

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПО ФАЗОВЫМ ИЗОБРАЖЕНИЯМ CD8+ ЛИМФОЦИТОВ

© 2016 г. Т.В. Вышенская, А.А. Болотова, И.А. Василенко*, В.Д. Звержховский, Д.В. Болдырев, А.В. Кретушев, А.А. Евдокимов

Московский государственный технический университет информационных технологий, радиотехники и электроники (МИРЭА), 119454, Москва, просп. Вернадского, 78;

*Государственная классическая академия им. Маймонида, 115035, Москва, ул. Садовническая, 52/45

E-mail: tvysh@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.12.15 г.

Предложен новый метод определения цитотоксического потенциала, характеризующего состояние клеток иммунной системы. Методом когерентной фазовой микроскопии в цитоплазме живых CD8+ лимфоцитов выявлены и охарактеризованы перфориновые гранулы. По фазовым изображениям была проведена количественная оценка параметров перфориновых гранул в клетках и получены их средние значения: площадь проекции на плоскость изображения 15 ± 7 мкм², фазовый объем $0,94 \pm 0,24$ мкм³ и их «сухая масса» $0,52 \pm 0,11$ пг. С помощью разработанного метода можно определить цитотоксический потенциал на небольшом количестве живых клеток без применения флуоресцентных зондов.

Ключевые слова: лимфоциты, цитотоксический потенциал, перфориновые гранулы, интерференционная микроскопия.

Исследованиями последних десятилетий убедительно доказана важная патогенетическая роль дисфункций иммунной системы в возникновении и прогрессировании целого ряда заболеваний: инфекционных, аллергических, лимфопрлиферативных, аутоиммунных, онкологических и др. Является очевидным, что в основе формирования этих патологических процессов лежит нарушение механизмов взаимодействия клеток иммунной системы между собой, их продуктами и клетками-мишенями.

Одним из наиболее важных компонентов эффекторной стадии иммунного ответа являются цитотоксические Т-лимфоциты, циркулирующие в крови и реализующие свое цитолитическое действие посредством продукции цитокинов и цитолитических молекул. Для оценки функционального потенциала цитотоксических Т-лимфоцитов используют разнообразные методы с применением радиоизотопов, флуоресцентных меток, красителей, ферментов и антител. Детальное изучение роли цитотоксического звена иммунной системы в генезе различных заболеваний, выявление механизмов формирования иммунологических нарушений открывают перспективы для усовершенствования методов диагностики, возможности использования показателей цитотоксичности в качестве объективных критериев прогноза заболевания и контроля эффективности проводимой терапии [1–4].

Механизм лигандопосредованного взаимодействия цитотоксических Т-лимфоцитов с клетками-мишенями обеспечивает образование конъюгатов и экзоцитоз цитотоксических белков (перфорина и гранзимов) из азурофильных гранул в образовавшуюся синаптическую щель. Перфорин встраивается в мембрану клетки-мишени, образуя трансмембранные поры, в которые проникают гранзимы, индуцирующие апоптотический путь гибели клетки-мишени [5].

Известно, что на активность эффекторного цитотоксического звена иммунной системы может оказывать влияние целый ряд параметров, а именно: количество цитотоксических лимфоцитов в циркулирующем пуле, содержание в их литических гранулах биологически активных перфорина и гранзимов, способность клеток к дегрануляции и т.п.

В настоящей работе нами предпринята попытка оценки цитотоксического потенциала Т-лимфоцитов на основе количественного анализа структур (гранул) секреторного аппарата в цитоплазме клеток по их фазовым изображениям, полученным методом когерентной фазовой микроскопии [6–10].

Ранее было показано, что использование фазовых изображений позволяет определять параметры внутренних структур клетки, а также ее функциональное состояние [6–10]. Для того, чтобы выявить гранулы в цитоплазме лимфо-

цита, в его фазовом изображении с помощью метода, предложенного в работе [6], выделялась область «тонкой» цитоплазмы клетки, прилегающей к плазматической мембране. Мы определили фазовый объем и площадь «тонкой» цитоплазмы лимфоцита. В качестве контроля были использовали лимфоциты CD4+, не содержащие гранул.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мононуклеары получали из периферической крови здоровых добровольцев, стабилизированной гепарином в концентрации 25 ЕД на 1 мл, стандартным методом по Воуи на градиенте плотности для лимфоцитов Ficoll-Paque ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) (Amersham Biosciences, Швеция). Кровь разбавляли физиологическим раствором в соотношении 1:1, наслаивали в центрифужные пробирки на слой градиента и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 45 мин. Кольцо мононуклеарных клеток на границе градиента собирали и дважды отмывали физиологическим раствором по 5–7 мин при 1000 об/мин. Выделение субпопуляций CD4+ и CD8+ лимфоцитов из общей фракции мононуклеаров осуществляли методом магнитной сепарации по методике производителя (Miltenyi Biotec, Германия). К суспензии мононуклеарных клеток добавляли магнитные частицы, конъюгированные с анти-CD4 и анти-CD8 антителами соответственно, и инкубировали в течение 15 мин при 40°C. Затем клетки отмывали и осуществляли выделение позитивных фракций с помощью магнитного сепаратора AutoMACS (Miltenyi Biotec, Германия). Чистота выделения во всех случаях составляла более 95%.

За 10 мин до измерений к суспензии лимфоцитов добавлялся глицерин в соотношении 1:1 для минимизации воздействия лазера на клетки (показатель преломления среды составлял $n_0 = 1,413$). Далее взвесь лимфоцитов в среде 199 (конечная концентрация $1 \cdot 10^6$ кл/мл) помещали в модифицированную камеру Горяева для инвертированного микроскопа.

Измерения производили на оригинальном когерентном фазовом микроскопе «Цитоскан». Оптическая схема микроскопа представляет собой модификацию схемы микроинтерферометра Линника: излучение He-Ne-лазера ($\lambda = 633 \text{ нм}$, 1 мВт) проходит через полупрозрачный светоделитель; «объектная» волна проходит дважды через объект, а «референтная» волна отражается без искажений волнового фронта от плоского зеркала, закрепленного на пьезопреобразователе.

Изображение клетки на микроскопе «Цитоскан» получали растровым методом [6], в котором значения фазы объектного волнового

фронта определяли компенсационным способом последовательно в каждом пикселе изображения. В данном методе фазу опорной волны изменяли по линейно-периодическому закону движением зеркала в опорном плече интерферометра. Растровое сканирование изображения и регистрацию интерференционного сигнала производили координатно-чувствительным фотоприемником – диссектором ЛИ-620 («Электрон»). Этот метод позволил регистрировать в реальном времени динамические процессы в клетках со сверхдифракционным пространственным разрешением. Ограниченная шумами чувствительность к изменениям фазовой толщины составляла около 1 нм. Более детальное описание метода когерентной фазовой микроскопии и самого прибора приведено в работах [8–10]. Параметры фазового изображения определяли с помощью интегральных функций площади $S(h)$ и фазового объема $W(h)$ по оригинальным алгоритмам [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью интегральных функций площади $S(h)$ и фазового объема $W(h)$ по оригинальным алгоритмам [6,7] было исследовано 66 фазовых изображений CD8+ лимфоцитов, часть из которых содержит гранулы, и в качестве контроля – 89 изображений CD4+ лимфоцитов, не содержащих гранул. Известно, что зрелые цитотоксические гранулы прикреплены к рецепторам TCR (T Cell Receptor) и расположены в цитоплазме, прилегающей к плазматической мембране [11]. Метод интегральных функций позволяет выделять в цитоплазме две области – оптически прозрачную «тонкую» цитоплазму, прилегающую к плазматической мембране, и «плотную» перинуклеарную часть цитоплазмы, содержащую ретикулум, аппарат Гольджи и значительную часть митохондрий (хондриом). Из всех параметров фазового портрета, характеризующих живую клетку [6], в этом исследовании были выбраны только те, которые характеризуют состояние «тонкой» цитоплазмы, содержащей гранулы: значения фазовой толщины клетки на границе раздела «плотной» и «тонкой» цитоплазмы ($h_{\text{тц}}$), величины площади и фазового объема «тонкой» цитоплазмы $S_{\text{тц}}$ и $W_{\text{тц}}$.

Статистическая обработка показала, что CD8+ лимфоциты, в отличие от CD4+ (контроля), содержат как минимум две фракции, значительно отличающиеся по своим параметрам. Распределения параметров фазового портрета, характеризующих «тонкую» цитоплазму лимфоцитов CD8+ и CD4+ (контроль) приведены на рис. 1.

Как видно из рис. 1а, распределение CD8+ лимфоцитов по фазовой высоте $h_{\text{тц}}$ на границе

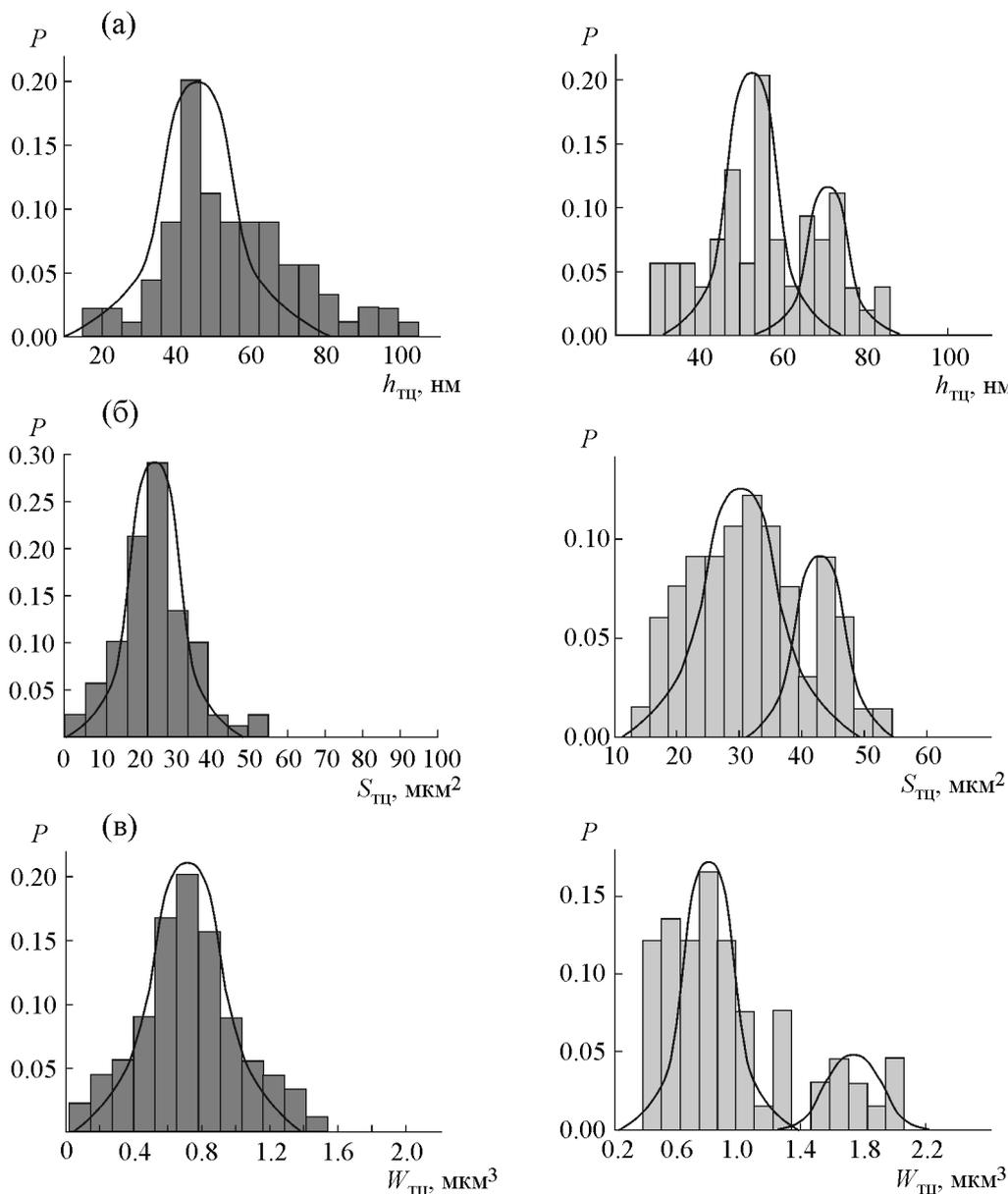


Рис. 1. Распределение параметров $h_{тц}$, $S_{тц}$, $W_{тц}$ для лимфоцитов CD8+ и CD4+ (контроль). (а) – Распределение $h_{тц}$ лимфоцитов CD8+ содержит дополнительную компоненту с увеличенной фазовой толщиной, что свидетельствует о росте плотности на границе «тонкой» и «плотной» цитоплазмы за счет включений. (б) – В распределении Т-лимфоцитов CD8+ по площади «тонкой» цитоплазмы $S_{тц}$ содержится дополнительная фракция. (в) – В распределении параметра $W_{тц}$ лимфоцитов CD8+, соответствующего фазовому объему «тонкой» цитоплазмы, присутствует дополнительная фракция, отсутствующая в CD4+.

«тонкой» и «плотной» цитоплазмы, кроме основной компоненты 54 ± 8 нм, совпадающей в пределах ошибки с контролем (CD4+), содержит еще дополнительную компоненту с увеличенной фазовой высотой 73 ± 8 нм, что свидетельствует о росте в ней плотности на границе, возможно, за счет дополнительных включений. В распределении CD8+ Т-лимфоцитов по площади «тонкой» цитоплазмы также содержится дополнительная фракция 45 ± 7 $\mu\text{м}^2$ (рис. 1б).

В распределении параметра $W_{тц}$ лимфоцитов CD8+ также присутствует дополнительная фракция $1,64 \pm 0,24$ $\mu\text{м}^3$, отсутствующая в контроле (рис. 1в).

Средние значения фракций, полученных из распределений на рис. 1, приведены в таблице.

Как следует из таблицы, значения, соответствующие CD4+, практически совпадают с нижними значениями параметров для CD8+.

Параметры «тонкой» цитоплазмы лимфоцитов CD8+, полученные по фазовым изображениям

Тип лимфоцитов	$h_{\text{тц}}$, нм	$S_{\text{тц}}$, мкм ²	$W_{\text{тц}}$, мкм ³
CD8+	73 ± 8	45 ± 7	$1,64 \pm 0,24$
	54 ± 8	30 ± 7	$0,70 \pm 0,20$
CD4+ (контроль)	45 ± 10	24 ± 5	$0,70 \pm 0,22$

По распределениям параметров $h_{\text{тц}}$, $S_{\text{тц}}$ и $W_{\text{тц}}$ для двух фракций (рис. 1) был определен цитотоксический потенциал – процентное соотношение клеток CD8+, содержащих и не содержащих гранулы (рис. 2).

Используя подход для определения «сухой» массы вещества живой клетки по ее оптическим свойствам, основанный на классической работе [12], можно определить среднюю сухую массу гранул по их фазовому объему в цитоплазме. Согласно работе [13], клеточная масса связана с фазовой высотой соотношением $m = \int h dS / \alpha$, где m – масса клетки, α – константа, описывающая связь фазовой высоты с массой клетки, h – фазовая высота в каждой точке изображения, а интегрирование проводится по площади клетки S . В терминах фазового объема эта формула может быть преобразована следующим образом: $\Delta m = \Delta W / \alpha$, где ΔW – изменение фазового объема клетки. Как правило, для обычного содержимого клетки коэффициент $\alpha = 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ м}^3 \text{ кг}^{-1}$ [12,13]. Предполагая, что различие между компонентами CD8+ по фазовому объему «тонкой» цитоплазмы $\Delta W_{\text{тц}} = 0,94 \pm 0,24 \text{ мкм}^3$ (см. таблицу) обусловлено гранулами, можно определить их среднюю «сухую» массу $\Delta m = 0,52 \pm 0,11 \text{ пг}$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В таблице представлены результаты обработки фазовых изображений Т-лимфоцитов типа CD4+ и CD8+, численно характеризующие «тонкую» цитоплазму: фазовая высота $h_{\text{тц}}$, площадь $S_{\text{тц}}$ и фазовый объем $W_{\text{тц}}$. Как следует из рис. 1 и таблицы, CD8+ лимфоциты, по сравнению с CD4+ лимфоцитами, содержат кроме основной, совпадающей у этих двух ти-

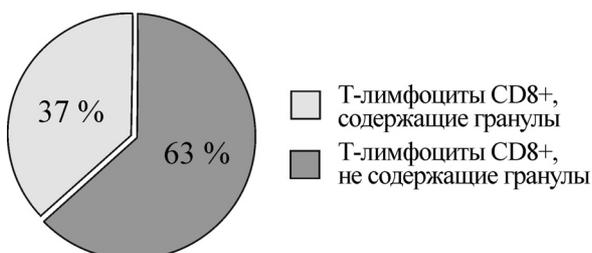


Рис. 2. Цитотоксический потенциал CD8+ лимфоцитов.

пов лимфоцитов фракции, еще одну – дополнительную. Мы предположили, что эта дополнительная фракция, отсутствующая в контроле, обусловлена наличием в цитоплазме оптически более плотного вещества – пресинтетических цитотоксических гранул, содержащихся у части лимфоцитов CD8+. Наличие гранул в цитоплазме приводит к увеличению ее площади в среднем на $15 \pm 7 \text{ мкм}^2$ (см. разность фракций на рис. 1б и в таблице). Это предположение хорошо согласуется со значением площади гранул 19 мкм^2 , определенной по изображениям областей расположения флуоресцентно-меченого перфорина в работе [3]. Используя оптический способ определения массы клетки [12,13], по разности значений фазовых объемов цитоплазмы фракций CD8+ лимфоцитов $\Delta W_{\text{тц}}$ мы получили среднюю «сухую» массу гранул тонкой цитоплазмы, согласующуюся с величиной, известной из литературы [14].

Всего было обработано 155 фазовых изображений лимфоцитов CD8+ и CD4+. Мы не приводим полную таблицу параметров фазового изображения лимфоцита, а только значимые параметры, в которых проявилась фракция клеток, содержащих гранулы.

Эффекторные цитотоксические Т-лимфоциты обладают врожденной способностью оказывать цитолитическое и апоптоз индуцирующее действие. Известно, что популяция цитотоксических Т-лимфоцитов является достаточно гетерогенной. Так, только 40% Т-лимфоцитов с фенотипом CD8+ содержат цитотоксические гранулы [1,2]. Соотношение числа перфорин-позитивных CD8+ лимфоцитов к общему числу цитотоксических Т-лимфоцитов называют цитотоксическим (перфориновым) потенциалом.

Однако механизм нарушения цитотоксичности CD8+ лимфоцитов может быть связан не только с количественным изменением пула эффекторных клеток, реализующих свой функциональный потенциал за счет секреторного лизиса, но и со снижением содержания перфорина в азурофильных гранулах или нарушением гранулярного экзоцитоза. Поэтому анализ оптических свойств цитотоксических гранул в цитоплазме лимфоцитов может служить дополнительным маркером функциональной активности цитотоксических Т-лимфоцитов. Выявленное нами увеличение фазовой высоты на границе

«тонкой» и «плотной» цитоплазмы свидетельствует о более оптически-плотном веществе в этой зоне у некоторого количества клеток, что, по-видимому, обусловлено наличием так называемых цитотоксических гранул и внутриклеточному содержанию перфорина. Полученные значения цитотоксического потенциала совпадают с известными в литературе [1,2].

ВЫВОДЫ

Таким образом, показана возможность использования нового метода определения цитотоксического потенциала с помощью когерентной фазовой микроскопии для оценки функциональной полноценности цитотоксического звена иммунной системы. Количественный экспресс-анализ параметров цитоплазматических структур лимфоцитов с помощью предложенного метода, без применения флуоресцентных зондов, способствует проведению объективной оценки состояния иммунной системы, характеристике ее цитотоксического потенциала, пониманию клинической гетерогенности вариантов течения патологического процесса, прогнозу исхода заболевания, контролю эффективности проводимой терапии и таким образом может обладать диагностической и прогностической значимостью.

Авторы выражают глубокую благодарность д.ф.-м.н. В.А. Намиоту, проф. Г.В. Максимову и проф. А.Б. Рубину за обсуждение результатов и ценные замечания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ

по проектной части государственного задания № 8.344.2014/К, № 8.344.2014/К и по базовой части государственного задания № 1066, а также Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-02-00278).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. А. Борунова, Г. З. Чкадуа, Т. Н. Заботина и др., Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН **16** (3–4), 7 (2005).
2. I. Voskoboinik, M. J. Smyth, and J. A. Trapani, *Nat. Rev. Immunol.* **6** (12), 940 (2006).
3. E. Reefman, J. G. Kay, and S. M. Wood, *J. Immunol.* **184**, 4852 (2010).
4. S. P. Cullen, M. Brunet, S. J. Martin, *Cell Death and Differentiation* **17**, 616 (2010).
5. T. Brodbeck, et al., *Molec. Cancer* **13**, 244 (2014).
6. V. P. Tychinsky, et al., *J. Biomed. Opt.* **17** (7), 076020 (2012).
7. V. Tychinsky, A. V. Kretushev, and I. V. Klemyashov, *J. Biomed. Opt.* **18** (11), 111413 (2013). DOI: 10.1117/1.JBO.18.11.111413.
8. V. P. Tychinsky and A. N. Tikhonov, *Cell Biochem. Biophys.* **58** (3), 107 (2010).
9. В. П. Тычинский, *Усп. физич. наук* **171**, 649 (2001).
10. V. P. Tychinsky, *Physics-Uspekhi*, **50** (5), 513(2007).
11. P. J. Peters, J. Borst, V. Oorschot, et al., *J. Exp. Med.* **173**, 1099 (1991).
12. R. Barer, *Nature* **169**, 541 (1952)
13. J. Reed, J. Chun, T. A. Zangle, et al., *Biophys. J.* **101**, 1025 (2011).
14. E. R. Podack, J. D.-E. Young, and Z. A. Cohn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 8629 (1985).

A Method for Determining the Cytotoxic Potential by Phase Images of CD8+ Lymphocytes

T.V. Vyshenskaya*, **A.A. Bolotova***, **I.A. Vasilenko****, **V.D. Zverzhovskiy***,
D.V. Boldyrev*, **A.V. Kretushev***, and **A.A. Evdokimov***

**Moscow State Technical University of Information Technologies, Radio Engineering and Electronics (MIREA),
prosp. Vernadskogo 78, Moscow, 119454 Russia*

***Maimonides State Classical Academy, ul. Sadovnicheskaya 52/45, Moscow, 115035 Russia*

A new method for determining the cytotoxic potential, which characterizes the state of immune system cells, is proposed. With coherent phase microscopy perforin granules were identified in the cytoplasm of live CD8+ lymphocytes and characterized. A phase image-based quantitative estimation of the parameters of perforin granules in the cells was performed and average values were obtained: the projected area on the image plane was $15 \pm 7 \mu\text{m}^2$, the phase volume was equal to $0.94 \pm 0.24 \mu\text{m}^3$ and “dry weight” was $0.52 \pm 0.11 \text{ pg}$. Using the developed method the cytotoxic potential can be determined for a small number of living cells without the use of fluorescent probes.

Key words: lymphocytes, cytotoxic potential, perforin granules, interference microscopy