CD3-FITC), по 2-му каналу (FL2) — для пробирок № 2 и 4 (CD4-Imd306 или CD4-PE), по 4-му каналу (FL4) — для содержимого пробирок № 3 и 4 (CD8-Imd506). Гистограммы, построенные по результатам монохромного анализа (пробирки № 1–3), должны с точностью совпадать с соответствующими гистограммами трехцветного анализа (пробирка № 4). Если на гистограммах по результатам анализа содержимого пробирки № 4 положение пика специфической флуоресценции смещается влево относительно того же пика для пробирок № 1 и/или № 2, 3, в реакционной смеси для трехцветной РИФ следует увеличить конечную концентрацию соответствующего зонда до достижения требуемого соответствия. Если это не приводит к положительному результату, данная смесь зондов не может использоваться для трехцветного окрашивания в одной реакции.

Возможность использования полученных ИФЗ в трехцветном анализе продемонстрирована ниже: на рис. 1а представлена 3D-диаграмма распределения лимфоцитов крови здорового донора при трехцветном анализе с использованием «коктейля» зондов CD3-FITC (FL1) с конечной концентрацией 10 мкг/мл, CD4-PE (FL2) с концентрацией 20 мкг/мл, CD8-Imd506 (FL4) с концентрацией 10 мкг/мл. На рис. 1б — 3D-диаграмма распределения лимфоцитов того же образца крови при трехцветном анализе с использованием «коктейля» зондов CD3-FITC (FL1) с конечной концентрацией 10 мкг/мл, CD4-Imd306 (FL2) с концентрацией 10 мкг/мл, CD8-Imd506 (FL4) с концентрацией 10 мкг/мл.

В обеих комбинациях используется одна пара зондов CD3-FITC и CD8-Imd506, а 3-й компонент

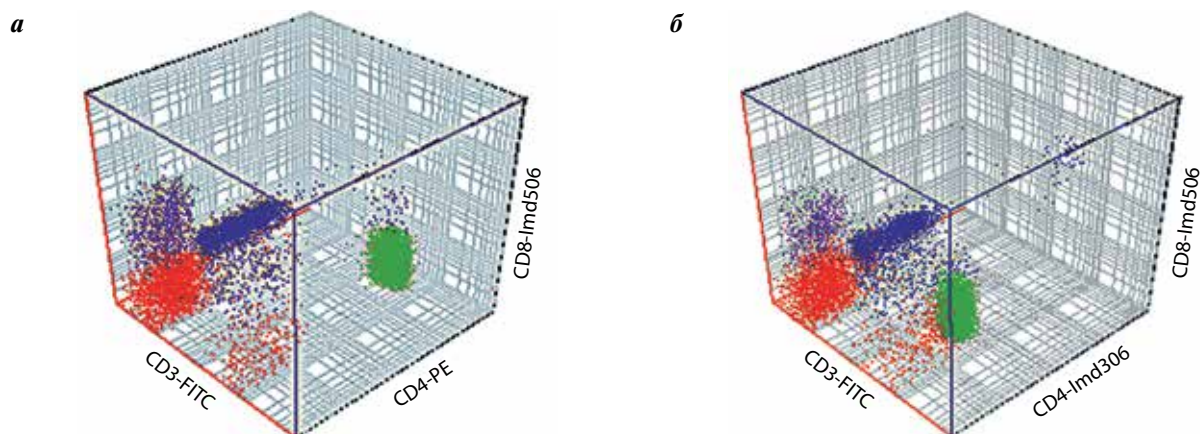


Рис. 1. Трехцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием комбинации CD3-FITC / CD4-PE / CD8-Imd506 (а). Трехцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови того же донора с использованием комбинации CD3-FITC / CD4-Imd306 / CD8-Imd506 (б)

Таблица 2. Анализ лимфоцитов периферической крови здоровых доноров с применением референтных реагентов (BD Biosciences) и иммунофлуоресцентных зондов на основе моноклональных антител серии ИКО, процент антигенпозитивных клеток в образце ($n = 39$, $M \pm m$)

Маркер	BD Biosciences	CD3-FITC / CD4-PE / CD8-Imd506	CD3-FITC / CD4-Imd306 / CD8-Imd506
CD3 ⁺	74,0 ± 1,5	75,0 ± 2,9	74,7 ± 2,5
CD3 ⁺ CD4 ⁺	43,0 ± 1,6	43,9 ± 1,1	44,1 ± 1,6
CD3 ⁺ CD8 ⁺	27,0 ± 1,1	28,1 ± 1,7	26,7 ± 1,4
CD3 ⁻ CD8 ⁺	7,5 ± 0,6	7,8 ± 1,1	6,9 ± 1,4
CD8 ⁺	34,5 ± 1,4	35,1 ± 1,2	34,4 ± 1,1
Коэффициент корреляции Спирмена (R)	—	0,975	0,889
<i>p</i>		<0,05	<0,05

обеих смесей различен: CD4-Imd306 (10 мкг/мл) в 1-й смеси или CD4-PE (20 мкг/мл) — во 2-й. Работоспособность каждого из этих ИФЗ «в составе смеси» определяется по степени совпадения гистограмм, полученных в монохромном или в многоцветном анализе клеточных популяций. На рис. 2а представлены совмещенные гистограммы по каналу FL1 для монохромного (голубое заполнение) и многоцветного (черный контур) анализа, на рис. 2б — аналогичные совмещенные гистограммы по каналу FL4.

Гистограммы практически идентичны, что указывает на отсутствие негативного влияния каждого из этих ИФЗ на связывание зондов со своими антигенами-мишенями при их одновременном и совместном использовании в испытанных концентрациях.

Аналогичным образом проанализирована пригодность для работы «в составе смеси» 3-го

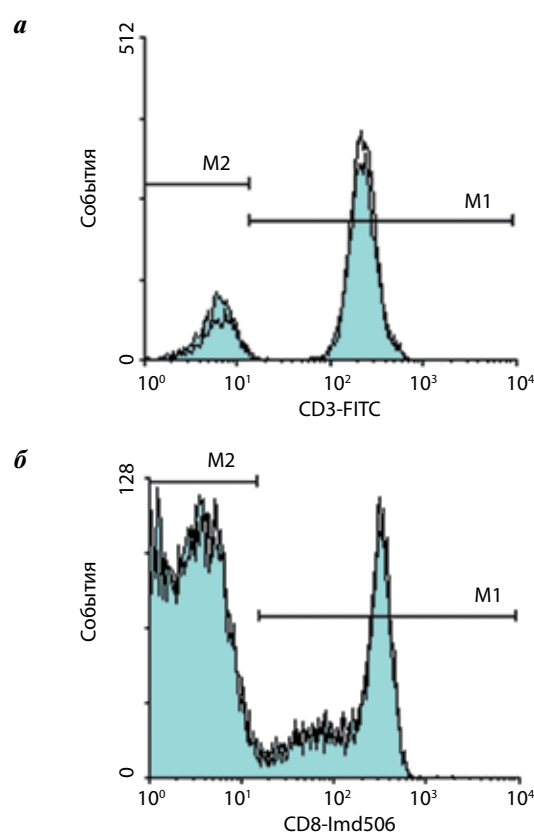


Рис. 2. Одно- и многоцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD3-FITC (10 мкг/мл) (а). Одно- и многоцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD8-Imd506 (10 мкг/мл) (б). Голубым заполнением выделены гистограммы, полученные при монохромном анализе, черным контуром — при многоцветном анализе

компонента испытанных смесей ИФЗ: CD4-PE (20 мкг/мл) или CD4-Imd306 (10 мкг/мл). На рис. 3 представлены совмещенные гистограммы по каналу FL2 для монохромного (голубое заполнение)

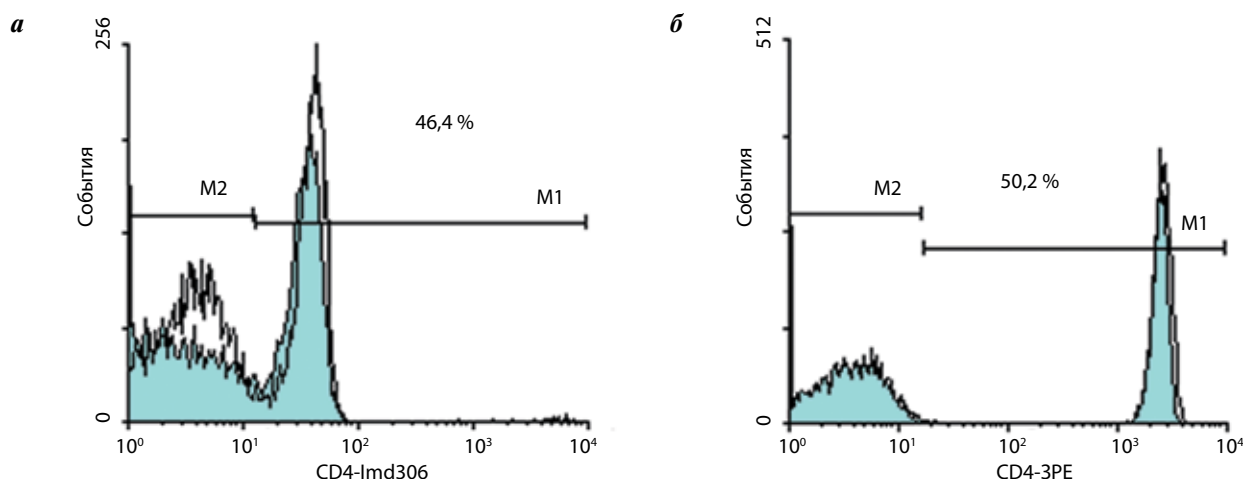


Рис. 3. Одно- и многоцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD4-Imd306 (10 мкг/мл) (а). Одно- и многоцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови того же донора с использованием конъюгата CD4-PE (20 мкг/мл) (б). Голубым заполнением выделены гистограммы, полученные при монохромном анализе, черным контуром — при многоцветном анализе

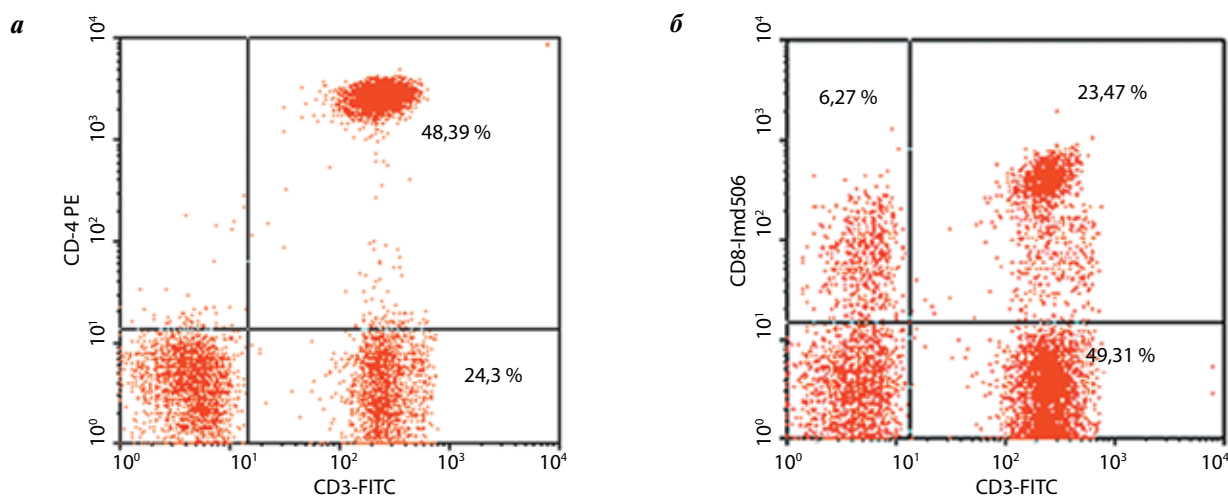


Рис. 4. Трехцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием ИФЗ CD3-FITC (FL1) + CD4-PE (FL2) + CD8-Imd506 (FL4): а — двумерная дот-плот диаграмма CD3-FITC (FL1) vs CD4-PE (FL2); б — двумерная дот-плот диаграмма CD3-FITC (FL1) vs CD8-Imd506 (FL4)

и многоцветного (черный контур) анализа с использованием ИФЗ CD4-Imd306 (рис. 3а) или ИФЗ CD4-PE (рис. 3б). В обоих случаях гистограммы также практически идентичны, что свидетельствует об одинаковой работоспособности ИФЗ в испытанных концентрациях как по отдельности друг от друга (монохромная реакция), так и в составе смеси.

Результаты, представленные на рис. 1 и 3, показывают, что для ИФЗ, в котором в качестве метки использован флуорофор PE, характерна значительно более высокая интенсивность флуоресцентного сигнала по каналу FL2, чем для ИФЗ с меткой Ind306, что выражается в максимальном разделении антиген-негативного («левый») и антиген-позитивного («правый») пиков гистограммы. В связи с этим выбор

CD4-PE для использования в многокомпонентных смесях ИФЗ для выполнения трехцветного анализа субпопуляций Т-лимфоцитов очевиден.

На рис. 4 представлены двумерные дот-плот диаграммы распределения лимфоцитов крови донора при их трехцветном анализе с использованием зондов CD3-FITC (FL1) + CD4-PE (FL2) + CD8-Imd506 (FL4). На рис. 4а четко выделяются субпопуляции Т-клеток с даблпозитивным фенотипом CD3⁺CD4⁺ (48,4 % — верхний правый квадрант) и прочих Т-лимфоцитов CD3⁺CD4⁻ (24,3 % — нижний правый квадрант); суммарное содержание Т-лимфоцитов в популяции, таким образом, составляет 72,7 %. На диаграмме рис. 4б субпопуляция цитотоксических даблпозитивных Т-лимфоцитов CD3⁺CD8⁺ составляет 23,5 %

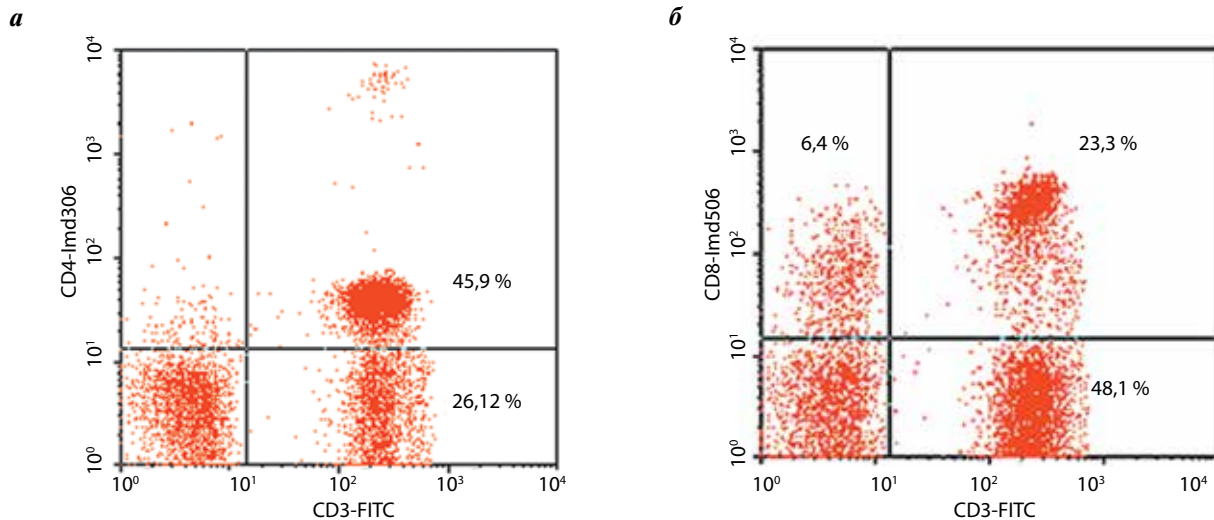


Рис. 5. Трехцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием ИФЗ CD3-FITC (FL1) + CD4-Imd306 (FL2) + CD8-Imd506 (FL4): а – двумерная дот-плот диаграмма CD3-FITC (FL1) vs CD4-Imd306 (FL2); б – двумерная дот-плот диаграмма CD3-FITC (FL1) vs CD8-Imd506 (FL4)

(верхний правый квадрант), в то время как популяция прочих Т-лимфоцитов насчитывает 49,3 % клеток в выбранном гейте (правый нижний квадрант), что в сумме также приводит к результату 72,8 % Т-лимфоцитов в составе всей клеточной популяции. Одновременно обнаруживается минорная субпопуляция лимфоцитов CD3⁺CD8⁺, которая составляет около 6,3 % от всех клеток выбранного гейта (верхний левый квадрант рис. 4б).

Практически идентичные результаты получены при анализе того же образца крови с применением комбинации ИФЗ CD3-FITC (FL1)/CD4-Imd306 (FL2)/CD8-Imd506 (FL4) (рис. 5).

Контрольные значения, полученные при анализе того же образца крови донора с применением коммерческих препаратов сравнения, составили: CD3⁺CD4⁺ – 47,7 %; CD3⁺CD8⁺ – 24,6 %, CD3⁺CD8⁺ – 5,9 %, что соответствует результату анализа, выполненного с использованием отечественной панели ИФЗ.

Таким образом, обе испытанные комбинации ИФЗ – CD3-FITC/CD4-Imd306/CD8-Imd506 и CD3-FITC/CD4-PE/CD8-Imd506 могут использоваться для трехцветного анализа субпопуляций лимфоцитов человека методом проточной цитометрии. Из 2 наборов предпочтительным выбором является комбинация зондов, содержащая CD4-PE.

Далее проводили сравнительный анализ специфической активности флуоресцентных зондов на основе МКА серии ИКО и референтных реагентов CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE (BD Biosciences, США). В качестве исследуемого материала использовали периферическую кровь здоровых людей в возрасте от 25 до 59 лет (18 женщин, 21 мужчины) (см. табл. 2).

Испытание полученных наборов ИФЗ на основе МКА серии ИКО в анализе лимфоцитов здоровых доноров показало их высокую специфичность и эффективность, не уступающую зарубежным аналогам, конкретно – конъюгатам производства BD Biosciences, США.

Клиническая апробация наборов

Клиническая апробация полученных наборов проводилась в 2 группах больных онкологическими заболеваниями: 1-я группа включала 64 больных раком слизистой оболочки полости рта до и после хирургического лечения, 2-я – 35 больных раком яичников до и после хирургического лечения.

1-я группа. В работе использованы материалы клинических наблюдений 64 первичных больных раком слизистой оболочки полости рта, находившихся на обследовании и лечении в отделении опухолей головы и шеи ФБГУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2009 по 2012 г. Диагноз плоскоклеточного рака был установлен первично, без проведения в предоперационном периоде химиолучевой терапии, и подтвержден гистологически. В исследование включены больные с II–IV стадией заболевания, примерно в равном соотношении по полу, в возрасте от 20 до 88 лет. Наибольшая частота этого заболевания наблюдалась у пациентов в возрастном диапазоне от 50 до 59 лет. Всем больным на 1-м этапе было проведено хирургическое лечение. В табл. 3 представлены результаты иммунологического обследования до и после хирургического лечения (через 10–14 дней после операции) по сравнению с группой здоровых лиц. Показано, что еще до начала лечения у больных раком слизистой оболочки полости рта в структуре Т-клеток статистически

Таблица 3. Определение субпопуляций лимфоцитов периферической крови онкологических больных до и после хирургического лечения (процент антигенположительных клеток) $M \pm t$

Маркер до лечения/ после лечения	Рак слизистой оболочки полости рта, <i>n</i> = 64		Рак яичников, <i>n</i> = 35	
	Использованные для анализа реагенты			
	CD3-FITC/CD4-PE или CD8-PE (референтные реагенты BD)	CD3-FITC/CD4-PE/ CD8-Imd506 (испытуемая смесь)**	CD3-FITC/CD4-PE или CD8-PE (референтные реагенты BD)	CD3-FITC/CD4-PE/ CD8-Imd506 (испытуемая смесь)**
CD3 ⁺	67,8 ± 1,7*	67,5 ± 1,5*	62,5 ± 16,5*	60,7 ± 13,2*
	65,0 ± 1,5*	66,2 ± 1,3*	61,8 ± 14,4*	62,1 ± 12,8*
CD3 ⁺ / CD4 ⁺	38,0 ± 1,0*	38,1 ± 0,9*	32,0 ± 2,4*	31,7 ± 1,1*
	35,4 ± 1,3*	35,7 ± 1,3*	34,5 ± 2,8*	32,7 ± 2,3*
CD3 ⁺ / CD8 ⁺	26,4 ± 1,0	26 ± 1,2	23,7 ± 2,2*	22,9 ± 0,8*
	25,2 ± 1,0	25,5 ± 0,7	21,5 ± 1,7*	20,9 ± 0,8*
CD3 ⁻ /CD8 ⁺	13,0 ± 1,0*	12,9 ± 0,9*	11,9±1,3*	10,9 ± 1,1*
	13 ± 0,9*	12,5 ± 1,3*	11,6 ± 1,2*	11,9 ± 0,5*
CD8 ⁺	39,4 ± 1,1*	38,7 ± 1,0*	35,6 ± 1,7	36,1 ± 0,5
	38,3 ± 1,0*	38,2 ± 1,2*	33,1 ± 1,7	33,1 ± 0,7

*Статистически значимые различия по сравнению с показателями доноров ($p < 0,05$).

**Статистически значимая корреляционная связь между полученными флуоресцентными зондами и эталонными реагентами ($p < 0,05$).

достоверно снижено содержание CD3⁺CD4⁺, а общий уровень CD8⁺ лимфоцитов достоверно превышает показатели донорской группы. Не выявлено влияния проведенного хирургического лечения на показатели субпопуляционной структуры лимфоидных клеток.

Группа 2. В исследование включены 35 первичных больных раком яичников, госпитализированных в гинекологическое отделение НИИ клинической онкологии ФБГУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России для выполнения планового хирургического лечения. Средний возраст по группе составил 53,9 года. В зависимости от гистологической структуры опухоли больные распределились следующим образом: серозный рак – 62,1 %, муцинозный рак – 13,8 %, эндометриоидный рак – 20,7 %, светлоклеточный рак – 3,4 %.

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводили до хирургического лечения и через 2 нед после него. Анализ линейных маркеров, характеризующих основную структуру лимфоидных клеток у первичных больных раком яичников, позволил выявить статистически значимое снижение по сравнению с показателями у доноров общего количества CD3⁺ Т-лимфоцитов. Проведенное хирургическое лечение также не влияло на динамику распределения этих показателей, что,

возможно, связано с коротким послеоперационным периодом наблюдения. В то же время разброс минимальных и максимальных значений ($M \pm \delta$) в Т-клеточном (до лечения 62,5 ± 16,5 %, после лечения – 61,8 ± 14,4 %) звене иммунитета свидетельствует о неоднородности анализируемых больных по уровню основных популяций иммунокомпетентных клеток [6].

Заключение

Комбинации флуоресцентных зондов CD3-FITC/CD4-Imd306/CD8-Imd506 и CD3-FITC/CD4-PE/CD8-Imd506 могут использоваться для трехцветного анализа субпопуляций лимфоцитов методом проточной цитометрии как практически здоровых доноров, так и онкологических больных.

Сравнительные исследования специфической активности комбинаций ИФЗ на основе МКА серии ИКО и референтных коммерческих тест-систем (BD Biosciences) на лимфоцитах здоровых доноров и онкологических больных (рак яичников, рак слизистой оболочки полости рта) показали сопоставимые результаты.

Применение полученных зондов позволило выявить нарушения субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови у больных раком яичников и раком слизистой оболочки полости рта, в частности CD3⁻/CD8⁺, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Галактионов В.Г. Иммунология: учебник. М.: Издательство МГУ, 1998:480 с. [Galaktionov V.G. Immunology: a textbook. Moscow: Publishing house of Moscow state University, 1998. 480 p. (In Russ.)].
2. Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования опухолевых клеток в диагностике и прогнозе рака молочной железы: дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.12. М., 2003:311 с. [Artamonova E.V. The role of immunophenotyping of tumor cells in the diagnosis and prognosis of breast cancer: dis. ... doctor of medicine: 14.01.12. Moscow, 2003. 311 p. (In Russ.)].
3. Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Кадагидзе З.Г. Изучение субпопуляции CD16+ лимфоцитов у онкологических больных на фоне вакцинотерапии. Медицинская иммунология 2006;8(2–3):334. [Borunova A.A., Chkadua G.Z., Zabolina T.N., Kadagidze Z.G. the Study of subpopulations of CD16+ lymphocytes in oncological patients on the background of vaccine therapy. Medical immunology 2006;8(2–3):334 (In Russ.)].
4. Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Демидов Л.В. Иммунофенотип лимфоцитов больных меланомой на фоне вакцинотерапии. Российский биотерапевтический журнал 2005;4(1):8. [Borunova A.A., Chkadua G.Z., Zabolina T.N., Demidov L.V. Immunophenotype of lymphocytes of patients with melanoma against the background of vaccine therapy. The Russian biotherapeutic journal 2005;4(1):8 (In Russ.)].
5. Заботина Т.Н., Очеева Н.Ю., Короткова О.В. и др. Оценка функциональной активности клеток гранулоцитарно-макрофагального звена иммунитета больных раком слизистой оболочки полости рта. Мат-лы VI съезда онкологов и радиологов стран СНГ: тез. докл. Душанбе, 2010. С. 67–8. [Zabolina T.N., Ocheeva N.Yu., Korotkova O.V. et al. Evaluation of the functional activity of cells of the granulocyte-macrophage link of immunity in patients with cancer of the mucous membrane of the oral cavity. Materials of the VI Congress of oncologists and radiologists of CIS countries: thes. of rep. Dushanbe, 2010. P. 67–8 (In Russ.)].
6. Заботина Т.Н., Короткова О.В., Борунова А.А. и др. Субпопуляционная структура лимфоцитов у больных раком яичников. Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина 2010;21(1):46–51. [Zabolina T.N., Korotkova O.V., Borunova A.A. et al. Subpopulation structure of lymphocytes in patients with ovarian cancer. Vestnik RONC im. N.N. Blokhina = Bulletin of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center 2010;21(1):46–51 (In Russ.)].
7. Кадагидзе З.Г., Славина Е.Г., Заботина Т.Н. и др. Иммунологический профиль лимфоцитов крови у онкологических больных. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(2):38. [Kadagidze Z.G., Slavina E.G., Zabolina T.N. et al. Immunological profile of blood lymphocytes in cancer patients. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2013;12(2):38 (In Russ.)].
8. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Заботина Т.Н. и др. Основные субпопуляции регуляторных лимфоцитов у больных злокачественной меланомой и раком молочной железы. Иммунология 2014;35(2):64–7. [Kadagidze Z.G., Chertkova A.I., Zabolina T.N. et al. Basic subpopulations of regulatory lymphocytes in patients with malignant melanoma and breast cancer. Immunologiya = Immunology 2014;35(2):64–7 (In Russ.)].
9. Коровушкина К.А., Бабаев А.А., Котельникова Т.В. и др. Оценка состояния иммунитета при опухолях тела матки. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского 2010;2–2:653–8. [Korovushkina K.A., Babaev A.A., Kotel'nikova T.V. et al. Assessment of immunity in tumors of the uterine body. Vestnik Nizhegorodskogo Universiteta im. N.I. Lobachevskogo = Bulletin of N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod University. 2010;2–2:653–8 (In Russ.)].
10. Короткова О.В., Заботина Т.Н., Скотаренко Л.В. и др. Субпопуляции лимфоцитов периферической крови больных РМЖ. Российский биотерапевтический журнал 2011;10(3):95. [Korotkova O.V., Zabolina T.N., Skotarenko L.V. et al. Subpopulations of lymphocytes in the peripheral blood of patients with breast cancer. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2011;10(3):95 (In Russ.)].
11. Скотаренко Л.В., Воронников И.К., Кадагидзе З.Г., Шамилов Ф.А. Особенности Т-клеточного иммунитета при раке молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2011;4:24–7. [Skotarenko L.V., Voronnikov I.K., Kadagidze Z.G., Shamilov F.A. Features of T-cell immunity in breast cancer. Opukholi Zhenskoy Reproktivnoy Sistemy = Tumors of the female reproductive system 2011;4:24–7 (In Russ.)].
12. Дубинкин И.В., Подгорная Т.В., Донсков С.И. Моноклональные реагенты анти-А и анти-В с новыми свойствами. Трансфузиология 2009;10(1–2):28. [Dubinkin I.V., Podgornaya T.V., Donskov S.I. Monoclonal reagents anti-A and anti-B with new properties. Transfuziologiya = Transfusion medicine 2009;10(1–2):28 (In Russ.)].
13. Дубинкин И.В., Горшкова Т.В., Каландаров Р.С., Донсков С.И. Получение и испытание моноклональных анти DVI-антител. Трансфузиология 2009;10(1–2):27–28. [Dubinkin I.V., Gorshkova T.V., Kalandarov R.S., Donskov S.I. Obtaining and testing of monoclonal anti-DVI-antibodies. Transfuziologiya = Transfusion medicine 2009;10(1–2):27–8 (In Russ.)].
14. Филатов А.В., Бачурин П.С., Маркова Н.А., Сурнакова Н.Е. Панель моноклональных антител к антигенам человеческих лимфоцитов. Экспериментальная онкология 1989;11(2):29. [Filatov A.V., Bachurin P.S., Markova N.A., Churakova N.E. A panel of monoclonal antibodies to antigens of human lymphocytes. Eksperimental'naya Onkologiya = Experimental Oncology 1989;11(2):29 (In Russ.)].
15. Барышников А.Ю., Фролова Е.А., Ленева Н.В. и др. Моноклональные антитела ICO-105 к рецептору интерлейкина-2(антиген CD25). Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 1993;4(4):7–12. [Baryshnikov A.Yu., Frolova E.A., Leneva N.V. et al. Monoclonal antibodies ICO-105 to the interleukin-2 receptor (antigen CD25). Vestnik RONC im. N.N. Blokhina = Bulletin of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center 1993;4(4):7–12 (In Russ.)].
16. Королева А.М., Барышников А.Ю., Виха Г.В. и др. Характеристика моноклональных антител ICO-116 к антигену CD16 естественных киллеров. Биотехнология 1993;(11–12):61. [Queen A.M., Baryshnikov A.Yu., Vikha G.V. et al. Characteristics of monoclonal antibodies ICO-116 to the CD16 antigen on natural killer cells. Biotechnologiya = Biotechnology 1993;(11–12):61 (In Russ.)].

17. Барышников А.Ю., Блохина Н.Г., Кадагидзе З.Г. Моноклональные антитела ИКО-1 против константной части IA-подобных антигенов. Экспериментальная онкология 1984;6:123. [Baryshnikov A.Yu., Blokhina N.G., Kadagidze Z.G. ICO-1 Monoclonal antibodies against the constant part of IA-like antigens. Eksperimental'naya Onkologiya = Experimental Oncology 1984;6:123 (In Russ.)].
18. Захарова Е.Н., Заботина Т.Н., Чудинов А.В. и др. Двухцветный анализ клеточных популяций методом проточной цитометрии с использованием цианинового красителя IMD-306. Мат-лы Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты»: тез. докл. М., 2007. С. 66. [Zakharova E.N., Zabolina T.N., Chudinov A.V. et al. Two-color analysis of cell populations by flow cytometry method using cyanide dye IMD-306. Materials of the all-Russian scientific-practical conference "Domestic anticancer drugs": theses. of rep. Moscow, 2007. P. 66 (In Russ.)].
19. Захарова Е.Н., Иванов П.К., Заботина Т.Н. и др. Иммунофлуоресцентные зонды на основе моноклональных антител ИКО-31 и цианинового красителя IMD-506 для анализа клеточных популяций методом проточной цитометрии. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(4):27–32. [Zakharova E.N., Ivanov P.K., Zabolina T.N. et al. Immunofluorescent probes based on ICO-31 monoclonal antibodies and IMD-506 cyanide dye for the analysis of cellular populations by flow cytometry. Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2013; 12(4):27–32 (In Russ.)].
20. Захарова Е.Н., Иванов П.К., Заботина Т.Н. и др. Двухцветный анализ клеточных популяций методом проточной цитометрии с использованием МКА серии ИКО, конъюгированных с цианиновым красителем IMD-306. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):17–21. [Zakharova E.N., Ivanov P.K., Zabolina T.N. et al. Two-color analysis of cell populations by flow cytometry method using ICO series MCA conjugated with cyanine dye IMD-306. Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2014;13(1):17–21 (In Russ.)].
21. Копырулина М.Е., Захарова Е.Н., Заботина Т.Н. и др. Технология создания и свойства иммунофлуоресцентных зондов с меткой Alexa-488 для анализа клеточных популяций методом проточной цитометрии. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(1):70–5. DOI: 10.17650/1726978420181717075. [Kaparulina M.E., Zakharova E.N., Zabolina T.N. et al. Technology development and properties of immunofluorescence probes labeled Alexa-488 for the analysis of cell populations by flow cytometry. Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(1):70–5 (In Russ.)].
22. Stewart C.C., Stewart S.J. Four colour compensation. Cytometry 1999;38(4):161–75. PMID: 10440854.