

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОРАЖЕННОЙ ОПУХОЛЬЮ ПЕЧЕНИ У МЫШЕЙ.

Е.Н.Кузовлев¹, О.В.Лебединская², Н.К.Ахматова³, Ф.В.Доненко¹, И.Ж. Шубина¹, А.И.Макашин³, М.В.Киселевский¹, Б.Ф.Семенов³

¹ГУ Российский научный онкологический центр им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва (директор академик РАН и РАМН М.И.Давыдов)

²ГОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия МЗ РФ» (ректор профессор В.А. Черкасов)

³ГУ НИИ Вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва (директор академик РАМН Б.Ф.Семенов)

Введение. В исследованиях последних лет было показано, что при метастатическом поражении печени паренхиме этого органа инфильтрируются лимфоцитами, которые экспрессируют на своей поверхности маркеры Т-лимфоцитов (CD3, CD4, CD8) и натуральных киллеров (CD16, CD56). Эти печень - ассоциированные лимфоциты, получившие название НК-Т-клеток, обладали высокой цитотоксической активностью и были способны оказывать антиметастатическое действие.

Цель работы — изучение иммунофенотипа печень-ассоциированных лимфоцитов у мышей с имплантированной опухолью СаО-1.

Материалы и методы

Выделение мононуклеарных лимфоцитов (МНЛ) печени и селезенки. Для проведения экспериментов *in vitro* на 14 сут. после имплантации опухоли у животных выделяли селезенку и печень, из которых получали клеточную суспензию. Гепатоциты и эритроциты отделяли от МНЛ путем центрифугирования при 50g в течение 5 минут. МНЛ выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин («ПанЭко», плотность 1.088 г/см³). Клетки отмывали 2 раза средой 199 и ресуспендировали в полной культуральной среде (ПКС) — RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2мМ glutамин, стрептомицин с пенициллином по 5000 МЕ/мл.

Получение клеток из опухолевого узла печени. Из опухолевого узла получали суспензию клеток, которую затем дважды отмывали в растворе Хенкса и ресуспендировали в ПКС.

Определение иммунофенотипа. Определение иммунофенотипа (экспрессии поверхностных молекул) МНК проводили при помощи моноклональных антител против соответствующих антигенов (“Caltag Laboratories”, США), результаты учитывали методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACScan (“Becton Dickinson”, США). На МНК исследовались уровни экспрессии дифференцировочных антигенов с использованием двойной метки CD3-FITC и NK1.1-PE. Гейт (окно) популяции клеток

устанавливали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. При учете результатов подсчитывали 10000 событий в гейте.

Флюоресцентная микроскопия. Определение экспрессии поверхностных маркеров проводили при помощи CD3-FITC и NK1.1-PE моноклональных антител (МкАт) (фирмы Caltag Laboratories, США). МНК инкубировались с МкАт в течение 30 мин при 4°C. Затем дважды отмывались в фосфатном буфере путем центрифугирования в течение 10 мин при 100 g. Полученную взвесь клеток наносили на предметные стекла, покрытые полизином. Прижизненную флюоресцентную микроскопию клеток выполняли с использованием люминесцентного микроскопа AxioPlan 2, а также цифровой системы регистрации и анализа изображения Axiovision 4.2 (фирма Zeiss, Германия). На МНК исследовали интенсивность экспрессии Т-клеточного антигена CD3 маркера НК-клеток.

Результаты и обсуждение.

Проведение иммунофлюоресцентного анализа показало, что мононуклеарные лейкоциты (МНЛ), выделенные из пораженной опухолью печени, экспрессируют на своей мембране антигены Т-лимфоцитов (CD3) и маркеры НК. В популяции МНЛ селезенки в отличие от печени выявлялись только CD3+ Т-лимфоциты и практически отсутствовали НК+-клетки. Лимфоциты, выделенные из пораженной опухолью печени, образуют две субпопуляции, в одной из которых обнаруживаются практически только Т-лимфоциты (35%), а в другой-НК (18%). Содержание НКТ, несущих одновременно маркеры Т-клеток и НК, в обеих исследованных субпопуляциях колеблется от 1 до 3%. Лимфоциты селезенки интактных и зараженных опухолью мышей экспрессируют на своей поверхности только CD3+лимфоциты, а содержание НК не превышает 2,5 %.

Согласно данным, полученные в настоящей работе печень-ассоциированные лимфоциты представлены двумя субпопуляциями, каждая из которых преимущественно содержит НК или Т-клетки и лишь небольшое количество лимфоцитов может быть отнесено к НКТ. Таким образом, печень-ассоциированные лимфоциты имеют свои характерные особенности иммунофенотипа и, очевидно, играют важную роль в формировании местного противоопухолевого иммунитета.