

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра генетики

Д.С. ЧУЛПАНОВА, И.Ю. ФИЛИН,
А.А. РИЗВАНОВ, В.В. СОЛОВЬЕВА

ПРАКТИКУМ ПО ФЕНОТИПИРОВАНИЮ ПОПУЛЯЦИЙ
ИММУННЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ
ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

Учебно-методическое пособие

КАЗАНЬ
2022

УДК 576.5
ББК 28.0
П69

*Печатается по рекомендации учебно-методической комиссии
Института фундаментальной медицины и биологии КФУ
(протокол № 4 от 16 марта 2022 г.)*

Рецензенты:

доктор медицинских наук **Черепнев Г.В.**
кандидат биологических наук **Закирова Е.Ю.**

Чулпанова Д.С.

Ч89 **Практикум по фенотипированию популяций иммунных клеток с помощью проточной цитофлуориметрии: учебно-методическое пособие / Д.С. Чулпанова, И.Ю. Филин, А.А. Ризванов, В.В. Соловьева – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2022. – 42 с.**

ISSN

В учебно-методическом пособии содержатся стандартные протоколы фенотипирования популяций иммунных клеток с помощью проточной цитофлуориметрии. Каждый метод содержит теоретическое описание и краткую характеристику, назначение метода, наиболее важные аспекты его практического использования, целевое назначение необходимых реактивов и оборудования, подробное последовательное описание стадий лабораторных исследований. Рекомендовано для изучения следующих дисциплин: Б1.В.02 «Методы исследования в биологии и медицине», Б1.В.ДВ.2 «Методы генетических исследований», Б1.Б.23 «Клеточная и молекулярная биология» и Б1.В.ДВ.2 «Методы клеточной и молекулярной биологии».

УДК 576.5
ББК 28.0

ISBN 978-5-7645-0716-3

© Чулпанова Д.С., Филин И.Ю.,
Ризванов А.А., Соловьева В.В.
© ФГАОУ ВО КФУ, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОСНОВНЫЕ ПРИЦИПЫ СТРОЕНИЯ И АНАЛИЗА СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ.....	6
1.1 Иммунная система человека	6
1.2 Метод проточной цитофлуометрии для анализа клеток иммунной системы.....	9
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ПОДГОТОВКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ	14
2.1 Окрашивание цельной крови человека	14
2.2 Выделение и окрашивание мононуклеарных клеток из периферической крови человека.....	15
ГЛАВА 3. СТРАТЕГИИ ГЕЙТИНГА РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ИММУННЫХ КЛЕТОК	18
3.1 Стратегия гейтирования для выделения хэлперных Т-клеток ..	22
3.2 Стратегия гейтирования для выделения Tregs	24
3.3 Стратегия гейтирования для выделения цитотоксических Т- клеток (Т-киллеров)	24
3.4 Стратегия гейтирования для выделения натуральных киллеров (НК клеток)	26
3.5 Стратегия гейтирования для выделения НКТ-клеток	27
3.6 Стратегия гейтирования для выделения В клеток	29
3.7 Стратегия гейтирования для выделения дендритных клеток	31
ЛИТЕРАТУРА	37

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПК	Антиген-презентирующие клетки
МКПК	Мононуклеарные клетки периферической крови
ФЭУ	Фотоэлектронные умножители
Bregs	Регуляторные В клетки
CD	Кластер дифференцировки
cDCs	Конвенциональные дендритные клетки
CDP	Общие предшественники дендритных клеток
СМР	Общие миелоидные предшественники
CSB	Буфер для окрашивания клеток
CCR4	С-С-Рецептор хемокина 4
CXCR3	С-Х-С Рецептор хемокина 3
DCs	Дендритные клетки
DPBS	Фосфатно-солевой раствор Дульбекко
FSC	Прямое рассеяние света
IFN	Интерферон
IL	Интерлейкин
К3 EDTA	Трикале этилендиаминтетрауксусная кислоты
MHC	Главный комплекс гистосовместимости
moDCs	Моноцитарные дендритные клетки
PAMP	Носители образцов патогенности
pDCs	Плазмацитоидные дендритные клетки
SSC	Боковое рассеяние света
TCR	Т-клеточный рецептор
Th	Хэлперные Т-клетки
Tregs	Регуляторные Т-клетки

ВВЕДЕНИЕ

Иммунная система отвечает за защиту организма от множества разнообразных инфекций, а также участвует в заживлении ран и удалении опухолевых клеток. Эффективность иммунного ответа зависит от скоординированного и сбалансированного участия различных подтипов иммунных клеток. Классификация всех типов клеток, участвующих в этом процессе, является неотъемлемой частью исследования иммунной системы, а также применяется в качестве инструмента диагностики в медицине. Во многих случаях, например, для того чтобы правильно диагностировать, охарактеризовать стадии заболевания или обнаружить изменения, связанные с развитием заболеваний или эффективностью терапии. На сегодняшний день анализ популяций иммунных клеток становится все более и более доступным и часто используется в исследованиях, касающихся патологий, непосредственно связанных с нарушениями работы иммунной системы, а также для мониторинга состояния пациента при других заболеваниях.

Проточная цитофлуориметрия стала предпочтительной технологией для мониторинга иммунных клеток, поскольку она дает возможность анализировать большое количество параметров одновременно за короткое время. Проточная цитофлуориметрия является доступным и надежным методом для рутинного клинического использования. Метод основан на использовании антител, конъюгированных с флуорохромом, для обнаружения наличия специфических поверхностных или внутриклеточных антигенов на отдельных клетках в суспензии. Используя комбинацию антител против разных мишеней, конъюгированных с флуорохромами с разной длиной волны излучения, можно одновременно обнаруживать несколько антигенов. Таким образом, можно идентифицировать многие клеточные субпопуляции для того, чтобы оценить состояние иммунной системы человека при какой-либо патологии, или проанализировать эффективность того или иного вида терапии.

Качественное разделение иммунных клеток на проточном цитофлуориметре требует создания сложных комбинаций конъюгированных антител для оптимального различения представляющих интерес клеточных популяций. В учебно-методическом пособии описаны методы подготовки биологического материала, а также комбинации антител для проточной цитофлуориметрии, которые охватывают некоторые из наиболее важных подтипов иммунных клеток человека.

ГЛАВА 1. ОСНОВНЫЕ ПРИЦИПЫ СТРОЕНИЯ И АНАЛИЗА СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

1.1 Иммунная система человека

Организм человека постоянно подвергается воздействию патогенов, которые вдыхаются, проглатываются или попадают на поверхность кожи и слизистых оболочек. То, проникают ли эти организмы и вызывают ли они заболевание, является результатом как патогенности организма (факторов вирулентности), так и целостности защитных механизмов человека. Иммунная система представляет собой интерактивную сеть лимфоидных органов, клеток, гуморальных факторов и цитокинов. Иммунная система человека делится на две части, определяемые скоростью и специфичностью реакции. Их называют врожденным и адаптивным иммунитетом, хотя на практике между ними существует много взаимодействий. Термин врожденный иммунитет иногда используется для обозначения физических, химических и микробиологических барьеров, но чаще охватывает элементы иммунной системы (нейтрофилы, моноциты, макрофаги, система комплемента, цитокины и белки острой фазы), которые обеспечивают немедленную защиту хозяина [1]. Адаптивный иммунитет является отличительной чертой иммунной системы высших животных. Этот иммунный ответ опосредуется антиген-специфическими реакциями Т-клеток и В-клеток. В то время как врожденный иммунный ответ быстрый, но иногда повреждает нормальные ткани из-за отсутствия специфичности, адаптивный ответ иммунный точен, но для его развития требуется несколько дней или недель. У адаптивной реакции есть память, поэтому последующее воздействие приводит к более энергичной и быстрой реакции, но это также требует времени [2].

Основным признаком врожденной реакции является привлечение и активация нейтрофилов в очаге инфекции для уничтожения патогенов. На самых ранних стадиях инфекции или повреждения тканей происходит высвобождение цитокинов из активированных макрофагов. Цитокины, гранулоцитарные и гранулоцитарно-макрофагальные колониестимулирующие факторы, стимулируют деление миелоидных клеток-предшественниц в костном мозге, из которых в дальнейшем формируются нейтрофилы. Вышедшие из костного мозга нейтрофилы по градиенту хемотаксиса мигрируют к месту инфекции, где уничтожают патогены за счет высвобождения актив-

ных форм кислорода или цитотоксических белков (например, лизоцима) [3].

Еще одним важным участником врожденного иммунитета является система комплемента. Белки системы комплемента активируются в присутствии чужеродных агентов, а именно комплексов антиген-антитело определённого изотипа, при связывании с белками на поверхности микробных клеток либо при связывании микробных полисахаридов лектинами, циркулирующими в плазме крови. Все три пути сходятся в один на этапе активации центрального компонента С3. Компонент С3 в итоге инициирует сборку мембраноатакующего комплекса, состоящего из компонентов С5-С9, который создает поры на поверхности клетки-мишени, и клетка гибнет в результате осмотического лизиса [4].

Врожденный иммунитет также обеспечивает защиту от заражения паразитами. В этом процессе участвуют эозинофилы, которые связываются с иммуноглобулинами Е (IgE), покрывающими организм паразита. После связывания антителами эозинофилы выделяют ряд белков, таких как эозинофильный катионный белок и эозинофильная пероксидаза, которые обладают высокой цитотоксичностью при попадании на поверхность организмов [5].

Обеспечивают защиту от паразитов также и тучные клетки. Однако, кроме того, эти клетки участвуют в развитии аллергических реакций. Тучные клетки и базофилы несут рецепторы с высоким сродством к IgE, которые быстро поглощают любой локальный IgE. Сшивание этих рецепторов путем связывания антигена с IgE приводит к дегрануляции и высвобождению медиаторов воспаления, таких как вазоактивные амины, гистамин и серотонин, которые запускают реакцию гиперчувствительности первого (немедленного) типа [6].

Натуральные киллеры (англ. natural killers, НК клетки) имеют морфологию лимфоцитов, но не несут специфических рецепторов антигенов. Они распознают аномальные клетки двумя способами. Во-первых, за счет наличия на своей поверхности рецепторы иммуноглобулинов они могут связывать мишени, покрытые антителами, что приводит к антителозависимой клеточной цитотоксичности. Во-вторых, на их поверхности есть рецепторы к белкам главного комплекса гистосовместимости (англ. major histocompatibility complex, МНС) класса I. Если при взаимодействии с клеткой этот рецептор НК клетки не связывается, то клетка распознается как чужеродная и лизируется. Это достигается за счет секреции перфоринов на поверх-

ность клетки, к которой прикрепилась НК клетка. Перфорины делают отверстия в клеточной мембране, и через поры вводятся гранзимы. Гранзимы вызывают индукцию апоптоза в клетке-мишени [7].

Главные особенности адаптивного иммунитета, отличающие его от врожденного, состоят в формировании иммунного ответа на антиген *de novo*, что предопределяет его узкоспецифичную направленность. А также наличие иммунологической памяти, опосредующее усиленный и ускоренный иммунный ответ на повторное попадание антигена. Среди основных эффекторов адаптивного иммунитета выделяют элементы клеточного иммунного ответа – Т-клетки, которые созревают в тимусе, а также элементы гуморального иммунного ответа – В клетки, берущие свое начало в костном мозге. Данные типы клеток относятся к лимфоидному ряду клеток иммунной системы. После развития в первичных лимфоидных органах они мигрируют в лимфатические узлы и селезенку, где происходит захват антигенов из лимфы и крови. Таким образом, адаптивные иммунные ответы возникают вследствие сигналов врожденной иммунной системы и активации лимфоцитов, взаимодействуя непосредственно с патогеном, либо косвенно благодаря антиген-презентирующим клеткам (АПК). После чего лимфоциты мигрируют в другие участки тела за счет хемотаксиса для элиминации носителей образов патогенности (англ. pathogen-associated molecular patterns, PAMP) [8].

Важнейшим мостиком для перехода от врожденного иммунного ответа к адаптивному являются дендритные клетки (англ. dendritic cells, DCs). Дендритные клетки наряду с макрофагами и В клетками имеют на поверхности мембраны молекулы МНС-II, являясь профессиональными АПК. Но только DCs, благодаря возможности мигрировать в лимфатические узлы, имеют возможность активировать Т-клетки. Данная популяция клеток дифференцируется из общих миелоидных клеток-предшественниц (англ. common myeloid progenitor, CMP) в общих клетках-предшественницах дендритных клеток (англ. common dendritic cell progenitor, CDP), которые в свою очередь могут дифференцироваться либо в обычные дендритные клетки (англ. conventional DCs, cDCs), относящиеся к миелоидному ряду, либо в плазмацитоидные дендритные клетки (англ. plasmacytoid DCs, pDCs), относящиеся к лимфоидному ряду [9].

Большинство DCs локализуются в лимфоидных органах, периферической ткани и реже циркулируют в крови. При захвате антигенов происходит их интернализация, после чего DCs мигрируют в

лимфатические узлы для презентации захваченных антигенов на молекулах МНС-I и МНС-II Т-лимфоцитам. Затем происходит праймирование, активация и определение Т-клеточного ответа, представляющего соотношение Т-эффекторных и Т-регуляторных клеток (англ. regulatory T-cells, Tregs). После чего активированные Т-клетки мигрируют в место инфекции, распознают и связываются с носителями РАРР посредством Т-клеточного рецептора (англ. T-cell receptor, TCR) и МНС-I. А В клетки выделяют цитоксические антитела, которые помечают антигены, тем самым помогая Т-клеткам и НК клеткам в уничтожении патогенов. При этом подмножество Т-клеток, задействованных в данной процедуре, велико [2].

CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты направлены непосредственно на уничтожение патогенов. Хэлперные Т-клетки 1-го типа (англ. T-helper cells 1, Th1) продуцируют провоспалительные цитокины интерферон γ (англ. interferon γ , IFN- γ) и интерлейкин 2 (англ. interleukin, IL-2). Th2 помогают В клеткам, а также продуцируют противовоспалительные цитокины IL-4, IL-5 и IL-13, в то время как Th17 участвуют в противомикробном иммунитете и продуцируют провоспалительные цитокины, включая IL-17A, IL-17F и IL-22. В свою очередь Tregs продуцируют противовоспалительные цитокины IL-10 и трансформирующий фактор роста бета (англ. transforming growth factor β), а также оказывает иммуносупрессивное воздействие на иммунные клетки при их контакте во избежание аутоиммунных реакций. Так же существует малая субпопуляция Th9, секретирующих IL-9, которые контролируют дифференцировку Th17 и функционирование Tregs [10,11].

1.2 Метод проточной цитофлуориметрии для анализа клеток иммунной системы

Цитофлуориметрия – это процесс, в котором измеряются физические и/или химические характеристики отдельных клеток или других биологических или небιологических частиц примерно того же размера. Измерения производятся, когда клетки или частицы проходят через измерительный прибор, проточный цитометр, в потоке жидкости. Основные параметры клетки, которые анализируются прибором, это рассеяние света и испускание флуоресценции, которые возникают, когда лазерный луч попадает на клетку, движущуюся в направленном потоке жидкости. Рассеяние света клетками и клеточ-

ными компонентами происходит из-за их структурных и морфологических свойств. Флуоресценция испускается флуоресцентными молекулами, и ее интенсивность пропорциональна количеству молекул, связанных с клеткой или субклеточным компонентом [12].

Флуоресцентные молекулы, используемые в проточной цитофлуориметрии, могут быть флуорохромами, связанными с молекулами антител, или флуоресцентными красителями, которые либо специфически связываются с клеточными компонентами, либо демонстрируют изменение эмиссии в зависимости от некоторых характеристик микросреды. Взаимодействие между клетками и лазерным лучом, другими словами, рассеяние света и/или флуоресцентное излучение можно наблюдать для каждой отдельной клетки с использованием определенных детекторов [13].

Для обеспечения эффективной работы цитометра необходимо обеспечить слаженную работу трех компонентов: флюидики, оптики и электроники [14]. Флюидика обеспечивает возможность анализировать каждую клетку отдельно. Когда клеточная суспензия попадает в проточную ячейку цитометра, клетки движутся отдельно друг за другом поперек лазерного луча, который фокусируется перпендикулярно потоку (рисунок 1). Поток образца гидродинамически фокусируется с использованием изотонического буфера (обжимающей жидкости), который сосредотачивает поток образца в центре проточной ячейки. Это представляется возможным потому, что давление потока образца выше, чем давление потока проточной жидкости. Используя эту технологию, можно обнаруживать до 70 тыс. клеток в секунду. Оператор проточного цитометра может регулировать скорость, с которой клетки вводятся в проточную ячейку, в зависимости от типа эксперимента.

Для выполнения качественных измерений, таких как иммунофенотипирование, скорость потока устанавливается на более высокое значение. Для анализа содержания ДНК предварительным условием является более высокое разрешение, которое может быть достигнуто с использованием более медленных скоростей потока, когда поток образца становится уже, что увеличивает точность анализа рассеяния света. Правильная работа флюидики имеет решающее значение для анализа клеток лазерным лучом. В системе всегда не должно быть пузырьков воздуха и/или мусора, и в ней должно поддерживаться оптимальное давление.

Оптика проточного цитометра состоит из лазеров, линз и систем сбора света (фильтров и зеркал) в фиксированных положениях. Ла-

зерный луч фокусируется с помощью скрещенных цилиндрических линз. Лазерный свет является когерентным и монохроматическим, что необходимо для равномерного освещения клеток светом определенной длины волны. Чаще всего в современных приборах используются ультрафиолетовый (350 нм), фиолетовый (405 нм), синий (488 нм), желто-зеленый (561 нм) и красный (640 нм) лазеры. Когда лазерный луч попадает на клетку, возбуждающий свет рассеивается как в прямом, так и в боковом направлениях. Свет, рассеянный прямо (англ. forward scatter, FSC), указывает на размер клетки, тогда как такие параметры, как зернистость и морфология клеток, влияют на боковое рассеяние света (англ. side scatter, SSC) [15].

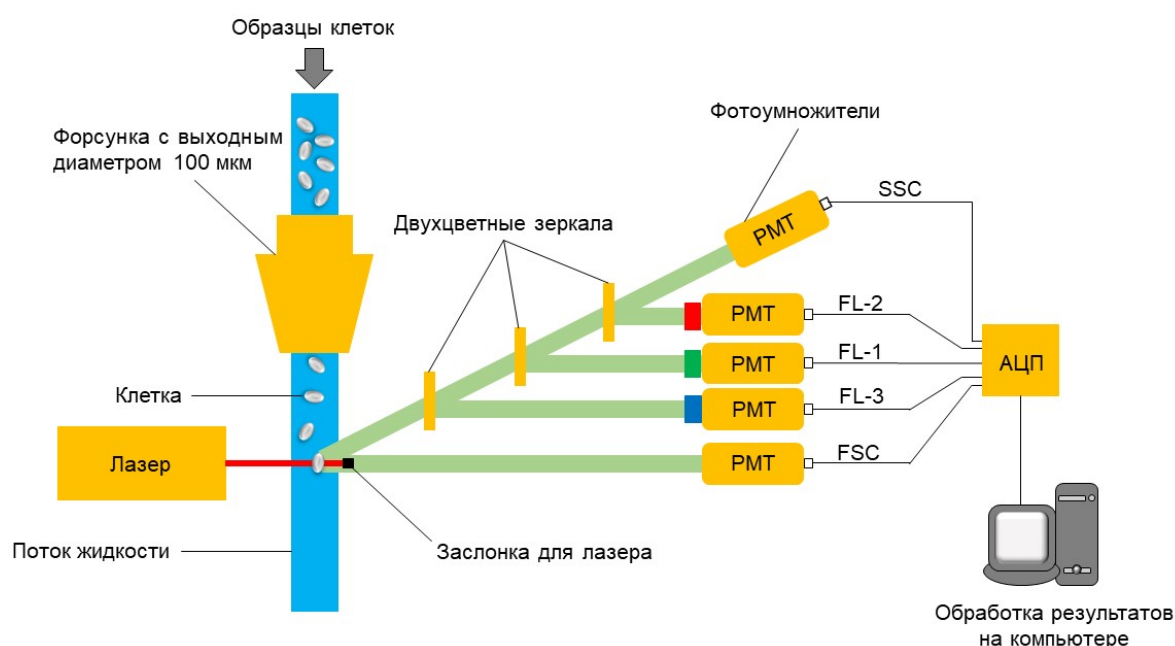


Рис. 1. Строение проточного цитометра

Флуоресценция испускается флуоресцентными молекулами, используемыми для окрашивания клеток или клеточных компонентов. Сборная оптика состоит из линз, которые собирают флуоресценцию, излучаемую клеткой. Набор зеркал и подходящие фильтры разделяют определенные длины волн и фокусируют их на соответствующие оптические детекторы. Подходящие фильтры (такие как длинные, короткие или полосовые фильтры) расположены так, чтобы оптический детектор мог обнаруживать определенный флуорохром. Полосовые фильтры передают на детекторы только определенный диапазон длин волн, короткие фильтры пропускают длины волн, равные или короче определенной длины волны, а длинные фильтры пропускают длины волн, равные или превышающие определенную длину волны. Фото-

детекторы преобразуют сигналы, генерируемые светорассеянием или флуоресценцией, в электрические сигналы. Наиболее часто используемые детекторы – это фотодиоды и фотоэлектронные умножители (ФЭУ). ФЭУ обладают большей чувствительностью по сравнению с фотодиодами. Сигналы FSC более сильные, поэтому могут быть обнаружены с помощью фотодиодов, тогда как сигналы с более слабой интенсивностью (например, SSC и флуоресценция) обычно регистрируются с помощью ФЭУ. Полученные сигналы обрабатываются электроникой, а данные визуализируются с помощью программного обеспечения (рисунок 1) [16]. ФЭУ и фотодиоды генерируют электрический ток на основе захваченных ими световых сигналов. После генерации электрического тока детекторами полученный аналоговый сигнал усиливается усилителем, а затем преобразуется в цифровой сигнал аналого-цифровыми преобразователями для дальнейших вычислений. Затем этот цифровой сигнал усиливается линейным или логарифмическим усилителем.

Усиленный цифровой сигнал, полученные от одной анализируемой клетки, регистрируются как отдельное событие, и отображаются на точечных графиках с двумя параметрами или гистограммах с одним параметром, иллюстрирующими интенсивность различных параметров (таких как рассеяние света или флуоресценция). Сигналы можно комбинировать по-разному, чтобы можно было визуализировать все субпопуляции. Хранение данных осуществляется в формате стандарта проточной цитометрии (англ. flow cytometry standard, FCS) [17].

Одним из наиболее важных аспектов графического отображения данных проточной цитометрии является тип шкалы. Шкалы данных проточной цитометрии бывают двух видов: линейные и логарифмические. Используемая шкала определяет способ организации данных на графиках. Как правило, линейная шкала используется для измерений параметров светорассеяния (когда исследуемые частицы не значительно различаются по интенсивности сигнала), а логарифмическая шкала используется для отображения флуоресценции (когда частицы сильно различаются по сигналу).

Области применения проточной цитофлуориметрии очень обширны. Цитофлуориметрия используется для определения пролиферации опухолевых клеток, что может помочь в оценке прогноза пациентов с раком молочной железы и другими злокачественными новообразованиями. Также эта технология используется для подбора

органов для трансплантации, выделения человеческих хромосом для создания генетических библиотек. Проточные цитометры в современных лабораториях клинической гематологии выполняют подсчет эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов в крови. Анализ иммунных клеток методом проточной цитометрии также часто используется для определения количества T_h , что необходимо для мониторинга течения и рецидива ВИЧ-инфекции [18]. Наконец, количественная оценка чрезвычайно редких $CD34^+$ эндотелиальных клеток-предшественниц в крови представляет собой новый метод прогнозирования клинических исходов у пациентов с заболеваниями сосудов и сердечно-сосудистой системы [19].

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ПОДГОТОВКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ

Чаще всего для анализа иммунных клеток используется цельная кровь, либо выделенные из нее отдельные фракции клеток, такие как мононуклеарные клетки. Протокол иммунофенотипирования клеток в образце цельной крови позволяет сократить общее число манипуляций с образцом к минимуму, тем самым сохраняя структуру и функции клеток, а также снижая потерю клеток. Образцы цельной крови, окрашенные антителами к маркерам клеточной поверхности, можно анализировать непосредственно на проточном цитометре. Чтобы облегчить этот анализ, эритроциты в образце цельной крови могут быть лизированы после окрашивания антителами. Отношение эритроцитов к мононуклеарам в цельной крови составляет примерно 600:1 (в зависимости от образца и вида), поэтому присутствие эритроцитов может затруднить наблюдение редких клеточных событий, и потребовать запись большего числа событий. Однако для анализа распространённых популяций использование цельной крови может быть более целесообразным.

Зачастую, для анализа иммунных клеток из цельной крови выделяют фракцию мононуклеарных клеток из периферической крови (МКПК). МКПК состоят из лимфоцитов (В клеток, Т-клеток и НК клеток), моноцитов и дендритных клеток. Для выделения МКПК чаще всего используется метод разделения компонентов крови центрифугированием относительно среды с высокой плотностью, такой как Ficoll-Paque[®], Histopaque[®]-1077 и т.д. Однако использование среды высокой плотности требует осторожного обращения во избежание непреднамеренного вмешательства, смешивания слоев и, следовательно, может привести к широкому разбросу результатов, разнящихся от выделения к выделению. Однако такой метод позволяет более точно выделять популяции МКПК и обнаруживать маленькие популяции иммунных клеток при меньшем количестве анализируемого материала.

2.1 Окрашивание цельной крови человека

1. Цельную кровь из периферической вены соберите в пробирки, содержащие антикоагулянт (например, 1 мкл 10 % Трикале этилендиаминтетрауксусная кислоты (англ. Tricale of ethylenediaminetetraacetic acid, K3 EDTA) на 100 мкл цельной крови).

2. Сделайте аликвоты цельной крови в 1,5 мл пробирки типа Эппендорф по 100 мкл на окрашивание одной панелью. Также одну аликвоту крови оставьте в качестве неокрашенного контроля.

3. Добавьте заранее подготовленный коктейль антител, либо каждое антитело отдельно (0,1–10 мкг/мл), к аликвоте цельной крови.

4. Инкубируйте кровь с антителами в течение 30–60 минут в темноте при комнатной температуре либо при 2–8 °С.

5. После инкубации промойте образец крови, добавив в пробирку 1–2 мл буфера для окрашивания клеток (англ. cell staining buffer, CSB) (Cell Staining Buffer, Кат. №420201, BioLegend, США). CSB чаще всего представляет собой фосфатно-солевой буфер, содержащий 5–10 % инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки и 0,1 % азиды натрия NaN_3 .

6. Центрифугируйте суспензию клеток при $500 \times g$ в течение 5 минут при 4 °С. Удалите супернатант.

7. Повторите шаги 5–6.

8. Ресуспендируйте клетки в 500 мкл CSB.

9. Отфильтруйте суспензию клеток через ситечко с диаметром пор 0,45 мкм, чтобы удалить крупный мусор и конгломераты клеток.

10. (Опционально) Лизируйте эритроциты.

10.1 На 100 мкл цельной крови добавьте 2 мл буфера для лизиса эритроцитов. Лизис эритроцитов упрощает выделение популяций во время анализа на проточном цитометре, хотя потенциально может нарушить нормальное функционирование иммунных клеток.

10.2 Инкубируйте смесь 5–15 минут при комнатной температуре, в защищенном от света месте.

10.3 Отмойте клетки от буфера для лизиса эритроцитов, повторив шаги 5–6.

11. Проанализируйте флуоресценцию образцов на проточном цитометре, оборудованном соответствующими фильтрами.

2.2 Выделение и окрашивание мононуклеарных клеток из периферической крови человека

1. Цельную кровь из периферической вены соберите в пробирки, содержащие антикоагулянт (например, 1 мкл 10 % КЗ EDTA на 100 мкл цельной крови).

2. Разведите цельную кровь фосфатно-солевым раствором Дульбекко (англ. Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS)

(Кат. №P060п, ПанЭко, Россия) или физиологическим раствором (0,9 % раствор NaCl, Кат. №P010п, ПанЭко, Россия) в соотношении 1:1 в 50 мл центрифужной пробирке. При этом нужно учитывать, что кровь содержит антикоагулянт и образец лишь частично состоит из крови.

3. В 50 мл центрифужную пробирку налейте 1 часть фиколла плотностью 1,077 г/мл (Кат. №P050, ПанЭко, Россия) и аккуратно, при помощи автоматического дозатора, наложите равный объем разведенной крови (рисунок 2А). Не следует заполнять пробирку целиком, иначе разделение на фракции будет менее четким.

4. Центрифугируйте кровь с фиколлоу при 2000 об/мин в течение 20 минут без торможения. Для этого можно за 30 секунд до конца центрифугирования выключить центрифугу из сети. В результате должно получиться четкое разделение крови на три фракции: эритроциты (нижняя фракция), мононуклеарные клетки (средняя фракция) и плазма (верхняя фракция) (рисунок 2Б).

5. Соберите фракцию мононуклеарных клеток в отдельную 50 мл центрифужную пробирку и ресуспендируйте в растворе DPBS или физиологическом растворе в соотношении 1:2.

6. Центрифугируйте смесь при 1400 об/мин в течение 15 минут без торможения.

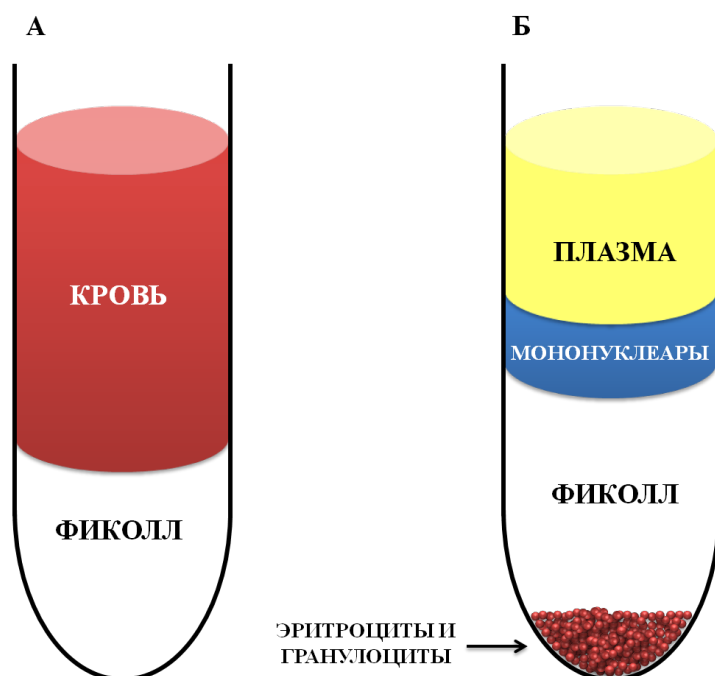


Рис. 2. Этапы выделения мононуклеарных клеток в градиенте плотности фиколла. А – наслаивание крови на раствор фиколла. Б – разделение крови после центрифугирования на три фракции: плазма, мононуклеары и эритроциты

7. Осторожно удалите супернатант, не задев осадок клеток.
8. Ресуспендируйте клетки в 5 мл буфера для лизиса эритроцитов и инкубируйте в течение 3–5 минут.
9. Центрифугируйте смесь при 1400 об/мин в течение 5 минут.
10. Осторожно удалите супернатант, не задев осадок.
11. Ресуспендируйте клетки в 10 мл DPBS или физиологического раствора и повторно центрифугируйте смесь при 1400 об/мин в течение 5 минут.
12. Ресуспендируйте клетки в 500 мкл CSB.
13. Разделите смесь клеток в 1,5 мл пробирки типа Эппендорф по 100 мкл на окрашивание одной панелью. Также одну аликвоту клеток оставьте в качестве неокрашенного контроля.
14. Добавьте заранее подготовленный коктейль антител, либо каждое антитело отдельно.
15. Инкубируйте клетки в течение 30–60 минут при комнатной температуре, в защищенном от света месте.
16. После инкубации промойте образец клеток, добавив в каждую пробирку по 1–2 мл буфера CSB.
17. Центрифугируйте смесь при $500 \times g$ в течение 5 минут при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Удалите супернатант.
18. Повторите шаги 16–17.
19. Ресуспендируйте клетки в 500 мкл CSB.
20. Проанализируйте флуоресценцию образцов на проточном цитометре.

ГЛАВА 3. СТРАТЕГИИ ГЕЙТИНГА РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ИММУННЫХ КЛЕТОК

Анализ данных проточного цитометра основан на принципе гейтирования. Гейты размещаются вокруг популяций клеток с общими характеристиками, такими как FSC, SSC и флуоресценция поверхностных маркеров, чтобы исследовать и количественно оценить эти представляющие интерес популяции.

Перед тем, как начать любой эксперимент с проточным цитометром, по возможности, рекомендуется узнать как можно больше о клетках (размер, зернистость клеток, которая определяется плотностью органелл в цитоплазме клетки) и изменении этих параметров в течение эксперимента. Это может быть особенно полезно, если вы выполняете внутриклеточное окрашивание, поскольку процесс фиксации и пермеабилзации (изменение проницаемости мембраны клетки) может изменить размер и зернистость клеток, что приведет к изменению профилей FSC и SSC. Также необходимо узнать профиль экспрессии поверхностных маркеров для того, чтобы можно было идентифицировать интересующие вас клетки. И наоборот, информация об отсутствии экспрессии того или иного CD (англ. cluster of differentiation) маркера также может помочь, позволяя вам установить отрицательные гейты и определить популяцию.

Первым шагом в гейтинге обычно является разделение популяций клеток на основе их профиля FSC и SSC. FSC и SSC дают оценку размера и зернистости клеток, соответственно, хотя это может зависеть от нескольких факторов, таких как образец, длина волны лазера, угол сбора и показатель преломления образца и проточной жидкости. Выделение популяций клеток может быть относительно простым для линий клеток, где есть только один тип клеток, но может быть более сложным для образцов, где имеется несколько типов клеток. Как видно на рисунке 3А (логарифмическая шкала), цельная кровь, в которой лизированы эритроциты, имеет несколько различных популяций. Характер светорассеяния гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов позволяет отличить их от клеточного мусора и друг от друга. Лейкоциты выделены квадратом на рисунке 3Б. Также обратите внимание на то, как меняется расположение популяций при использовании линейной шкалы на рисунке 3Б. Обломки и мертвые клетки часто имеют более низкий уровень FSC и находятся в нижнем левом углу графика. Порог FSC может быть увеличен, чтобы эти события не

отображались на графике, или они могут быть удалены путем гейтирования интересующих популяций. В случае анализа параметров FSC и SSC МКПК, видно (рисунок 4), что число гранулоцитов/моноцитов может быть значительно меньше по сравнению с цельной кровью. Однако популяция лимфоцитов более четко выделена и может быть эффективно отделена от других типов клеток. Выделение по размеру и зернистости лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов является первым шагом для выделения более узких популяций.

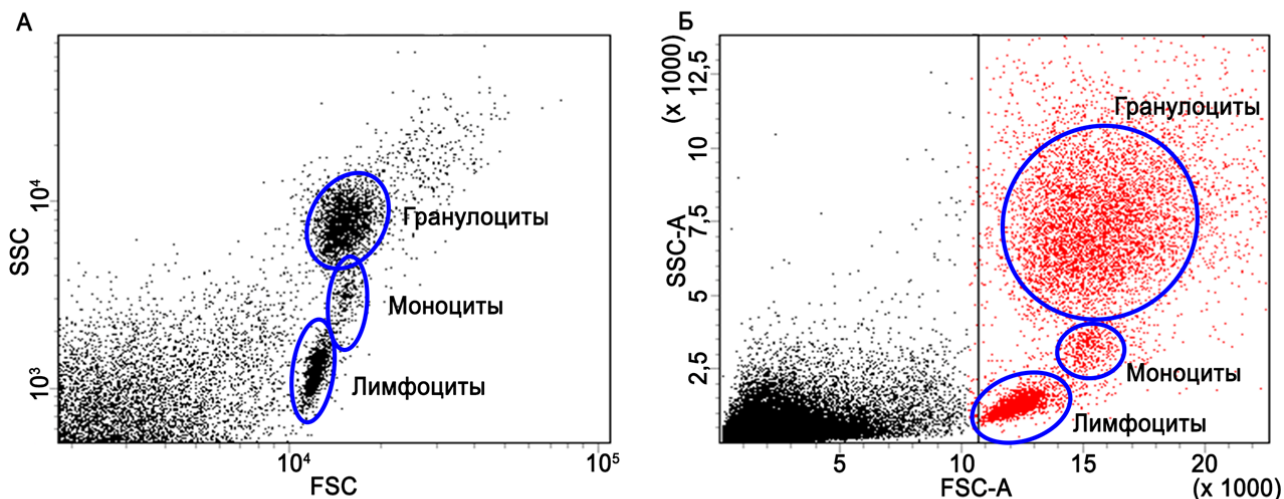


Рис. 3. Цельная кровь (А), в которой лизированы эритроциты, имеет несколько четко различимых популяций (лимфоциты, моноциты и гранулоциты), которые можно отделить от эритроцитов путем гейтирования (Б)

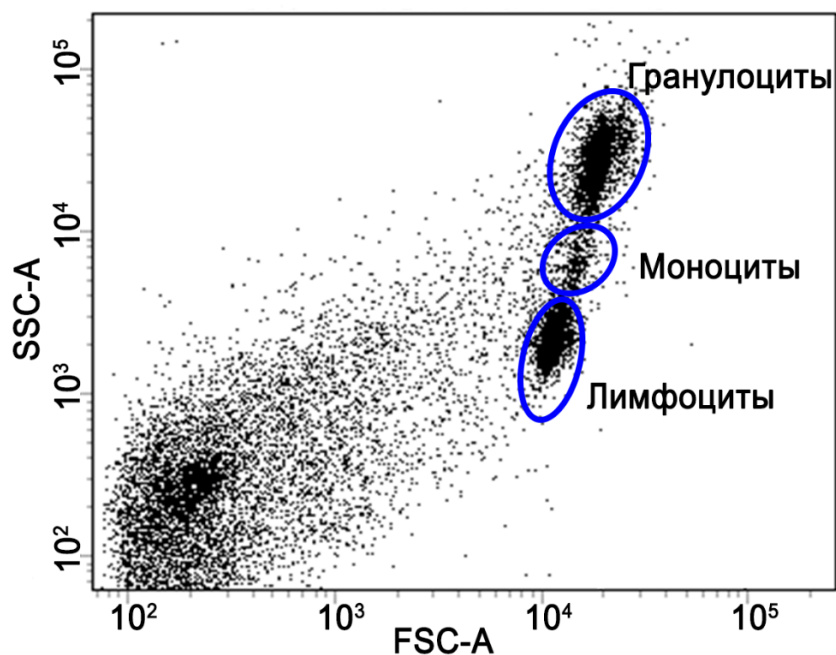


Рис. 4. Популяции лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов в МКПК, выделенных из цельной крови в градиенте плотности фиколла

Следующим шагом является анализ экспрессии специфических маркеров в выделенной популяции. На рисунке 5 кровь окрашивали антителами против CD3 и отображали данные в виде гистограмме, содержащей данные только о выделенной заранее по размеру популяции лимфоцитов. По оси Y отображается число событий (то есть число отдельных клеток), по оси X отображается интенсивность флуоресценции флуорофора, конъюгированного с антителом против CD3. Как можно видеть, есть два пика, которые можно интерпретировать как положительная по CD3 и отрицательная по CD3 популяции клеток в гейте лимфоцитов.

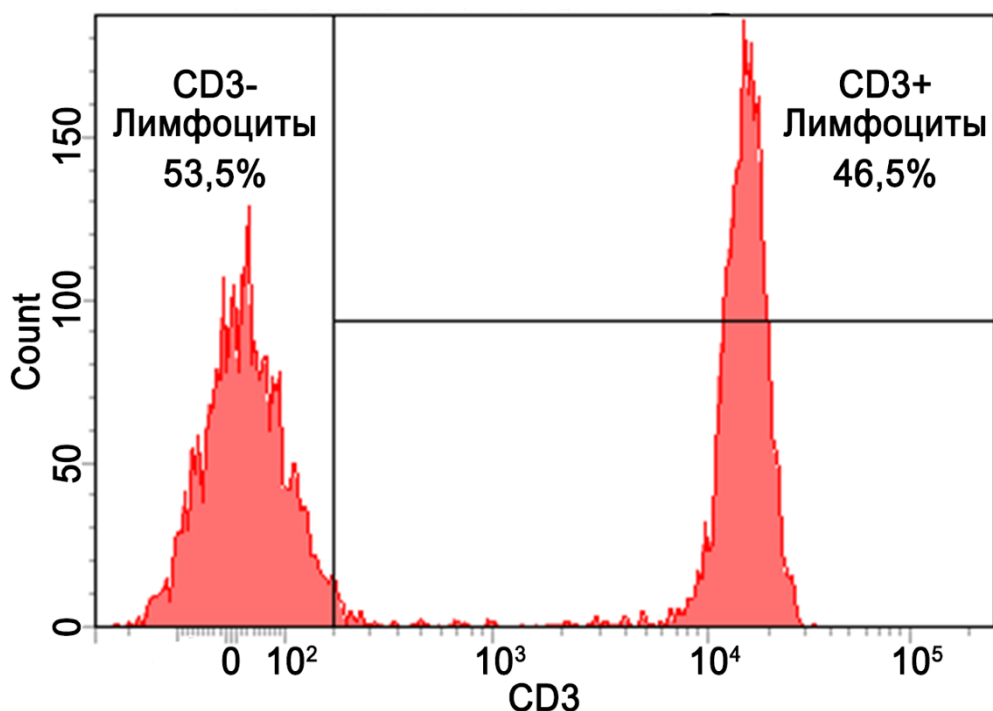


Рис. 5. Гистограмма, иллюстрирующая популяции лимфоцитов, отрицательных (слева) и положительных (справа) по CD3

Для дальнейшего анализа CD3⁺ лимфоциты также могут быть проанализированы на присутствие других маркеров, характерных для более узких популяций Т-клеток. На рисунке 6 показаны графики, отображающие сразу два параметра интенсивности флуоресценции, один по оси X, а другой по оси Y, а события отображаются в виде точечного графика. Для отображения также можно выбрать параметры FCS или SSC в зависимости от того, что вы хотите показать. Выделенная до этого популяция CD3⁺ Т-клеток, также была окрашена антителами к CD4 и CD8 для идентификации популяций Th и Т-киллеров, соответственно. В данном случае популяции могут быть четко разделены на положительные только по одному маркеру, а

также двойные отрицательные, двойные положительные. Таким образом, в родительской популяции $CD3^+$ Т-клеток можно определить число $CD4^+CD8^-$ Th и $CD4^-CD8^+$ Т-киллеров.

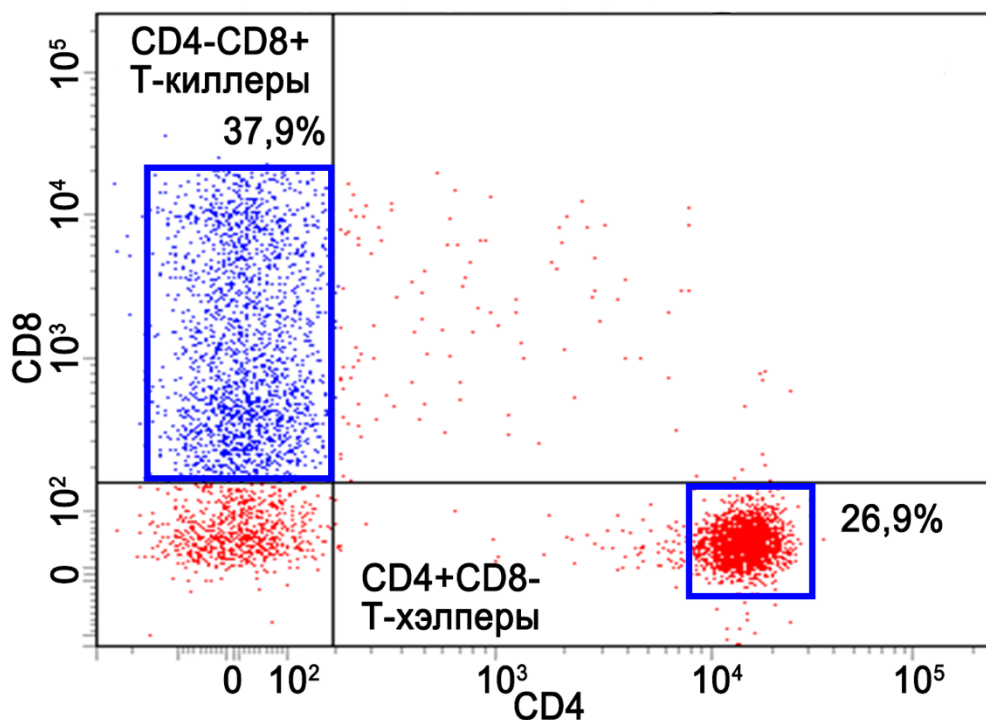


Рис. 6. Точечный график, иллюстрирующий популяции $CD4^+CD8^-$ (Th) и $CD4^-CD8^+$ лимфоцитов (Т-киллеры)

Этот простой принцип гейтирования можно применять снова и снова для дальнейшего выделения более узких популяций. Количество антител с различными флуорофорами, используемых для окрашивания клеток, зависит от возможностей прибора. Однако даже самые базовые проточные цитометры на сегодняшний день способны собирать данные о флуоресценции большого числа различных флуоресцентных молекул, что позволяет эффективно отделять большое число популяций иммунных клеток в одном эксперименте.

Однако, когда одна клетка помечена двумя или более флуорохромами, добавление яркости одного флуорохрома к другому создает значительный фоновый шум и может влиять на силу сигнала. Поэтому, важной деталью при проведении эксперимента с использованием большого числа красителей является необходимость процесса коррекции перекрытия сигналов разных флуорохромов – компенсация. Компенсация может быть выполнена с помощью различного программного обеспечения прибора либо сторонник программ.

3.1 Стратегия гейтирования для выделения хэлперных Т-клеток

Т-клетки, которые несут на своей поверхности Т-клеточный рецептор (CD3), являются основными участниками адаптивного иммунного ответа и обычно классифицируются на функциональные подтипы в зависимости от экспрессии маркеров CD или степени дифференцировки (наивные, активированный, клетки памяти) [20]. В процессе созревания в тимусе CD3⁺ Т-клетки приобретают маркеры CD4 или CD8 [21]. CD4⁺ Th делятся на различные подмножества: Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tregs и фолликулярные хэлперные Т-клетки (англ. follicular Th, Tfh), которые характеризуются разными профилями экспрессии CD-маркеров и их функциями в иммунной системе [22]. Th1 могут усиливать представление антигена и пролиферацию эффекторных CD8⁺ Т-клеток или активировать макрофаги для фагоцитоза внутриклеточных бактерий и простейших посредством выделения интерферона γ [23,24]. Большинство Th1 клеток являются CXCR3⁺ (С-Х-С рецептор хемокина 3, англ. С-Х-С chemokine receptor type 3; CD183) и CCR4⁻ (С-С-рецептор хемокина 4, англ. С-С chemokine receptor type 4; CD194), а также экспрессируют CCR2, CCR5 и CXCR6 в активированном состоянии [25].

Клетки Th2 опосредуют активацию и поддержание гуморального или опосредованного антителами иммунного ответа против внеклеточных паразитов, бактерий, аллергенов и токсинов. Th2 клетки активируют эозинофилы, базофилы и тучные клетки для борьбы с паразитами, а также стимулирует В клетки к выработке антител IgE [26]. Почти все Th2 клетки являются CCR4⁺ и CXCR3⁻ [25], а также могут синтезировать CCR3 [27] и CCR8 на своей поверхности [28].

Клетки Th17 играют роль в защите хозяина от внеклеточных патогенов, особенно в слизистых оболочках и эпителии. Th17 клетки способны привлекать нейтрофилы, которые первыми реагируют при различных инфекциях и травмах [29]. В основном, клетки Th17 отделяются по присутствию маркера CCR6, затем можно различить две популяции клеток CCR6⁺ Th17. CCR6⁺CCR4⁺ Th17 клетки продуцируют больше IL-17, а также IL22 [30] и способны подавлять активность CD8⁺ Т-клеток [31]. Другая популяция клеток, CCR6⁺CXCR3⁺ Th17, вырабатывают меньше IL-17, но также синтезируют IFN- γ [30]. Клетки Th17 также обладают повышенной экспрессией рецепторов IL-1, IL-6 и IL-23, которые необходимы для их дифференцировки [32,33].

Антитела, необходимые для выделения популяций Th1, Th2 и Th17:

- Анти-CD3 антитело (например, PE/Cy7 anti-human CD3 antibody, Кат. №300420, BioLegend, США)
- Анти-CD4 антитело (например, Pacific Blue anti-human CD4 antibody, Кат. №317429 BioLegend, США)
- Анти-CD8 антитело (например, FITC anti-human CD8a antibody, Кат. №300906, BioLegend, США)
- Анти-CCR6 антитело (например, PE anti-human CD196 (CCR6) antibody, Кат. №353410, BioLegend, США)
- Анти-CXCR3 антитело (например, APC anti-human CD183 (CXCR3) antibody, Кат. №353708, BioLegend, США)

Стратегия гейтирования МКПК для выделения популяций Th1, Th2 и Th17 отражена на рисунке 7.

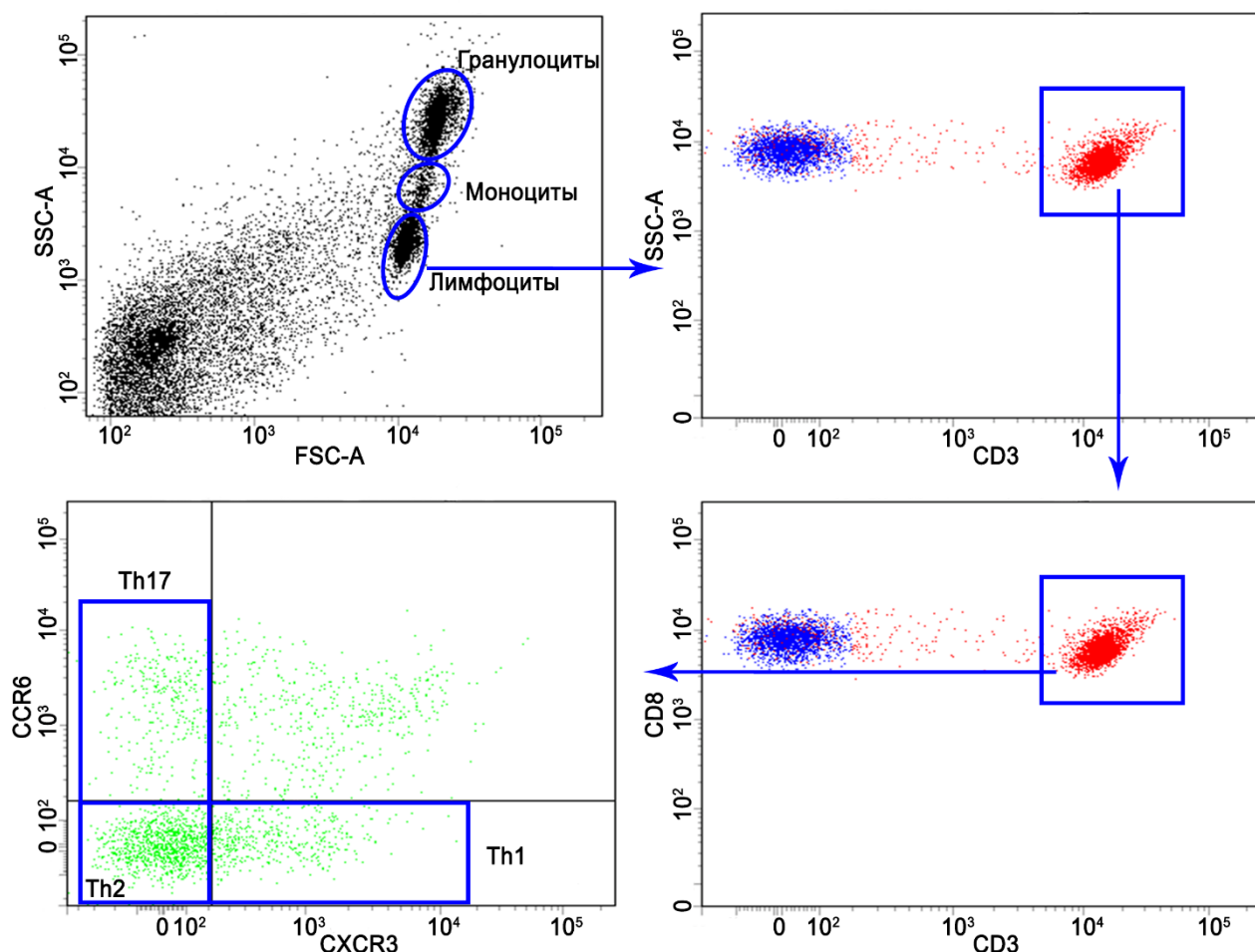


Рис. 7. Стратегия гейтирования популяций $CD3^+CD4^+CD8^-CCR6^-CXCR3^+$ Th1 клетки, $CD3^+CD4^+CD8^-CCR6^+CXCR3^+$ Th2 клеток и $CD3^+CD4^+CD8^-CCR6^+CXCR3^-$ Th17 клеток

3.2 Стратегия гейтирования для выделения Tregs

Tregs представляют собой специализированную субпопуляцию Т-клеток, которые способны подавлять иммунный ответ, за счет супрессии пролиферации Т-клеток и продукции ими цитокинов и играют решающую роль в предотвращении аутоиммунитета. Tregs являются одним из наиболее распространенных фенотипов Т-клеток [34]. Их можно обнаружить по экспрессии CD25, рецептора IL-2, и фактора транскрипции FOXP3 [35]. Поскольку FOXP3 локализован внутриклеточно, часто для упрощения анализа популяции Tregs используется CD127, который экспрессируется на поверхности клеток с низкой молекулярной плотностью (CD127^{low}) [36].

Антитела, необходимые для выделения популяции Tregs:

- Анти-CD3 антитело (например, PE/Cy7 anti-human CD3 antibody, Кат. №300420, BioLegend, США)
- Анти-CD4 антитело (например, Pacific Blue anti-human CD4 antibody, Кат. №317429 BioLegend, США)
- Анти-CD8 антитело (например, FITC anti-human CD8a antibody, Кат. №300906, BioLegend, США)
- Анти-CD25 антитело (например, APC anti-human CD25 antibody Кат. №302610, BioLegend, США)
- Анти-CD127 антитело (например, PE anti-human CD127 (IL-7R α) antibody, Кат. №351304, BioLegend, США)

Стратегия гейтирования МКПК для выделения популяции Tregs отражена на рисунке 8.

3.3 Стратегия гейтирования для выделения цитотоксических Т-клеток (Т-киллеров)

Цитотоксические Т-клетки, часто называемые CD8⁺ Т-киллерами, являются важным компонентом адаптивной иммунной системы и играют важную роль в защите от внутриклеточных патогенов, таких как вирусы и бактерии, а также от опухолей [37]. Наивные CD8⁺ Т-клетки распознают антигены, представленные молекулами МНС-I, и при активации становятся цитотоксическими CD8⁺ Т-клетками, способными убивать таргетные клетки посредством высвобождения гранул, содержащих перфорины и гранзимы, или индукции апоптоза через Fas-лиганд (CD95) [38].

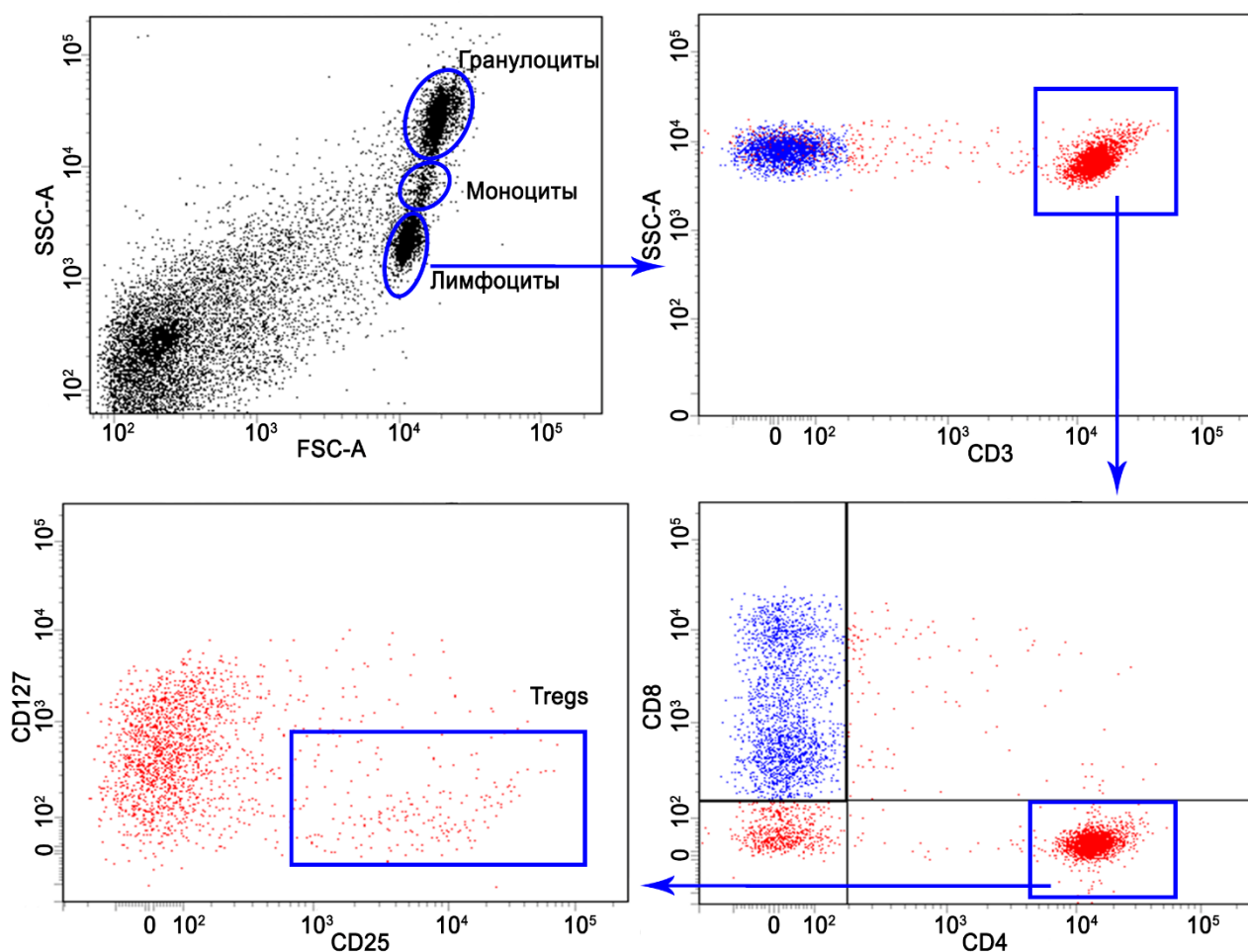


Рис. 8. Стратегия гейтирования популяции $CD3^+CD4^+CD8^-CD25^+CD127^{low}$ Tregs

Активация наивных $CD8^+$ Т-клеток начинается со связывания CD3 на поверхности Т-клеток с комплексом МНС-I-белок на поверхности антигенпрезентирующей клетки. Кроме того, CD28, расположенный на поверхности $CD8^+$ Т-клетки, распознает костимуляторные белки B7 (CD80 и CD86) на поверхности DCs, а CXCR3, экспрессируемый на Т-клетке, связывается с хемокинами CXCL9 и CXCL10, продуцируемыми DCs [39]. Далее, в процессе активации, на поверхности Т-киллеров появляются различные маркеры, самые ранние маркеры активации (12 часов) – это CD69 и CD25 [40]. Экспрессия CD38 и HLA-DR связана с поздней активацией (1 день и 3–5 дней, соответственно) [41,42].

Антитела, необходимые для выделения популяции активированных Т-киллеров:

- Анти-CD3 антитело (например, PE/Cy7 anti-human CD3 antibody, Кат. №300420, BioLegend, США)

- Анти-CD4 антитело (например, Pacific Blue anti-human CD4 antibody, Кат. №317429 BioLegend, США)
- Анти-CD8 антитело (например, FITC anti-human CD8a antibody, Кат. №300906, BioLegend, США)
- Анти-CD38 антитело (например, PerCP/Cy5.5 anti-human CD38 antibody, Кат. №356614, BioLegend, США)
- Анти-HLA-DR антитело (например, PE anti-human HLA-DR antibody, Кат. №307605, BioLegend, США)

Стратегия гейтирования МКПК для выделения популяции активированных Т-киллеров отражена на рисунке 9.

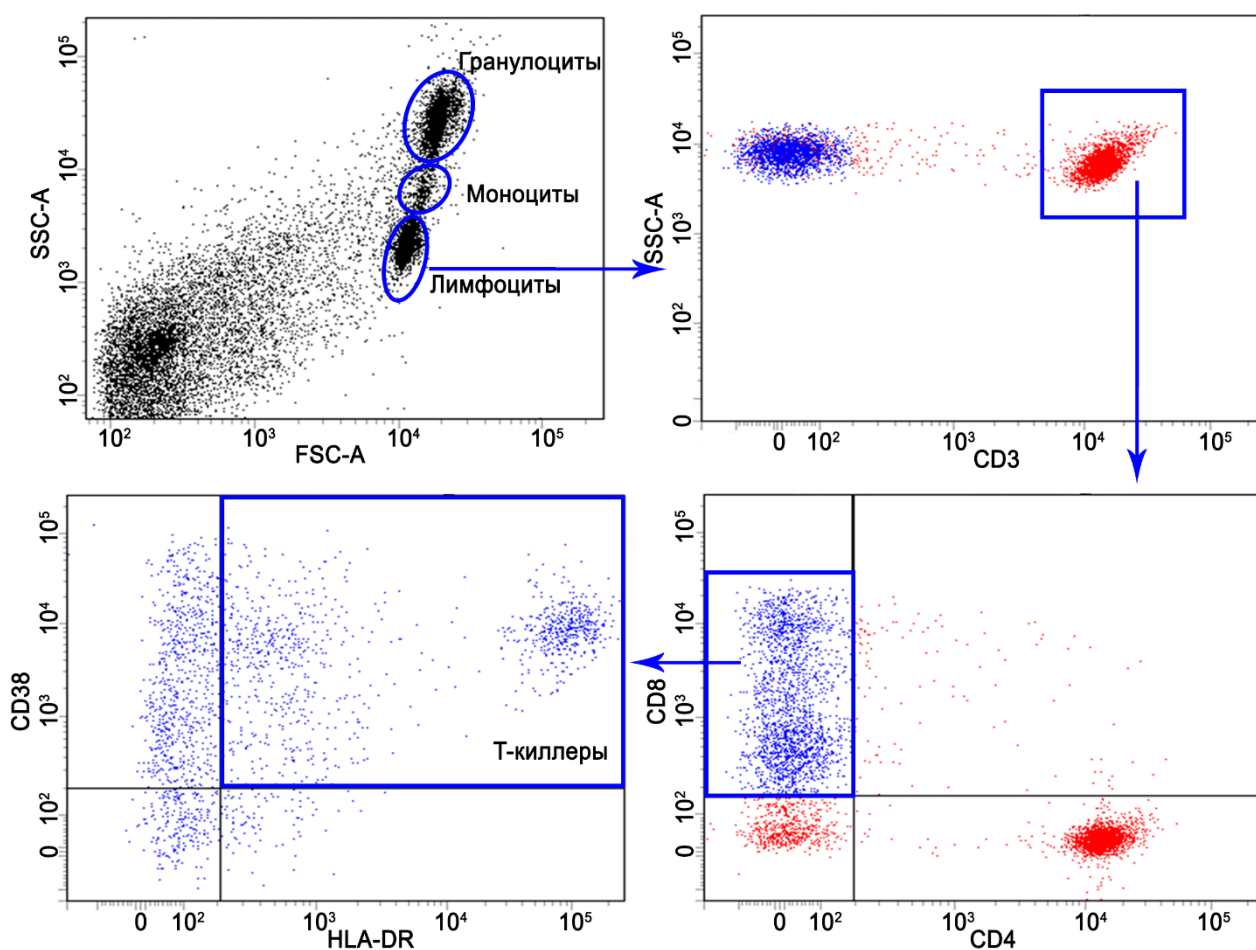


Рис. 9. Стратегия гейтирования популяции $CD3^+CD8^+CD4^-CD38^+HLA-DR^+$ активированных Т-киллеров

3.4 Стратегия гейтирования для выделения натуральных киллеров (NK клеток)

NK клетки являются важными участниками врожденного иммунного ответа, поскольку они обнаруживают молекулы МНС, присутствующие на поверхности всех ядерных клеток организма.

НК клетки секретируют перфорины и гранзимы, чтобы вызвать апоптоз клеток, которые имеют аномальную или измененную экспрессию МНС-I [43]. Обычно НК клетки экспрессируют CD56 в отсутствие CD3 (Т-клеточного рецептора). В зависимости от поверхностной плотности экспрессии CD56 НК клетки можно разделить на две популяции – НК клетки с высокой плотностью экспрессии CD56 (CD56^{high} НК клетки) и НК клетки с низкой плотностью экспрессии CD56 (CD56^{low}) [44].

CD56^{dim} НК клетки, которые также обладают высокой экспрессией CD16 (CD16^{low}), обладают цитотоксической функцией и содержат большое количество перфорины [45]. CD56^{high}CD16[±] НК клетки характеризуются низким уровнем перфорины и, в основном, специализируются на продукции цитокинов, преимущественно IFN- γ , который необходим для созревания дендритных клеток [46].

Антитела, необходимые для выделения популяции эффекторных и регуляторных НК клеток:

- Анти-CD3 антитело (например, PE/Cy7 anti-human CD3 antibody, Кат. №300420, BioLegend, США)
- Анти-CD56 антитело (например, PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD56 (NCAM) antibody, Кат. №362506, BioLegend, США)

Стратегия гейтирования МКПК для выделения популяции эффекторных и регуляторных НК клеток отражена на рисунке 10.

3.5 Стратегия гейтирования для выделения НКТ-клеток

НКТ-клетки представляют собой группу клеток, которые играют важную роль в связывании врожденного и адаптивного иммунитета, поскольку они обладают характеристиками, как обычных Т-клеток, так и НК клеток [47]. НКТ-клетки созревают в тимусе и приобретают специфические Т-клеточные рецепторы, которые могут распознавать липидные, а не белковые молекулы, представленные МНС-I-подобными молекулами CD1d [48]. Обычно НКТ-клетки делятся на две большие группы в зависимости от структуры цепей Т-клеточного рецептора и их способности связываться с молекулами липидов. НКТ-клетки типа I связываются с общим прототипом липидов, α -галактозилцерамидом (α -GalCer) [49].

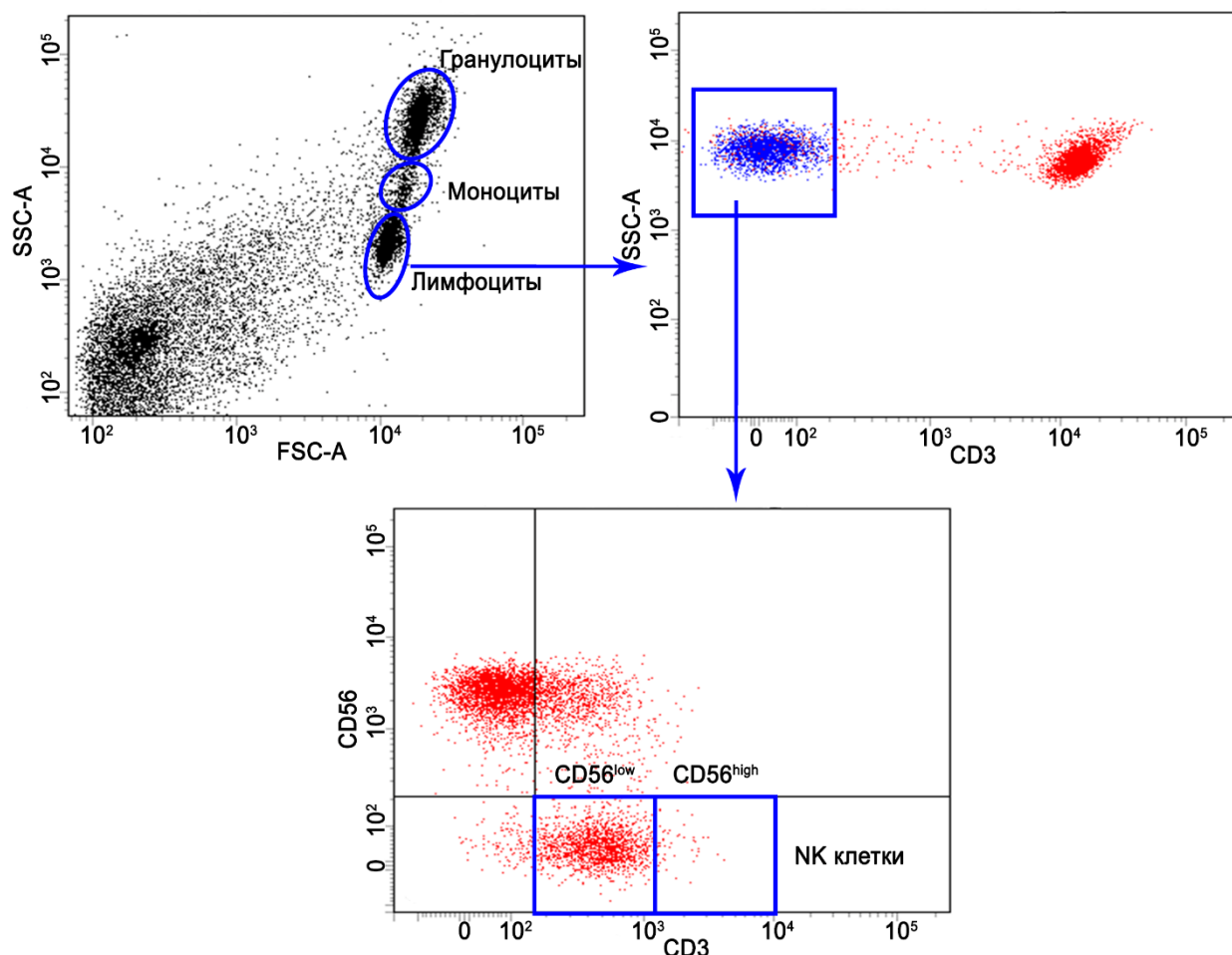


Рис. 10. Стратегия гейтирования популяций $CD3-CD56^{high}$ и $CD3-CD56^{low}$ NK клеток

Примечательной деталью является то, что НКТ-клетки I типа экспрессируют CD4 и CD8 в широком диапазоне в зависимости от донора. Например, неонатальные НКТ-клетки преимущественно ($> 90\%$) являются $CD4^+$, тогда как НКТ-клетки из периферической крови взрослого человека являются могут быть как $CD4^+$, так и $CD4^-$. То же самое можно сказать и о типичных маркерах НК клеток, CD56 и CD161, которые экспрессируются на НКТ-клетках в разном количестве. Присутствие маркеров НК-клеток и Т-клеток усложняет задачу отделения НКТ-клеток от других популяций лимфоцитов. Для того, чтобы точно выделить эту популяцию клеток, необходимо использовать конъюгированные с флуоресцентным красителем липидные тетрамеры α -GalCer, которые будут избирательно связываться с TCR, расположенных на НКТ-клетки I типа [50].

Однако, в рутинном анализе соотношения различных популяций лимфоцитов, число НКТ-клеток разных типов редко является целью исследования. Поэтому зачастую по позитивной экспрессии как CD3,

так и CD56 маркеров, выделяют так называемые НКТ-подобные клетки.

Антитела, необходимые для выделения популяции НКТ клеток:

- Анти-CD3 антитело (например, PE/Cy7 anti-human CD3 antibody, Кат. №300420, BioLegend, США)
- Анти-CD56 антитело (например, PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD56 (NCAM) antibody, Кат. №362506, BioLegend, США)

Стратегия гейтирования МКПК для выделения популяции НКТ-клеток отражена на рисунке 11.

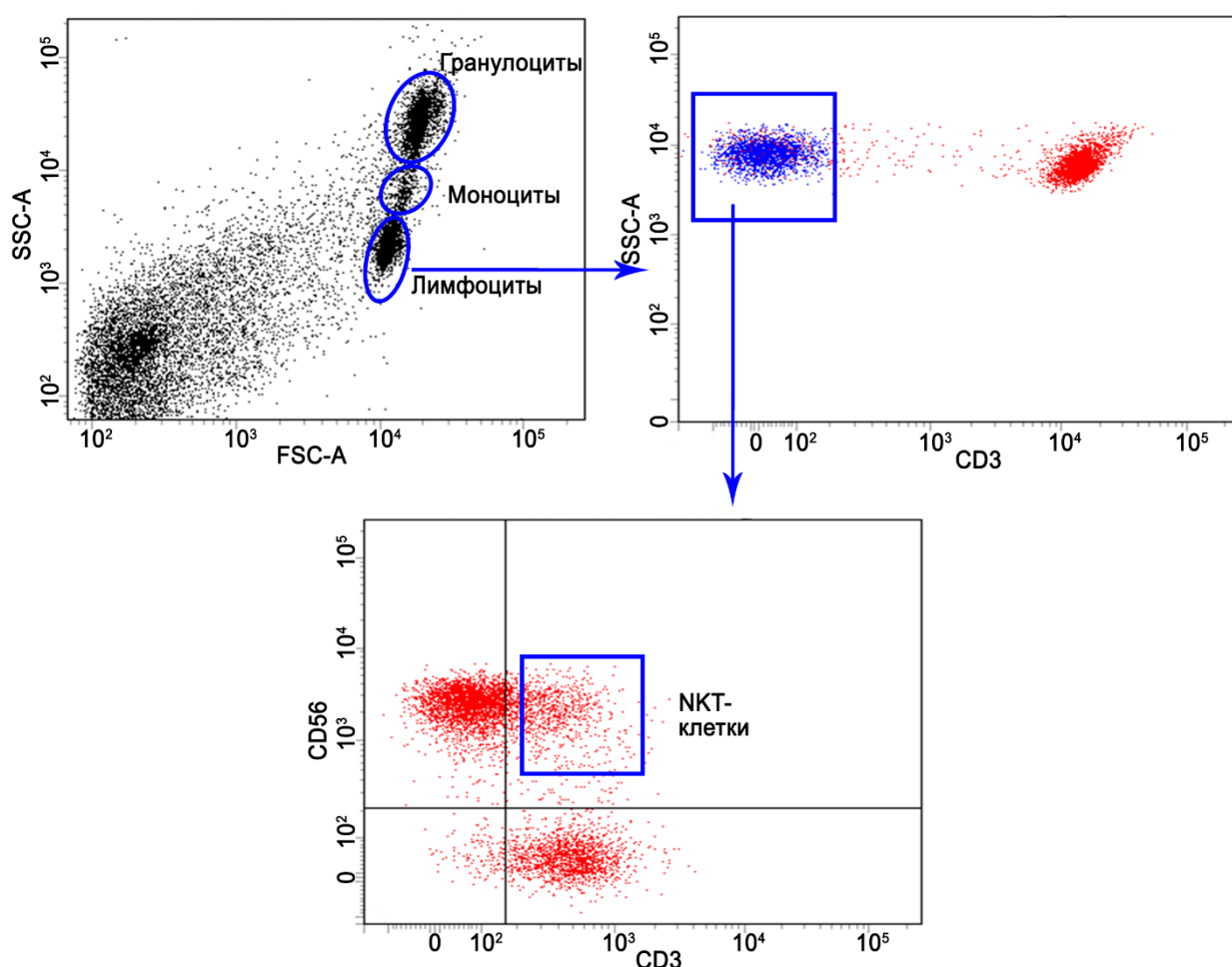


Рис. 11. Стратегия гейтирования популяций CD3⁺CD56⁺ НКТ-клеток

3.6 Стратегия гейтирования для выделения В клеток

В клетки созревают в костном мозге и попадают в периферическую кровь в виде переходных В клеток, которые несут типичные В клеточные маркеры CD19 и CD20, а также CD5⁺, CD38^{high}, CD27⁻. Эта популяция В клеток может дифференцироваться на фолликулярные

(англ. follicular, FO), маргинальные (англ. marginal zone, MZ) и регуляторные В клетки (англ. regulatory B cells, Bregs). CD19⁺CD20⁺CD21⁺CD22⁺CD23⁺CD24⁺CD10⁻CD27⁻ FO В клетки могут активироваться после стимуляции антигеном и дифференцироваться в эффекторные клетки. После связывания с антигеном В клетки связываются с Th1-клетками через комплекс МНС-пептид, В7 и CD40 на поверхности В клеток. Такие активированные CD19⁺CD20⁺CD25⁺CD27⁺CD30⁺CD69⁺CD80⁺CD88⁺ В клетки могут стать короткоживущими CD19^{low}CD20⁻CD27⁺CD38^{high}CD69⁺CD138⁺ плазматическими клетками, которые секретируют специфические антитела или образуют зародышевые центры (англ. germinal centre, GC) в лимфатических узлах и селезенке.

GC представляют собой временные образования, в которых активированные CD10⁺CD19⁺CD20⁺CD27⁻CD33⁺CD38^{high} В клетки продолжают свое созревание и могут развиваться в долгоживущие CD19⁺CD20⁺CD27⁺CD38⁻CD40⁺CD23^{low} клетки памяти. Другой значимой популяцией В клеток являются CD1c⁺CD19⁺CD20⁻CD21^{high}CD27^{var} В клетки MZ, которые распознают независимые от Т-клеток углеводные и фосфолипидные антигены и продуцируют мультиреактивные антитела IgM [51], обеспечивая быстрый ответ на независимые от Т-клеток антигены. Bregs подразделяются на две субпопуляции: CD1d^{high}CD5⁺ Bregs, которые стимулируют развитие Tregs, оказывая ингибирующее влияние на CD8⁺ Т-клетки; CD24^{high}CD38^{high} Bregs, оказывающие ингибирующее воздействие на CD4⁺ Т-клетки [52].

Антитела, необходимые для выделения популяции В клеток:

- Анти-CD19 антитело (например, PE/Cy5 anti-human CD19 antibody, Кат. №302210, BioLegend, США)
- Анти-CD10 антитело (например, PE anti-human CD10 antibody, Кат. №320330, BioLegend, США)
- Анти-CD20 антитело (например, Brilliant Violent 421TM anti-human CD20 antibody, Кат. №312203, BioLegend, США)
- Анти-CD56 антитело (например, Pacific BlueTM anti-human CD56 antibody, Кат. №362520, BioLegend, США)

Стратегия гейтирования МКПК для выделения популяции В клеток отражена на рисунке 12.

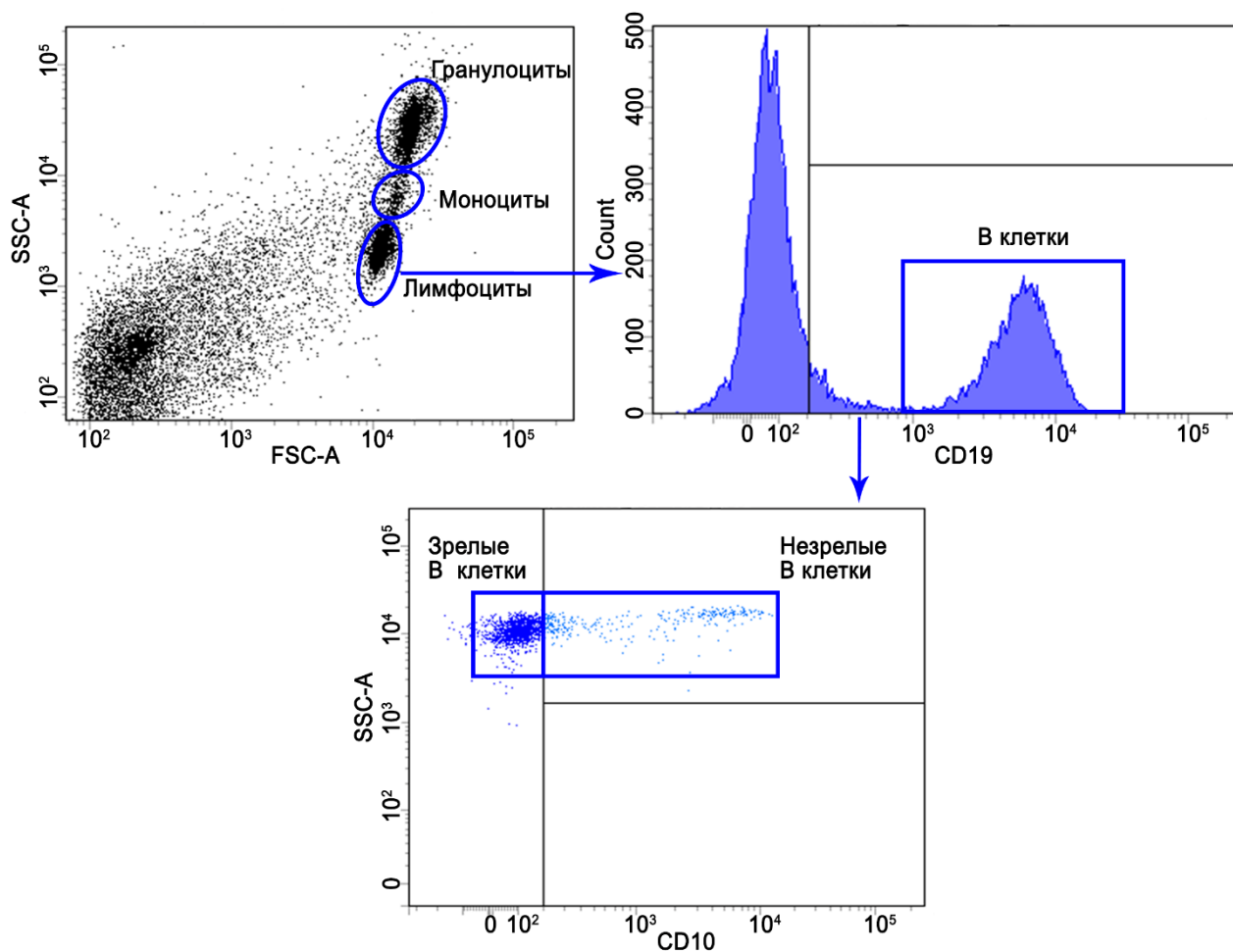


Рис. 12. Стратегия гейтирования популяций $CD19^+CD10^-$ незрелых В клеток и $CD19^+CD10^+$ зрелых В клеток

3.7 Стратегия гейтирования для выделения дендритных клеток

DCs играют ключевую роль в связывании врожденного и адаптивного иммунитета. Различают несколько субпопуляций DCs, выполняющих важные функции в иммунном ответе [53]. Как уже было описано выше DCs происходят от СМР. При экспрессии фактора транскрипции Nur77 СМР развиваются в моноциты, и при воспалении в организме они могут дифференцироваться в $CD1a^+CD1c/BDC A-1^+CD11c^+CD64^+$ моноцитарные DCs (англ. monocyte-derived dendritic cells, moDCs). И в отсутствие этого фактора СМР дифференцируются в СДР. Дальнейшее развитие из СДР приводит либо к появлению $CD11c^-CD123^{high}$ плазмоцитоподобных DCs (англ. plasmacytoid dendritic cells, pDCs), либо к обычным $CD11c^+CD123^{low}$ DCs (англ. conventional dendritic cells, cDCs) [9].

cDCs принадлежат к миелоидной линии и подразделяются на резидентные $CD1a^-CD1c/BDC A-1^-CD141/BDC A-3^+$ cDC1 и $CD1a^-$

CD1c/BDCA-1⁺CD301a⁺cDC2 лимфоидных органов, а также резидентные CD1a⁺CD1c/BDCA-1⁺cDCs периферической ткани, например CD207⁺SIRPa/CD172a⁺ клетки Лангерганса (англ. Langerhans cells) [54]. Во время воспаления cDCs поглощают инородный материал путем фагоцитоза, а также они подвергаются воздействию провоспалительных цитокинов, после чего они покидают свою среду обитания в близлежащие лимфатические узлы, где они производят провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухоли α , IL-6 и IL-12p70 для активации провоспалительных Т-клеток. CD123⁺CD45RA⁺CD303⁺pDCs принадлежат к лимфоидной линии, и их название связано с их внешним сходством с плазматическими клетками [55].

Антитела, необходимые для выделения популяции cDCs:

- Негативный коктейль, в который входят:
 - ⇒ Анти-CD3 антитело (например, Pacific Blue anti-human CD3 antibody, Кат. №300330, BioLegend, США)
 - ⇒ Анти-CD19 антитело (например, Pacific Blue anti-human CD19 antibody, Кат. №302232, BioLegend, США)
 - ⇒ Анти-CD20 антитело (например, Pacific Blue anti-human CD20 antibody, Кат. №302328, BioLegend, США)
 - ⇒ Анти-CD56 антитело (например, Pacific Blue anti-human CD56 antibody, Кат. №362520, BioLegend, США)
- Анти-HLA-DR антитело (например, FITC anti-human HLA-DR antibody, Кат. №327006, BioLegend, США)
- Анти-CD123 антитело (например, Alexa Fluor 647 anti-human CD123 antibody, Кат. №306024, BioLegend, США)
- Анти-CD11c антитело (например, PerCP-Cyanine5.5 anti-human CD11c antibody, Кат. №301624, BioLegend, США)
- Анти-CD1c антитело (например, PE anti-human CD1c antibody, Кат. №331506, BioLegend, США)

Антитела, необходимые для выделения популяции pDCs:

- Негативный коктейль, в который входят:
 - ⇒ Анти-CD3 антитело (например, Pacific Blue anti-human CD3 antibody, Кат. №300330, BioLegend, США)
 - ⇒ Анти-CD19 антитело (например, Pacific Blue anti-human CD19 antibody, Кат. №302232, BioLegend, США)

- ⇒ Анти-CD20 антитело (например, Pacific Blue anti-human CD20 antibody, Кат. №302328, BioLegend, США)
- ⇒ Анти-CD56 антитело (например, Pacific Blue anti-human CD56 antibody, Кат. №362520, BioLegend, США)
- Анти-HLA-DR антитело (например, FITC anti-human HLA-DR antibody, Кат. №327006, BioLegend, США)
- Анти-CD103 антитело (например, Alexa Fluor 647 anti-human CD103 antibody, Кат. №350210, BioLegend, США)
- Анти-CD11c антитело (например, PerCP-Cyanine5.5 anti-human CD11c antibody, Кат. №301624, BioLegend, США)

Антитела, необходимые для выделения популяции moDCs:

- Негативный коктейль, в который входят:
 - ⇒ Анти-CD3 антитело (например, Pacific Blue anti-human CD3 antibody, Кат. №300330, BioLegend, США)
 - ⇒ Анти-CD19 антитело (например, Pacific Blue anti-human CD19 antibody, Кат. №302232, BioLegend, США)
 - ⇒ Анти-CD20 антитело (например, Pacific Blue anti-human CD20 antibody, Кат. №302328, BioLegend, США)
 - ⇒ Анти-CD56 антитело (например, Pacific Blue anti-human CD56 antibody, Кат. №362520, BioLegend, США)
- Анти-HLA-DR антитело (например, FITC anti-human HLA-DR antibody, Кат. №327006, BioLegend, США)
- Анти-CD14 антитело (например, APC-Cyanine7 anti-human CD14 antibody, Кат. №367108, BioLegend, США)
- Анти-CD11c антитело (например, PerCP-Cyanine5.5 anti-human CD11c antibody, Кат. №301624, BioLegend, США)
- Анти-CD80 антитело (например, PE anti-human CD80 antibody, Кат. №305208, BioLegend, США)
- Анти-CD83 антитело (например, PE anti-human CD83 antibody, Кат. №305308, BioLegend, США)

Стратегия гейтирования МКПК для выделения популяции cDCs, pDCs и moDCs отражена на рисунках 13, 14 и 15, соответственно.

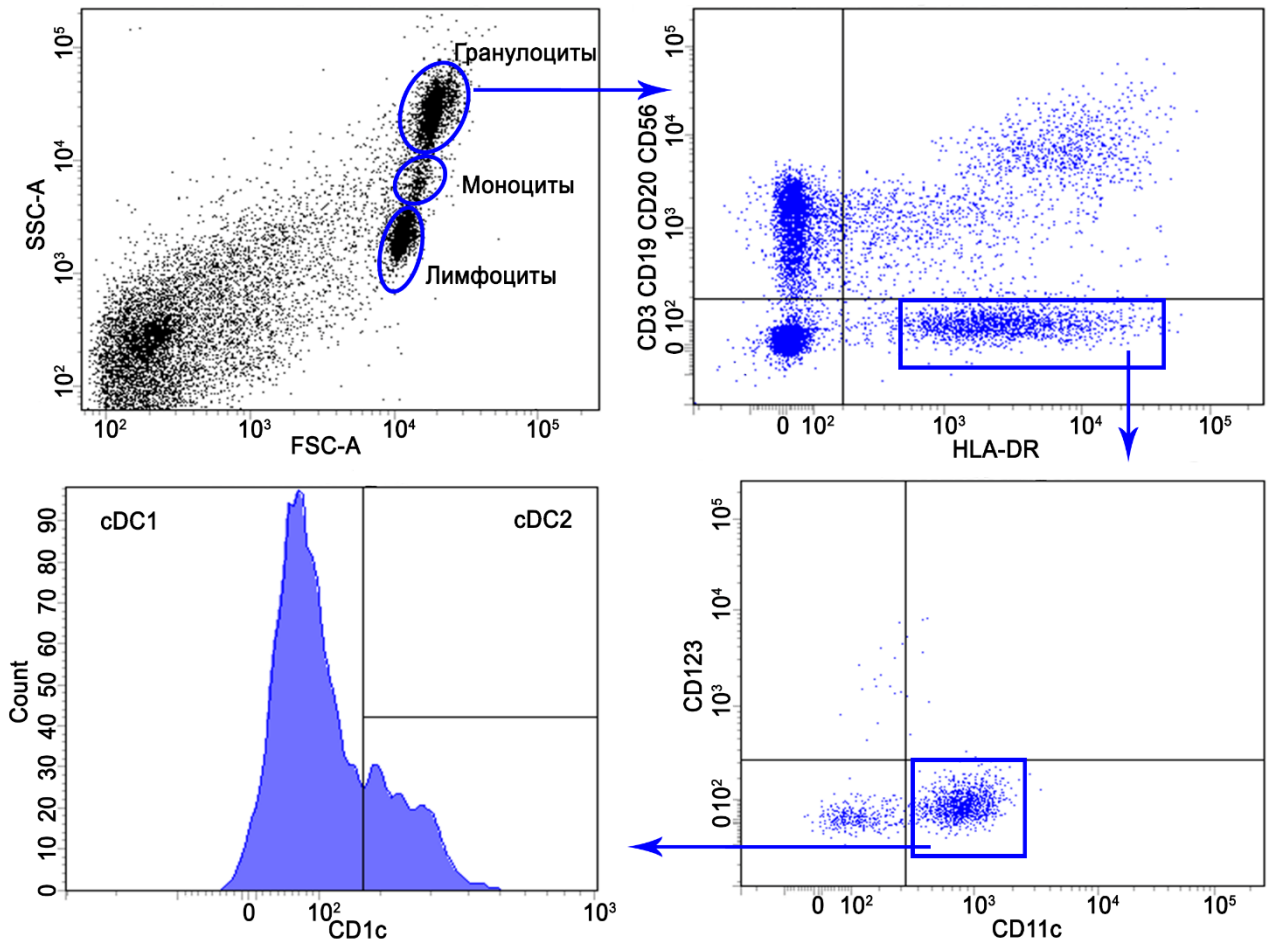


Рис. 13. Стратегия гейтирования популяций CD3⁻CD19⁻CD20⁻CD56⁻ HLA-DR⁺CD123⁻CD11c⁺CD1c⁻ cDC1 и CD3⁻CD19⁻CD20⁻CD56⁻ HLA-DR⁺CD123⁻CD11c⁺CD1c⁺ cDC2

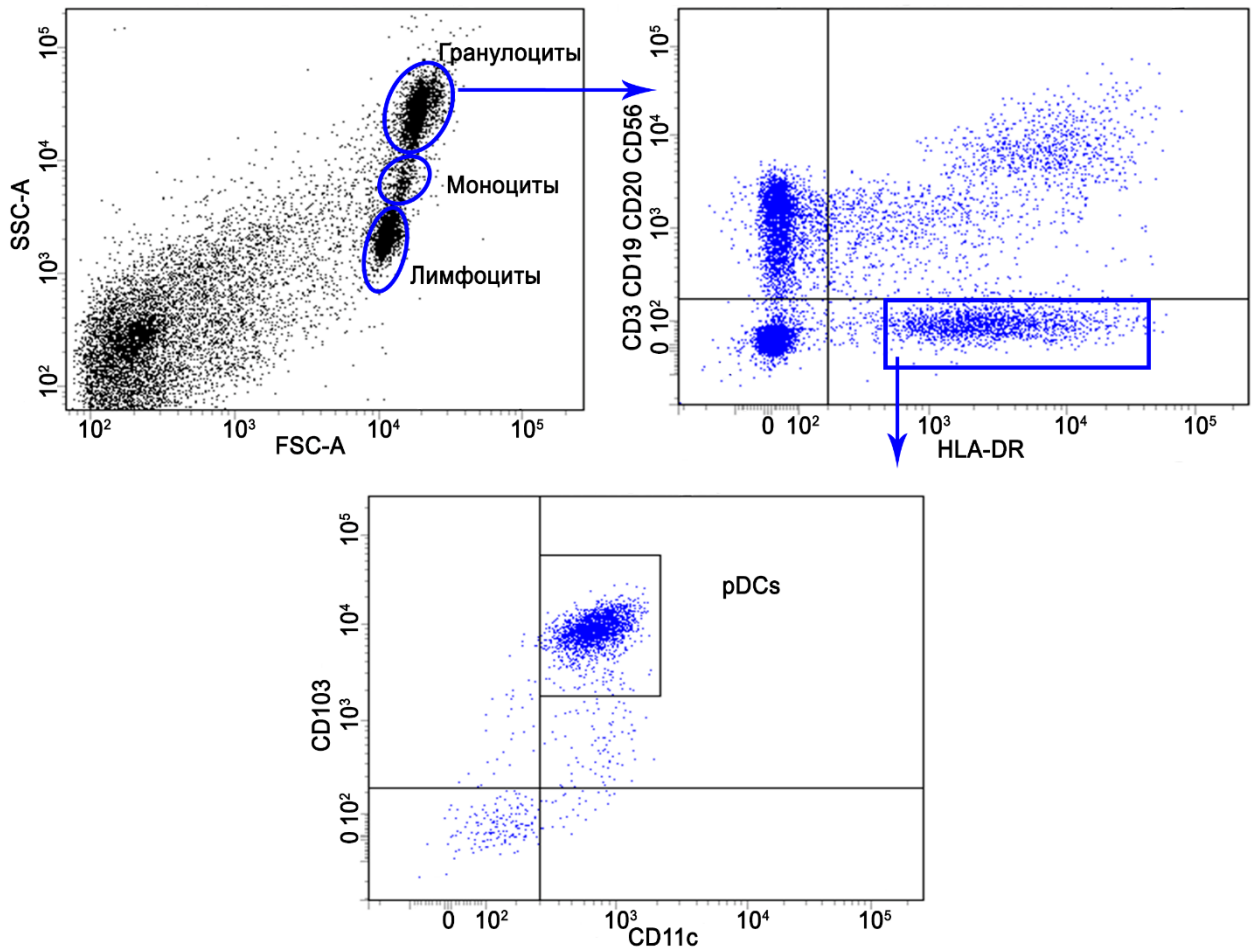


Рис. 14. Стратегия гейтирования популяций CD3⁻CD19⁻CD20⁻CD56⁻ HLA-DR⁺CD103⁺CD11c⁺ pDCs

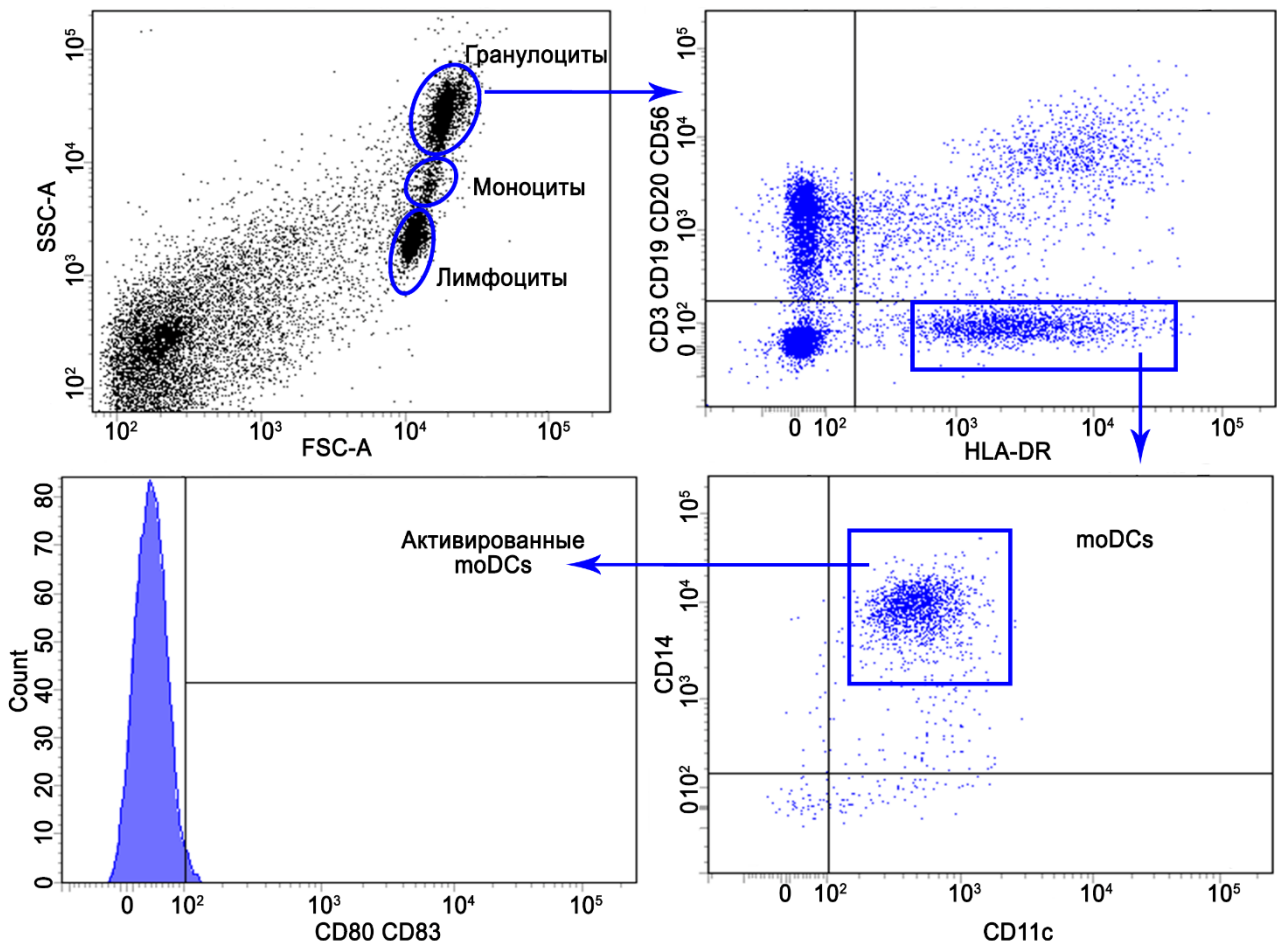


Рис. 15. Стратегия гейтирования популяций CD3⁻CD19⁻CD20⁻CD56⁻ HLA-DR⁺CD14⁺CD11c⁺ moDCs и активированных CD80⁺CD83⁺ moDCs

ЛИТЕРАТУРА

1. **Kaur, B.P.** Innate immunity / B.P. Kaur, E. Secord // *Immunol. Allergy Clin. North Am.* – 2021. – V. 41 (4). – P. 535-541.
2. **Bonilla, F.A.** Adaptive immunity / F.A. Bonilla, H.C. Oettgen // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2010. – V. 125 (2 Suppl 2). – P. 33-40.
3. **Rosales, C.** Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? / C. Rosales // *Front. Physiol.* – 2018. – V. 9. – P. 113.
4. **Sarma, J.V.** The complement system / J.V. Sarma, P.A. Ward // *Cell Tissue Res.* – 2011. – V. 343 – P. 227-235.
5. **Ramirez, G.A.** Eosinophils from physiology to disease: a comprehensive review / G.A. Ramirez, M.R. Yacoub, M. Ripa, D. Mannina, A. Cariddi, N. Saporiti, F. Ciceri, A. Castagna, G. Colombo, L. Dagna // *Biomed Res Int.* – 2018. – V. 2018. – P. 9095275.
6. **da Silva, E.Z.M.** Mast cell function: a new vision of an old cell / E.Z.M. da Silva, M.C. Jamur, C. Oliver // *J. Histochem. Cytochem.* – 2014. – V. 62 (10). – P. 698-738.
7. **Abel, A.M.** Natural killer cells: development, maturation, and clinical utilization / A.M. Abel, C. Yang, M.S. Thakar, S. Malarkannan // *Fron. Immunol.* – 2018. – V. 9. – P. 1869.
8. **Herwald, H.** Cells of innate and adaptive immunity: a matter of class? / H. Herwald, A. Egesten // *J. Innate Immun.* – 2017. – V. 9 (2). – P. 109-110.
9. **Collin, M.** Human dendritic cell subsets: an update / M. Collin, V. Bigley // *Immunology* – 2018. – V. 154 (1). – P. 3-20.
10. **Chen, D.S.** Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle / D.S. Chen, I. Mellman // *Immunity.* – 2013. – V. 39 (1). – P. 1-10.
11. **Chraa, D.** T lymphocyte subsets in cancer immunity: friends or foes / D. Chraa, A. Naim, D. Olive, A. Badou // *J. Leukoc. Biol.* – 2019. - V. 105 (2). – P. 243-255.
12. **Cossarizza, A.** Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition) / A. Cossarizza, H.D. Chang, A. Radbruch, A. Acs, D. Adam, S. Adam-Klages, W.W. Agace, N. Aghaepour, M. Akdis, M. Allez, et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2019. – V. 49 (10). – P. 1457-1973.

13. **Manohar, S.M.** Flow cytometry: principles, applications and recent advances / S.M. Manohar, P. Shah, A. Nair // *Bioanalysis* – 2021. – V. 13 (3). – P. 181-198.
14. **Adan, A.** Flow cytometry: basic principles and applications / A. Adan, G. Alizada, Y. Kiraz, Y. Baran, A. Nalbant // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2017. – V. 37 (2). – P. 163-176.
15. **Schmit, T.** An overview of flow cytometry: its principles and applications in allergic disease research / T. Schmit, M. Klomp, M.N. Khan // *Methods Mol. Biol.* – 2021. – V. 2223. – P. 169-182.
16. **Picot, J.** Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation / J. Picot, C.L. Guerin, C. Le Van Kim, C.M. Boulanger // *Cytotechnology.* – 2012. – V. 64 (2). – P. 109-130.
17. **McKinnon, K.M.** Flow cytometry: an overview / K.M. McKinnon // *Curr. Protoc. Immunol.* – 2018. – V. 120. – P. 5.1.1-5.1.11.
18. **Barnett, D.** CD4 immunophenotyping in HIV infection / D. Barnett, B. Walker, A. Landay, T.N. Denny // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2008. – V. 6 (11 Suppl). – P. 7-15.
19. **Quyyumi, A.A.** CD34(+) cell infusion after ST elevation myocardial infarction is associated with improved perfusion and is dose dependent / A.A. Quyyumi, E.K. Waller, J. Murrow, F. Esteves, J. Galt, J. Oshinski, S. Lerakis, S. Sher, D. Vaughan, E. Perin, et al. // *Am. Heart J.* – 2011. – V. 161 (1). – P. 98-105.
20. **Geginat, J.** Plasticity of human CD4 T cell subsets / J. Geginat, M. Paroni, S. Maglie, J.S. Alfen, I. Kastirr, P. Gruarin, M. De Simone, M. Pagani, S. Abrignani // *Fron. Immunol.* – 2014. – V. 5 – P. 630.
21. **Kurd, N.** T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective / N. Kurd, E.A Robey // *Immunol. Rev.* – 2016. – V. 271 (1). – P. 114-126.
22. **Raphael, I.** T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases / I. Raphael, S. Nalawade, T.N. Eagar, T.G. Forsthuber // *Cytokine.* – 2015. – V. 74 (1). – P. 5-17.
23. **Qin, Z.** CD4+ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells / Z. Qin, T. Blankenstein // *Immunity.* – 2000. – V. 12 (6). – P. 677-686.
24. **Chen, D.S.** Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point / D.S. Chen, I. Mellman // *Nature.* – 2017. – V. 541 (7637). – P. 321-330.

25. **Kim, C.H.** Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo / C.H. Kim, L. Rott, E.J. Kunkel, M.C. Genovese, D.P. Andrew, L. Wu, E.C. Butcher // *J. Clin. Invest.* – 2001. – V. 108 (9). – P. 1331-1339.
26. **Belizario, J.E.** Thymic and postthymic regulation of naive CD4(+) T-cell lineage fates in humans and mice models / J.E. Belizario, W. Brandao, C. Rossato, J.P. Peron, // *Mediators Inflamm.* – 2016. – V. 2016. – P. 9523628.
27. **Sallusto, F.** Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells / F. Sallusto, C.R. Mackay, A. Lanzavecchia // *Science.* – 1997. – V. 277 (5334). – P. 2005-2007.
28. **Zingoni, A.** The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells / A. Zingoni, H. Soto, J.A. Hedrick, A. Stoppacciaro, C.T. Storlazzi, F. Sinigaglia, D. D'Ambrosio, A. O'Garra, D. Robinson, M. Rocchi, et al. // *J. Immunol.* – 1998. – V. 161 (2). – P. 547-551.
29. **Awasthi, A.** Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection / A. Awasthi, V.K. Kuchroo // *Int. Immunol.* – 2009. – V. 21 (5). – P. 489-498.
30. **Acosta-Rodriguez, E.V.** Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells / E.V. Acosta-Rodriguez, L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, G. Napolitani // *Nat. Immunol.* – 2007. – V. 8 (6). – P. 639-646.
31. **Greten, T.F.** Human Th17 cells in patients with cancer: friends or foe? / T.F. Greten, F. Zhao, J. Gamrekelashvili, F. Korangy // *Oncoimmunology.* – 2012. – V. 1 (8). – P. 1438-1439.
32. **Acosta-Rodriguez, E.V.** Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells / E.V. Acosta-Rodriguez, G. Napolitani, A. Lanzavecchia, F. Sallusto // *Nat. Immunol.* – 2007. – V. 8 (9). – P. 942-949.
33. **Chung, Y.** Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling / Y. Chung, S.H. Chang, G.J. Martinez, X.O. Yang, R. Nurieva, H.S. Kang, L. Ma, S.S. Watowich, A.M. Jetten, Q. Tian, et al. // *Immunity.* – 2009. – V. 30 (4). – P. 576-587.
34. **Quezada, S.A.** CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and

- regulatory T cells / S.A. Quezada, K.S. Peggs, M.A. Curran, J.P. Allison // *J. Clin. Invest.* – 2006. – V. 116 (7). – P. 1935-1945.
35. **Sharma, S.** Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell activities in lung cancer / S. Sharma, S.C. Yang, L. Zhu, K. Reckamp, B. Gardner, F. Baratelli, M. Huang, R.K. Batra, S.M. Dubinett // *Cancer Res.* – 2005. – V. 65 (12). – P. 5211-5220.
 36. **Kondelkova, K.** Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders / K. Kondelkova, D. Vokurkova, J. Krejsek, L. Borska, Z. Fiala, A. Ctirad // *Acta Medica (Hradec Kralove).* – 2010. – V. 53 (2). – P. 73-77.
 37. **Zhang, N.** CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system / N. Zhang, M.J. Bevan // *Immunity.* – 2011. – V. 35 (2). – P. 161-168.
 38. **Farhood, B.** CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: a review / B. Farhood, M. Najafi, K. Mortezaee // *J Cell. Physiol.* – 2019. – V. 234 (6). – P. 8509-8521.
 39. **Spranger, S.** Impact of oncogenic pathways on evasion of antitumour immune responses / S. Spranger, T.F. Gajewski // *Nat. Rev. Cancer.* – 2018. – V. 18 (3). – P. 139-147.
 40. **Salgado, F.J.** Interleukin-dependent modulation of HLA-DR expression on CD4 and CD8 activated T cells / F.J. Salgado, J. Lojo, C.M. Fernandez-Alonso, J. Vinuela, O.J. Cordero, M. Nogueira // *Immunol. Cell Biol.* – 2002. – V. 80 (2). – P. 138-147.
 41. **Amlot, P.L.** Activation antigen expression on human T cells. I. Analysis by two-colour flow cytometry of umbilical cord blood, adult blood and lymphoid tissue / P.L. Amlot, F. Tahami, D. Chinn, E. Rawlings // *Clin. Exp. Immunol.* – 1996. – V. 105 (1). – P. 176-182.
 42. **Sandoval-Montes, C.** CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines / C. Sandoval-Montes, L. Santos-Argumedo // *J. Leukoc. Biol.* – 2005. – V. 77 (4). – P. 513-521.
 43. **Brodbeck, T.** Perforin-dependent direct cytotoxicity in natural killer cells induces considerable knockdown of spontaneous lung metastases and computer modelling-proven tumor cell dormancy in a HT29 human colon cancer xenograft mouse model / T. Brodbeck, N.

- Nehmann, A. Bethge, G. Wedemann, U. Schumacher // *Mol. Cancer.* – 2014. – V. 13. – P. 244.
44. **Poli, A.** CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset / A. Poli, T. Michel, M. Theresine, E. Andres, F. Hentges, J. Zimmer // *Immunology.* – 2009. – V. 126 (4). – P. 458-465.
 45. **Angelo, L.S.** Practical NK cell phenotyping and variability in healthy adults / L.S. Angelo, P.P. Banerjee, L. Monaco-Shawver, J.B. Rosen, G. Makedonas, L.R. Forbes, E.M. Mace, J.S. Orange // *Immunol. Res.* – 2015. – V. 62 (3). – P. 341-356.
 46. **Stabile, H.** Role of distinct natural killer cell subsets in anticancer response / H. Stabile, C. Fionda, A. Gismondi, A. Santoni // *Front. Immunol.* – 2017. – V. 8. – P. 293.
 47. **Kumar, A.** Natural killer T cells: an ecological evolutionary developmental biology perspective / A. Kumar, N. Suryadevara, T.M. Hill, J.S. Bezbradica, L. Van Kaer, S. Joyce // *Front. Immunol.* – 2017. – V. 8. – P. 1858.
 48. **Metelitsa, L.S.** Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells / L.S. Metelitsa, O.V. Naidenko, A. Kant, H.W. Wu, M.J. Loza, B. Perussia, M. Kronenberg, R.C. Seeger, // *J. Immunol.* – 2001. – V. 167 (6). – P. 3114-3122.
 49. **Horikoshi, M.** Activation of invariant NKT cells with glycolipid ligand alpha-galactosylceramide ameliorates glucose-6-phosphate isomerase peptide-induced arthritis / M. Horikoshi, D. Goto, S. Segawa, Y. Yoshiga, K. Iwanami, A. Inoue, Y. Tanaka, I. Matsumoto, T. Sumida // *PLoS One.* – 2012. – V. 7 (12). – P. 51215.
 50. **Kawano, T.** CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides / T. Kawano, J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, et al. // *Science.* – 1997. – V. 278 (5343). – P. 1626-1629.
 51. **Descatoire, M.** Identification of a human splenic marginal zone B cell precursor with NOTCH2-dependent differentiation properties / M. Descatoire, S. Weller, S. Irtan, S. Sarnacki, J. Feuillard, S. Storck, A. Guiochon-Mantel, J. Bouligand, A. Morali, J. Cohen, et al. // *J. Exp. Med.* – 2014. – V. 211 (5). – P. 987-1000.
 52. **Wei, X.** Regulatory B cells contribute to the impaired antitumor immunity in ovarian cancer patients / X. Wei, Y. Jin, Y. Tian, H.

- Zhang, J. Wu, W. Lu, X. Lu // *Tumour Biol.* – 2016. – V. 37 (5). – P. 6581-6588.
53. **Gardner, A.** Dendritic cells and their role in immunotherapy / A. Gardner, A.D. Pulido, B. Ruffell // *Front. Immunol.* – 2020. – V. 11. – P. 924.
54. **Chulpanova, D.S.** Molecular aspects and future perspectives of cytokine-based anti-cancer immunotherapy / D.S. Chulpanova, K.V. Kitaeva, A.R. Green, A.A. Rizvanov, V.V. Solovyeva // *Front. Cell. Dev. Biol.* – 2020. – V. 8. – P. 402.
55. **Van Brussel, I.** Optimizing dendritic cell-based immunotherapy: tackling the complexity of different arms of the immune system / I. Van Brussel, Z.N. Berneman, N. Cools // *Mediators Inflamm.* – 2012. – V. 2012. – P. 690643.