

Б.В. Донской, В.П. Чернишов, Д.В. Осипчук

Імунофенотипова характеристика двох функціонально різних субпопуляцій натуральних кілерних клітин периферичної крові людини

У соматично здорових жінок вивчали імунофенотипові властивості натуральних кілерних клітин (НК) периферичної крові після їх стимуляції за допомогою чутливої клітинної лінії K562 (лінія еритромієлолейкозу людини, клітини якої не експресують молекулу гістосумісності – МНС I і є високочутливими мішенями для НК). Спостерігали підвищення рівня експресії маркерів CD (від англ. cluster of differentiation – маркери клітинної поверхні лейкоцитів): CD69 (ранній маркер активації), HLA DR (молекула головного комплексу гістосумісності II типу), CD95 (FAS-протеїн) та зниження рівня експресії CD62L (молекула адгезії). НК, які експресували CD69 після активації, було не більше ніж 60 % (50,0%±1,7%). Їхнє число не змінювалося при зниженні співвідношення ефектор–мішень і подовженні часу інкубації. Показано, що рівень експресії CD69, на відміну від інших маркерів, на активованих НК корелює з рівнем цитотоксичності НК. Також виявлено, що здатність до активації під дією стимуляції клітинної лінії K562, пов'язана зі втратою молекул адгезії CD62L на поверхні клітин. Здатність до активації мають лише НК з низькою цільністю або відсутністю експресії CD62L. Ми показали, що інкубація з чутливою клітинною лінією K562 підвищує рівень експресії CD69 на більшій частині популяції НК, чисельність CD69⁺-клітин, які експресують CD69 достовірно корелює з цитотоксичністю НК.

Ключові слова: натуральні кілерні клітини, активаційні маркери, цитотоксичність натуральних кілерних клітин.

ВСТУП

Натуральні кілерні клітини (НК), або великі гранулярні лімфоцити, становлять приблизно 10–15 % від усіх лімфоцитів периферичної крові. Поверхневими маркерами цих клітин є CD16 (рецептор до Fc-фрагмента імуноглобулінів) та CD56. НК здатні лізувати клітини-мішені без попередньої сенсibiliзації, володіють антитілозалежною цитотоксичною активністю та є цитокіновими продуцентами [5, 14]. НК – найбільш еволюційно давня лімфоцитарна субпопуляція та зв'язувальна ланка між антигенспецифічним і вродженим імунними механізмами захисту [15]. Цитотоксична активність НК регулюється за допомогою великої кількості активаційних рецепторів:

© Б.В. Донской, В.П. Чернишов, Д.В. Осипчук

KIR2DS1,158b,KIR2DS2 (суперродина імуноглобулінів), NKG2D (суперродина лектинів С-типу), TLR2,TLR3,TLR5 (TOLL-подібні рецептори) та інгібіторних рецепторів, які також можуть бути CD158a, KIR2DL2, KIR2DL3 (суперродина імуноглобулінів), CD94/NKG2 (суперродина лектинів С-типу) [2, 3, 6, 8, 9, 13].

Головними функціями НК вважається знищення вірусінфікованих клітин на початкових етапах інфекції та елімінавання пухлинних клітин, пригнічуючи таким чином канцерогенез [4]. НК можуть бути активовані такими стимулами, як контакт з дендритними клітинами, клітинами, які не експресують на поверхні МНС-I (пухлинні клітини, клітини, інфіковані вірусом),

зв'язуванням з імунокомплексами, а також під впливом інтерлейкінів (ІЛ): ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-12, ІЛ-15, ІЛ-18, ІЛ-21. НК у стані активації характеризуються збільшенням рівня експресії маркера – CD69 та підвищеною цитотоксичністю [1, 4, 7, 10].

Мета нашої роботи – вивчення взаємозв'язку експресії поверхневих маркерів і цитотоксичної активності НК периферичної крові людини.

МЕТОДИКА

Досліджували гепаринізовану кров 130 соматично здорових жінок віком від 25 до 45 років, що проходили обстеження в лабораторії імунології ДУ "Інститут педіатрії, акушерства і гінекології АМН України". Всі жінки були проінформовані про проведення дослідження та дали згоду.

Приготування мішеней. Як мішень використовували лінію K562 (суспензійна культура клітин еритромієлолейкозу людини). Клітини культивували у середовищі RPMI-1640, яке вміщувало 10 % ембріональної телячої сироватки. За добу до постановки НК-тесту, клітини розводили 1/1 свіжим середовищем для забезпечення логарифмічної фази росту. Для тесту клітини відмивали та доводили до концентрації $5 \cdot 10^6$ /мл і мітили живі клітини вітальним маркером CFDA (карбокси-2,7-дихлорофлуоресцеїн діацетат, при гідролізі внутрішньоклітинними естеразами формує карбоксифлуоресцеїн діацетат, який здатний до флуоресценції). Через 30 хв мічені клітини тричі відмивали DPBS – фізіологічним розчином, забуференим фосфатом Дульбекко («Sigma», США).

Виділення мононуклеарів периферичної крові (МПК). 4 мл гепаринізованої периферичної крові розводили 8 мл DPBS і розділяли на градієнті щільності Histopaque™-1077 («Sigma», США) 30 хв при 400 g. МПК тричі відмивали DPBS, підраховували у камері Горяєва та доводили до концент-

рації $3 \cdot 10^6$ /мл у середовищі RPMI, яке вміщувало 20 % бичачої сироватки.

НК-тест. Мононуклеари крові інкубували з міченою клітинною лінією K562 у співвідношеннях 20/1, 10/1, 5/1 та 4 год у CO₂-інкубаторі ("Revco", Швейцарія). Потім додавали 10 мкл (5 мг/мл) розчину йодиду пропідіуму та інкубували 20 хв при +4 °C. Аналізували на приладі FACSCan ("Becton Dickinson", США), (клітини-мішені, мічені CFDA, мали зелену, а пермобілізовані мертві клітини (PI⁺) червону флуоресценцію). Рівень спонтанного лізису клітин-мішеней (без додавання мононуклеарів) становив не більше ніж 5%.

Визначення експресії поверхневих маркерів на МПК. До 200 мкл гепаринізованої крові додавали $2 \cdot 10^5$ клітин K562 і 2 мл RPMI-1640. Після інкубації 20 год центрифугували (5 хв 1500 хв^{-1}), відбирали супернатант та мітили клітини моноклональними антитілами. У досліді використовували моноклональні антитіла ("Becton Dickinson", США), специфічні до поверхневих маркерів: HLA-DR-FITC, CD62L-FITC, CD4-PE, CD8-PE, CD3-PE, CD69-FITC, CD69-PE, CD56-PECy5, CD158-FITC, CD95-FITC. Після 40 хв еритроцити лізували Lysing Solution ("Becton Dickinson", США) та відмивали Cell Wash ("Becton Dickinson", США). Аналіз 20000 лімфоцитів проводили на приладі FACSCan ("Becton Dickinson", США). Визначали експресію поверхневих маркерів CD56, CD62L, CD69, HLA-DR, CD158, CD95 на популяціях НК (CD16⁺CD56⁺CD3⁻), CD3, CD4, CD8, CD69 на популяціях Т-лімфоцитів (CD3⁺CD4⁺CD8⁻ та CD3⁺CD4⁻CD8⁺) та CD56, CD3, CD69, CD62L на популяції натуральних кілерних Т-клітин (НКТ) (CD8⁺CD56⁺CD3⁺). В окремому досліді кров інкубували з лінією K562 у різних співвідношеннях та у різний проміжок часу або стимулювали клітини активатором протеїнкінази С 4β-форбол 12β-міристанат 13-ацетат (ФМА).

Результати досліджень піддавали варіа-

ційно-статистичній обробці за Стьюдентом з використанням програмного пакета Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Інкубація крові з чутливою клітинною лінією K562 підвищувала експресію активаційних маркерів на НК. Експресія раннього маркера активації CD69 збільшувалася з $8,83 \pm 0,08$ до $50,0\% \pm 1,7\%$, експресія пізнього маркера активації CD95 – на 22 % від вихідного значення і сягала $61,7\% \pm 1,7\%$, також на 27 % збільшувалась експресія HLA DR і становила $22,2\% \pm 0,6\%$. При цьому експресія молекули адгезії CD62L знижувалася на 50 % від початкового рівня. Поверхневий рівень таких маркерів, як CD158a (активаційний рецептор) та CD94 (інгібіторний рецептор) залишилася незмінною після активації (таблиця, рис. 1).

Навіть після додавання ФМА, який є тотальним стимулятором активації, рівень експресії рецептора активації CD158a на поверхні клітин не змінювався. Натомість достовірно підвищувалася експресія пізнього маркера активації CD95, молекули гітосумісності II класу HLA DR та раннього маркера активації CD69 після додавання ФМА. Рівень експресії CD69 та HLA DR у деяких випадках сягав 100 %. Експресія НК CD62L при активації ФМА на поверхні клітин майже зникла, і в деяких випадках сягала нуля (рис. 1,а).

Максимальна експресія CD69 на поверхні НК сягала вже на 6–10-й годині інкубації. Кількість НК, які експресували CD69 на піку активації, становила не більше ніж 60 % ($50\% \pm 1,7\%$), після чого виходила на плато (рис. 2,а). При продовженні часу інкубації відсотковий вміст клітин CD69⁺ не збільшувався. Також при зниженні співвідношення кількості ефектор-мішень, відсотковий вміст НК, які експресували CD69, не збільшувався (див. рис. 2,б). Подібна крива насичення спостерігалась і при інкубації

Вплив інкубації мононуклеарів периферичної крові з клітинною лінією K562 на експресію поверхневих маркерів (M±m, n=130).

Популяції досліджуваних клітин	CD69		CD94		HLA-DR		CD158		CD95		CD62L	
	Спонтанний рівень експресії	Рівень експресії після інкубації з мішенню K562	Спонтанний рівень експресії	Рівень експресії після інкубації з мішенню K562	Спонтанний рівень експресії	Рівень експресії після інкубації з мішенню K562	Спонтанний рівень експресії	Рівень експресії після інкубації з мішенню K562	Спонтанний рівень експресії	Рівень експресії після інкубації з мішенню K562	Спонтанний рівень експресії	Рівень експресії після інкубації з мішенню K562
Натуральні кілерні клітини	8,83±0,08	47,8±0,13*	67,6±1,6	71,6±1	17,5±0,5	22,2±0,6*	29,1±3,3	30,3±2,8	50,5±2,7	61,7±1,7*	34±0,9	17,5±0,4*
Натуральні кілерні Т-клітини	10,2±0,1	17,3±0,1*	43,8±2,3	42,6±1,4	30±0,7	32,5±0,8	12,8±1,6	13,1±1,7	91,5±0,9	89,9±0,9	35±0,7	33,7±0,7
Цитотоксичні Т-лімфоцити CD8 ⁺	7,1±0,1	11,8±0,1	10,5±0,6	9,6±0,4	30,2±0,6	31,2±0,6	1,63±0,4	1,27±0,4	56,9±1,4	55,8±1,4	55,8±0,6	56,8±0,5
Т-лімфоцити CD4 ⁺	3,5±0,1	4,4±0,1*	0,6±0,1	0,5±0,1	6±0,2	6,4±0,2	1±0,3	0,2±0,03	46,3±1,7	47,8±1,1	77,8±0,5	75,2±0,4

*P<0,05 порівняно з контролем.

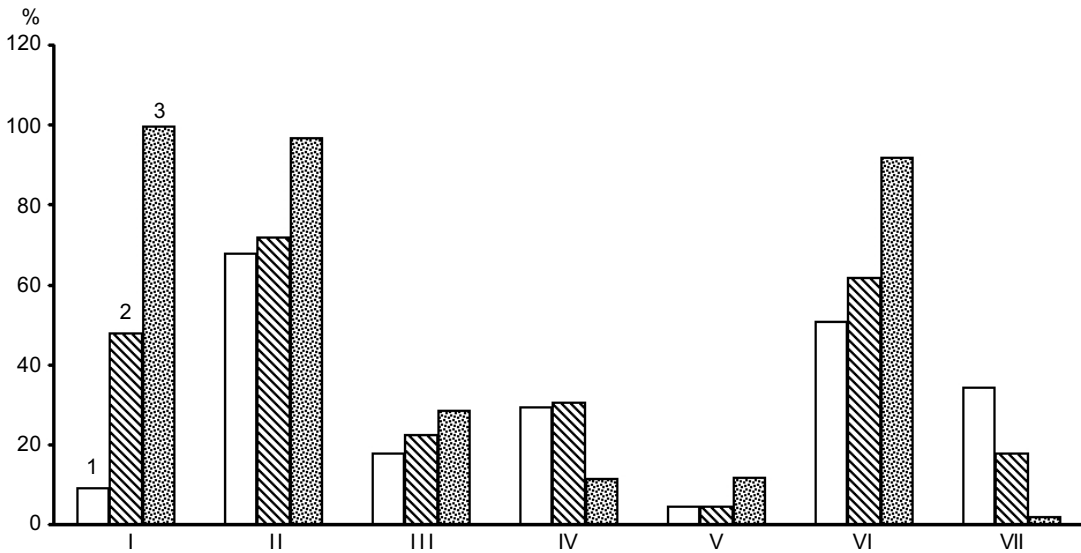


Рис. 1. Зміни експресії поверхневих маркерів на натуральних кілерних клітинах до (1), після активації чутливою лінією K562 (2) та ФМА(3): I – CD69, II – CD94, III – HLA DR, IV – CD158a, V – CD27, VI – CD95, VII – CD62L

виділених МПК з чутливою лінією K562.

Отримані результати ілюструють наявність функціонального пулу НК, здатного до активації при стимуляції лінією K562, і який становить у середньому 50 % від усієї популяції. З іншого боку, досить велика частка НК, що циркулюють у периферичній

крові, не розпізнає цей сигнал і не активується при взаємодії з чутливою клітинною лінією K562.

Спонтанна експресія (без додавання клітинної лінії K562) активаційних маркерів CD69, HLA DR, CD95 на поверхні НК, не корелювала з НК-цитотоксичність. Експре-

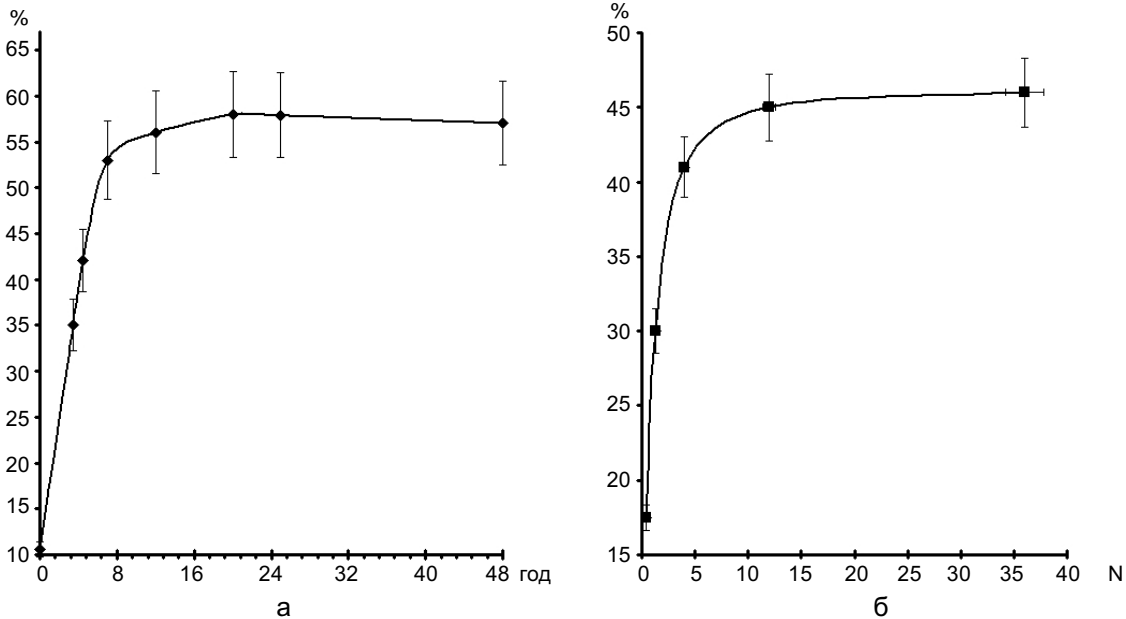


Рис. 2. Залежність експресії раннього маркера активації CD69 на натуральних кілерних клітинах від тривалості стимуляції чутливою лінією K562 (а) та від співвідношення кількості ефектор-мішень (K562/НК, б)

сія HLA DR і CD95 після стимуляції чутливою мішенню також не була пов'язана з НК-цитотоксичністю. Проте відсотковий вміст клітин, що набули CD69⁺-фенотипу після стимуляції клітинною лінією K562, корелював з рівнем НК-цитотоксичності ($P < 0,05$, $r = 0,6$). При розподіленні зразків на групи з підвищеною та нормальною НК-цитотоксичністю, з'ясувалося, що експресія маркера активації CD69 після стимуляції у групі з підвищеною НК-активністю була вищою порівняно зі зразками, що мали нормальну НК-цитотоксичність ($P < 0,05$). Це свідчить про те, що зміни експресії CD69, прямо пов'язані з функціональною цитотоксичною активністю НК.

CD62L експресована на НК, забезпечує адгезію до ендотелію та міграцію НК до вторинних лімфоїдних органів [12, 14]. Нами було виявлено, що здатність до активації під впливом стимуляції клітин K562, пов'язана з експресією CD62L на поверхні НК (рис. 3). Здатність до активації мають лише НК, з низькою щільністю або відсутністю експресії CD62L на поверхні. Експресія CD69 на НК після активації обернено

пропорційно залежить від такої CD62L. Можливо, НК, які мають високу щільність експресії CD62L та низьку – CD69, спрямовані на міграцію у вторинні лімфоїдні органи, або мають іншу функцію і тому не відповідають активацією на інкубування з чутливою клітинною лінією.

Важливо відмітити, що при інкубації лімфоцитів з високочутливими клітинами-мішенями для НК (лінія K562), підвищувалася експресія активаційних маркерів і знижувалася – інгібіторних рецепторів також на популяції НК Т-клітин (НКТ), і майже не змінювалася на Т-лімфоцитах (CD3⁺CD4⁺ та CD3⁺CD8⁺). Різні за онтогенетичним походженням популяції НК (CD16⁺CD56⁺CD3⁻) і НКТ-клітин (CD8⁺CD56⁺CD3⁺) демонструють функціональну «конвергенцію» (схожість) щодо антиген-неспецифічної активації (див. таблицю).

Стимуляція НК чутливою лінією K562, активує їх до лізису клітин-мішеней і призводить до появи на поверхні маркера CD69. Експресія CD69 на НК, після стимуляції з'являється лише на певній їх субпопуляції, розмір цього пулу асоційований та

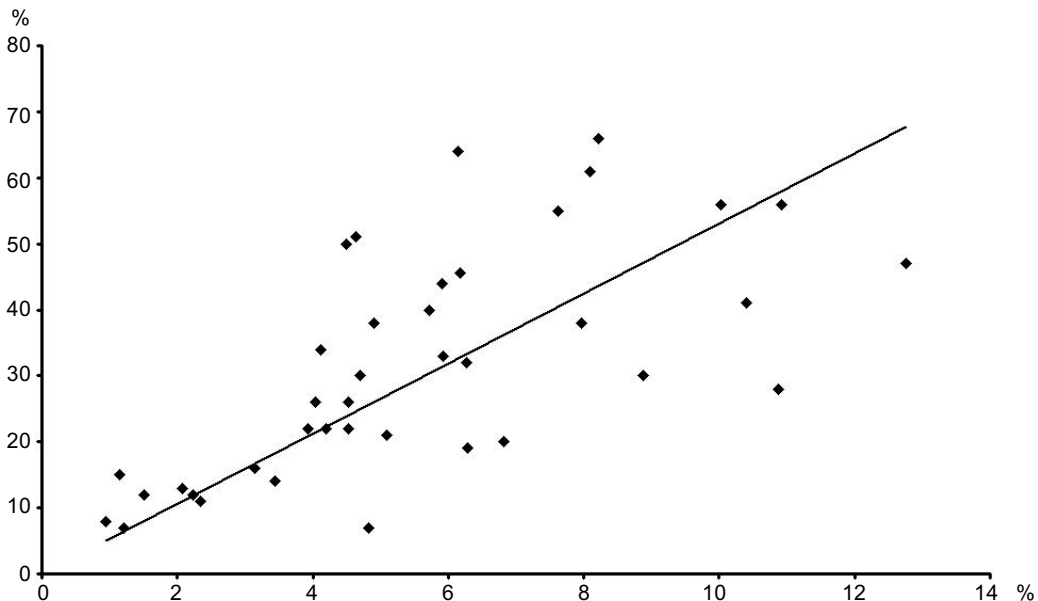


Рис. 3. Кореляції відсотка лізису клітин-мішеней при співвідношенні 20:1 і відсотка натуральних кілерних клітин (НК), які експресують ранній маркер активації CD69 після активації

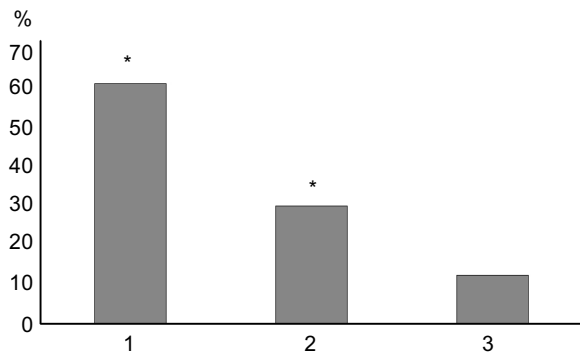


Рис. 4. Експресія раннього активаційного маркера CD69 на натуральних кілерних клітинах, які не експресують молекули адгезії CD62L (1), з низькою і високою щільністю (2, 3 відповідно) після активації чутливою клітинною лінією K562. *P<0,05 порівняно з контролем

взаємно корелює з цитотоксичною активністю НК. Фенотип НК, в якому клітини здатні до активації після взаємодії з лінією K562 характеризується високою щільністю експресії CD69 та низькою або відсутністю експресії CD62L.

У нашій роботі вперше продемонстровано складну функціонально-популяційну структуру НК периферичної крові людини. Можливим механізмом активності цих клітин є наявність функціональних популяцій, спеціалізованих до виконання конкретних фізіологічних функцій.

ВИСНОВКИ

1. Популяції НК і НКТ-клітин демонструють функціональну «конвергенцію» щодо антигеннеспецифічної активації.

2. Експресія раннього активаційного маркера CD69 внаслідок активації виділяє функціональну популяцію НК, що певним чином репрезентує функціональний статус популяції та достовірно корелює з їх цитотоксичністю.

3. Популяція НК, що здатна до активації внаслідок стимуляції клітинної лінії K562, характеризується низькою щільністю або відсутністю експресії молекули адгезії CD62L на поверхні клітин.

Б.В. Донской, В.П. Чернишов, Д.В. Осипчук

ИММУНОФЕНОТИПОВАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДВУХ ФУНКЦИОНАЛЬНО РАЗНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

У соматически здоровых женщин изучали иммунофенотипические свойства натуральных киллерных клеток (НК) периферической крови после их стимуляции с помощью клеточной линии K562 (линия эритромиелолейкоза человека, клетки которой не экспрессируют молекулу гистосовместимости – МНС I и являются высокочувствительными мишенями для НК-клеток). Наблюдали повышение уровня экспрессии маркеров CD (от англ. cluster of differentiation – маркеры клеточной поверхности лейкоцитов): CD69 (ранний маркер активации), HLA DR (молекула главного комплекса гистосовместимости II типа), CD95 (FAS-протеин) и снижение уровня экспрессии CD62L (молекула адгезии). НК, которые экспрессировали CD69, после активации было не больше 60 % (50,0%±1,7%). Их число не изменялось при снижении соотношения эффектор – мишень и удлинении времени инкубации. Показано, что уровень экспрессии CD69, в отличие от других маркеров, на активированных НК (после стимуляции клеточной линии K562) коррелирует с уровнем цитотоксичности НК. Также обнаружено, что способность к активации под воздействием стимуляции линией K562 связана с утратой CD62L на поверхности клеток. Способность к активации имеют лишь НК с низкой плотностью или отсутствием экспрессии молекул адгезии CD62L. Мы показали, что инкубация с клеточной линией K562 повышает уровень экспрессии CD69 на большей части популяции НК, численность CL69⁺-клеток, которые экспрессируют CD69, коррелирует с цитотоксичностью НК.

Ключевые слова: натуральные киллерные клетки, активационные маркеры, цитотоксичность натуральных киллерных клеток.

B.V. Donskoy, V.P. Chernyshov, D.V. Osypchuk

THE IMMUNOPHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF TWO FUNCTIONALLY DIFFERENT NK CELL'S SUBPOPULATIONS IN PERIPHERAL HUMAN BLOOD

NK cell cytotoxicity and immunophenotypic characteristics of activated natural killer (NK) cells after co-incubation with K562 target cells in women were investigated. An increase in CD69, HLADR, CD95 expression on target-activated NK cells was demonstrated. Conversely, CD62L expression in NK cells after activation was decreased. The results showed that only a part of NK cells after incubation with K562, be-

came CD69 positive. Moreover, even after lowering of "effector - target" ratio and extensions of time of stimulation, the amount of CD69+NK cells did not exceed 60% (50%±1.7%). Expression of CD69, CD95 and HLADR on NK cells before co-incubation didn't correlate with NK cytotoxicity. However, size of population of activated CD69+ NK cells (after stimulation) was correlated with NK cytotoxicity. We also found that the activation capacity after cocultivation with K562 cells is related to loss in CD62L on NK cell's surface. Only CD62L^{neg} and less CD62L^{low}NK cells had the ability to be activated with K562. In conclusion, we demonstrated that incubation with K562 target cells enhanced the expression of CD69 on the major part of NK cell population and the size of CD69+NK cell population is strongly correlated with NK cytotoxicity. Key words: natural killer cells, markers of activation, NK cell's cytotoxicity.

Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology of AMS of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Benlahrech F., Donaghy H., Rozis G., Goodier M., Klavinskis L., Gotch F., Patterson S. Human NK cell Up-regulation of CD69, HLA-DR, Interferon γ Secretion and Cytotoxic Activity by Plasmacytoid Dendritic Cells is Regulated through Overlapping but Different Pathways//Sensors. – 2009. – **6**. – P.386–403.
2. Chalifour A., Jeannin P., Gauchat J-F., Blaecke A., Malissard M., N'Guyen T., Thieblemont N., Delneste Y. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers β -defensin production //Blood. – 2004. – **104**, №6. – P.1778–1783.
3. Caligiuri M.A. Human natural killer cells//Ibid. – 2008. – **112**, №3. – P.461–469.
4. Yun C.H., Lundgren A., Azem J., Sloling A., Holmgren J., Svennerholm A.-M., Lundin B.S. Natural killer cells and Helicobacter pylori infection: bacterial antigens and interleukin-12 act synergistically to induce gamma interferon production// Infect.Immun. – 2005. – **73**, №3. – P.1428–1490.
5. Dosiou C., Giudice L.C. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives//Endocrine Rev. – 2005. – **26**, №1. – P.44–62.
6. Eriksson M., Meadow S.K., Basu S., Mselle T.F., Wira C.R., Sentman C.L. TLR Mediate IFN- γ production by human uterine NK cells in endometrium// J.Immunol. – 2006. – **176**. – P.6219–6224.
7. Young H.A., Ortaldo J. Cytokines as critical co-stimulatory molecules in modulating immune response of natural killer cells// Cell Res. – 2006. – **16**. – P.16–24.
8. Kogure T., Mantani N., Sakai S., Shimada Y., Tamura J., Terasawa K. Natural killer cytolytic activity is associated with the expression of killer cell immunoglobulin-like receptors on peripheral lymphocytes in human// Med. Inflamm. – 2003. – **12**. – P.117–121.
9. Kumar V., Medhi B. Emerging role of uterine natural killer cells in establishing pregnancy//Iran. J.Immunol. – 2008. – **5**, №2. – P.71–81.
10. Zamai L., Ponti C., Mirandola P., Gobbi G., Papa S., Galeotti., Cocco L., Vitale M. NK cells and cancer// J. Immunol. – 2007. – **178**. – P.4011–4016.
11. Ntrivalas E.I., Kwak-Kim J.Y.H., Gilman-Sachs A., Chung-Bang H., Ng S.C., Beaman K.D., Mantouvalos H.P., Beer A.E. Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology//Hum. Reprod. – 2001. – **16**, №5. – P.855–861.
12. Redline R.W. Role of uterine natural killer cells and interferon γ in placental development//J.Exp. Med. – 2000. – **17**, №2. – P.1–4.
13. Farag S.S., Fehniger T.A., Ruggeri L., Caliguri M.A. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect//Blood. – 2002. – **100**, №6. – P.1935–1947.
14. Chen S., Kawashima H., Lowe J.B., Lanier L.L., Fukuda M. Suppression of tumor formation in lymph nodes by L-selectin-mediated natural killer cell recruitment// J.Exp.Med. – 2005. – **202**, №12. – P.1679–1689.
15. Sun J.C., Lanier L.L. Natural killer cells remember: An evolutionary bridge between innate and adaptive immunity?// Eur. J. Immunol. – 2009. – №39. – P.2059–2064.
16. Warren H.S., Campbell A.J., Waldron J.C., Lanier L.L. Biphasic response expressing both activating and inhibitory killer Ig-like//Intern.Immunol. – 2001. – **13**, №8. – P.1043–1052.

*ДУ «Ін-т педіатрії акушерства і гінекології АМН України», Київ
E-mail: boris_donskoy@ukr.net*

Матеріал надійшов до редакції 19.01.2010