

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АНТИТЕЛ HLA-DR НА ОЦЕНКУ КОЛИЧЕСТВА CD14⁺HLA-DR^{LOW/-}-КЛЕТОК В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С В-КЛЕТОЧНЫМ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

А.В. Пономарев^{1,2}, В.А. Мисюрин^{1,2}, М.А. Барышникова¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ООО «ГеноТехнология»; Россия, 117485 Москва, ул. Профсоюзная, 104

Контакты: Александр Васильевич Пономарев kl8546@yandex.ru

Введение. В последнее время активно изучаются иммунорегуляторные способности миелоидных супрессорных клеток, а также проводятся исследования их в качестве прогностического фактора.

Цель исследования — оптимизация методики измерения моноцитарных миелоидных супрессорных клеток в периферической крови пациентов с В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом.

Материалы и методы. С помощью проточной цитометрии было определено количество миелоидных супрессорных клеток с фенотипом CD14⁺HLA-DR^{LOW/-} в периферической крови пациентов с В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом и здоровых доноров. Измерение проводилось в 2 точках, которые отличались концентрацией антител к HLA-DR: 15 и 4 мкл.

Результаты. Медиана количества миелоидных супрессорных клеток в периферической крови пациентов с В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом при 15 мкл антител к HLA-DR составила 1,9 %, при 4 мкл — 7 %. Для здоровых доноров при 15 мкл антител медиана составила 0,15 %, при 4 мкл — 0,3 %.

Заключение. Значение количества CD14⁺HLA-DR^{LOW/-}-клеток в крови пациентов с В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом чувствительно к концентрации антител HLA-DR.

Ключевые слова: миелоидные супрессорные клетки, хронический лимфоцитарный лейкоз, проточная цитофлуориметрия

Для цитирования: Пономарев А.В., Мисюрин В.А., Барышникова М.А. Влияние концентрации антител HLA-DR на оценку количества CD14⁺HLA-DR^{LOW/-}-клеток в крови пациентов с В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(3):66–8.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-66-68



EFFECT OF HLA-DR ANTIBODY CONCENTRATION ON ESTIMATION OF THE NUMBER OF CD14⁺HLA-DR^{LOW/-}-CELLS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

A.V. Ponomarev^{1,2}, V.A. Misyurin^{1,2}, M.A. Baryshnikova¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²“GenoTechnology” LLC; 104 Profsoyuznaya St., Moscow 117485, Russia

Introduction. Immunoregulatory functions of myeloid-derived suppressor cells have been extensively studied over the recent decades. Additionally, myeloid-derived suppressor cells have been investigated as a prognostic factor.

Objective. To optimize the measurement of monocytic myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia.

Materials and methods. The number of myeloid-derived suppressor cells with CD14⁺HLA-DR^{LOW/-}-phenotype was determined in the peripheral blood of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and healthy donors by flow cytometry. The measurement was carried out at two points, which differed in the concentration of anti-HLA-DR antibodies — 15 and 4 μ l.

Results. The median amount of myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 15 μ l of anti-HLA-DR antibody was 1.9 %, and with 4 μ l of antibody concentration — 7 %. Healthy donors had that median of 0.15 % with 15 μ l of antibody and 0.3 % with 4 μ l concentration.

Conclusion. The number of CD14⁺HLA-DR^{LOW/-}-cells in the blood of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia is sensitive to the concentration of the HLA-DR antibody.

Key words: myeloid-derived suppressor cells, chronic lymphocytic leukemia, flow cytometry

For citation: Ponomarev A.V., Misyurin V.A., Baryshnikova M.A. Effect of HLA-DR antibody concentration on estimation of the number of CD14⁺HLA-DR^{low/-}-cells in the blood of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(3):66–8. (In Russ.).

Введение

Миелоидные супрессорные клетки (Myeloid-derived suppressor cells, MDSC) — это гетерогенная популяция клеток, встречающаяся при различных заболеваниях, включая опухоли. Эти клетки представляют собой патологическое состояние активации моноцитов и относительно незрелых нейтрофилов. Характерная особенность MDSC — их способность ингибировать функции Т-клеток, что может способствовать патогенезу различных заболеваний [1], в том числе и онкогематологических [2]. Моноцитарные MDSC имеют фенотип CD14⁺HLA-DR^{low/-} [1]. Данные клетки показывают положительную корреляцию их количества в периферической крови с опухолевой нагрузкой и стадией заболевания при В-клеточном хроническом лимфоцитарном лейкозе (В-ХЛЛ) [2].

Наши первоначальные результаты изучения моноцитарных MDSC несколько расходились с данными литературы. После дополнительного изучения в методику были внесены корректировки. В соответствии с рекомендациями [3] мы отказались от применения изотипического контроля, но применяли контроль Fluorescence Minus One. Снижение концентрации антител к HLA-DR позволило более четко отделить популяцию моноцитарных MDSC в исследуемой группе В-ХЛЛ от значений нормы.

Цель исследования — оптимизация методики измерения моноцитарных MDSC в периферической крови пациентов с В-ХЛЛ.

Материалы и методы

Образцы периферической крови были взяты у 14 пациентов с диагнозом В-ХЛЛ на базе ООО «ГеноТехнология». Также были взяты образцы периферической крови у 2 здоровых доноров. Все образцы исследовали в день взятия крови. Для проточной цитометрии применяли антитела CD14 FITC (IM0645U, Beckman Coulter) 6 мкл и HLA-DR PE (347401, BD Pharmingen™) в объеме 15 или 4 мкл на 100 мкл образца периферической крови. В соответствии с рекомендациями [3] изотипический контроль не добавляли. Подсчет проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II с использованием программного обеспечения FACSDiva™ (Becton Dickinson).

Результаты

Для каждого образца проводили 2 измерения CD14⁺HLA-DR^{low/-}-клеток. В первом случае в пробу добавляли 15 мкл антител HLA-DR, во втором — 4 мкл. В табл. 1 представлены результаты значений количе-

ства CD14⁺HLA-DR^{low/-} у пациентов с В-ХЛЛ. Можно видеть, что в случае добавления 4 мкл антител процент CD14⁺HLA-DR^{low/-}-клеток увеличивается (медиана 7 %) по сравнению с данными после добавления 15 мкл антител HLA-DR (медиана 1,9 %). Как видно из табл. 2, снижение концентрации антител HLA-DR слабо влияет на значение клеток CD14⁺HLA-DR^{low/-} в норме (медиана 0,15 и 0,3 %). Это может объясняться более низкой плотностью экспрессии антигена HLA-DR на моноцитах при В-ХЛЛ по сравнению с нормой. Снижение концентрации антител HLA-DR не только приводит к его экономии, но и дает возможность более четкого выделения MDSC для изучения корреляций со стадией заболевания и другими клиническими характеристиками. Помимо этого, при таком подходе возможно более четкое отделение количества клеток MDSC в норме от их количества при В-ХЛЛ.

Таблица 1. Значение количества клеток CD14⁺HLA-DR^{low/-} в группе пациентов с В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом

Table 1. The value of the number of CD14⁺HLA-DR^{low/-}-cells in group of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia

Пациент Patient	Содержание CD14 ⁺ HLA-DR ^{low/-} во всех CD14 ⁺ , % CD14 ⁺ HLA-DR ^{low/-} level in all CD14 ⁺ , %	
	15 мкл антител к HLA-DR 15 µl antibodies to HLA-DR	4 мкл антител к HLA-DR 4 µl antibodies to HLA-DR
1	2,7	21,7
2	2,1	6,9
3	0,6	2,4
4	2,6	14,2
5	4,3	11,4
6	1,0	1,0
7	0,4	3,4
8	7,6	20,2
9	1,7	7,1
10	1,7	5,3
11	0,5	1,8
12	0,9	3,8
13	2,2	17,7
14	12,7	42,0
Медиана Median	1,9	7,0

Таблица 2. Значение количества клеток $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ в группе здоровых доноровTable 2. The value of the number of $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ -cells in group of healthy donors

Здоровый донор Healthy donor	Содержание $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ во всех $CD14^+$, % $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ level in all $CD14^+$, %	
	15 мкл антител к HLA-DR 15 μ l antibodies to HLA-DR	4 мкл антител к HLA-DR 4 μ l antibodies to HLA-DR
1	0,1	0,1
2	0,2	0,5
Медиана Median	0,15	0,3

Выводы

Наблюдаемое количество $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ -клеток в крови пациентов с В-ХЛЛ зависит от концентрации

антител HLA-DR. Согласно нашим экспериментам оптимальная концентрация антител HLA-DR для точного выделения MDSC составляет 4 мкл, а не 15 мкл.

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

- Veglia F., Perego M., Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol* 2018;19(2):108–19. DOI: 10.1038/s41590-017-0022-x.
- Пономарев А.В. Миелоидные супрессорные клетки при некоторых онкогематологических заболеваниях. Клиническая онкогематология 2017;10(1): 29–38. DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-1-29-38. [Ponomarev A.V. Myeloid-derived suppressor cells in some oncohematological diseases. *Klinicheskaya onkogematologiya* = *Clinical Oncohematology* 2017;10(1):29–38. (In Russ.)].
- Andersen M.N., Al-Karradi S.N.H., Kragstrup T.W., Hokland M. Elimination of erroneous results in flow cytometry caused by antibody binding to Fc receptors on human monocytes and macrophages. *Cytometry A* 2016;89(11): 1001–9. DOI: 10.1002/cyto.a.22995.

Вклад авторов

А.В. Пономарев: разработка дизайна исследования, получение и анализ данных, написание текста рукописи;

В.А. Мисюрин: анализ данных, написание текста рукописи;

М.А. Барышникова: анализ данных, редактирование и оформление рукописи.

Author's contributions

A.V. Ponomarev: developing the research design, data collection and analyze, writing the text of the manuscript;

V.A. Misyurin: data analyze, writing the text of the manuscript;

M.A. Baryshnikova: data analyze, editing and design of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.В. Пономарев / A.V. Ponomarev: <https://orcid.org/0000-0001-9517-8183>

В.А. Мисюрин / V.A. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0002-0762-5631>

М.А. Барышникова / M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования № 3 от 13.02.2020 г. одобрен комитетом по биомедицинской этике НИИ ЭДитО ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol No 3 of 13.02.2020 was approved by the biomedical ethics committee of Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 19.06.2020. **Принята к публикации:** 30.06.2020.

Article submitted: 19.06.2020. **Accepted for publication:** 30.06.2020.