

Loomulike tappurrakkude aktiivsuse tsütomeetriline määramine

Anna Štšerbakova, Hele Everaus, Alar Aints – TÜ hematoloogia-onkoloogia kliinik ja Vähiuuringute Tehnoloogia Arenduskeskus

Võtmesõnad: loomulikud tappurrakud, tsütomeetria, loomulik immuunsus

Loomulikud tappurrakud (ingl *natural killers*, NK) on loomulikku immuunsust tagavad lümfotsüüdid, mis on võimelised hävitama teisi rakke ilma eelneva immunoloogilise kogemusega. Tänapäeval on võimalik kasutada NK-rakke immuunteraapia otstarbel. NK-rakkude lüütilist funktsiooni kontrollivad paralleelselt mitmed retseptorite kompleksid, millest paremini on uuritud KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*). NK-rakkude funktsionaalse aktiivsuse määramine on kuni viimase ajani põhinenud radioaktiivse kroomi märklaudrakkudest vabanemise mõõtmisel. Uued meetodid rakkude märgistamiseks ning tsütolüüsi tuvastamiseks võimaldavad NK aktiivsust määrata tsütomeetriliselt laiates piirides ja kombineerida funktsionaalse aktiivsuse mõõtmist immuunfenotüübi analüüsiga, mis aitab vältida radioaktiivse isotoobi kasutamisega seotud ohte ja piiranguid.

LOOMULIKUD TAPPURRAKUD – TUTVUSTUS

NK-rakud (*natural killers*, loomulikud tappurrakud) on loomuliku immuunsüsteemi rakulised efektorid. Nad moodustavad

5–15% perifeerse vere mononukleaarsetest rakkudest. Morfoloogiliselt on nad suured granulaarsed lümfotsüüdid. NK-rakud avastati 1960.–1970. aastatel kui rakud, mis põhjustasid transplantatsiooni hübriidresistentsust. NK-rakud arenevad väljaspool tüümust. Nende funktsioonide hulka kuuluvad viiruslikult nakatunud rakkude esmane hävitamine, immuunaktivatsioon IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, CCL3, CCL4 ja CCL5 kaudu, immuunprotsesside reguleerimine ebaküpsete dendriitrakkude hävitamise abil ning kasvajate kontrolli all hoidmine ja metastaseerumise pidurdamine.

NK- JA T-RAKKUDE ERINEVUSED

NK-rakkudel ei ole geneetiliselt ümberkorralduvaid retseptoreid. Siiski on nad võimelised hävitama märklaudrakke koosobivusantigeenidest (*major histocompatibility complex*, MHC) sõltumatult ega vaja eelnevat sensibiliseerumist. Märklaudrakkude äratundmine NK-rakkude poolt põhineb suuresti „puuduva enese“ („*missing self*“) kontseptsioonil (1). Selle teooria järgi on NK-rakud pidevalt valmis rakke hävitama. Normaalsete rakkude hävitamist pidurdavad signaalid, mis tekivad MHC-I valkude kokkupuutel NK-rakkude KIR valkudega. Kui märklaudrakud ei esita piisaval hulgal MHC-I valke (nagu viiruslikult nakatunud rakud) või esitavad valke, mis ei sobi NK KIR valkudega (nagu transplanteeritud rakud), vallandab see NK-rakkude gransüüm B ja perforiini rünnaku. NK-rakud ei ründa normaalsetes tingumustes epiteelirakke. Siiski, vananemise ja rakkude stressiga seo-

tud molekulid nagu MIC-A ja MIC-B indutseerivad NK-rakkudest sõltuvat lüüsi.

FUNKTSIOONID, PATOLOOGIAD, KASUTUSVÕIMALUSED

Esmalt tuvastati NK-rakkude positiivne roll vereloome tüvirakkude transplantatsiooni (VTT) juures, analüüsidest retrospektiivselt KIR/HLA sobivust haploidsete transplantatsioonide korral. „Haploidentne“ tähistab olukorda, kus pooled doonori HLA alleelidest on patsiendi omadega identsed, pooled aga erinevad. Näiteks võib tuua situatsiooni, kus doonor on patsiendi õde/vend või vanem. Täheledatai oodatust väiksemat leukeemia retsidiivide sagedust ägeda müeloidse leukeemiaga (AML) patsientidel, harvemat transplantaadi äratõuke sagedust ja paradoksaalselt väiksemat TPvH esinemissagedust, kui haploidentsel transplantaadil olid KIR inhibiitormolekulid, mille vastu retsiipiendil ei olnud ligandit. Alloreaktiivsed NK-rakkude kloonid, mis suutsid hävitada patsiendi leukeemilisi blaste, isoleeriti pärast transplantatsiooni patsientide verest (2). Sarnases uuringus, kus osales 130 patsienti, kes kõik said antitümotsütaarset globuliini konditsioneerimisprogrammi osana, läbides vähemalt osalise T-rakkude depletsiooni, oli NK alloreaktiivsusega patsientidel pikem üldise elulemuse ja haigusvaba elulemuse keskus, võrreldes patsientidega ilma NK alloreaktiivsusega. Transplantatsiooniga seotud suremus nendes gruppides oli 6 ja 40%. Retsidiivide sagedus patsientidel, kes said transplantaadi KIRi ligandi sobimatusega või ilma, oli vastavalt 6 ja 21% (3). Neljakümne suure riskiga ja haploidense transplantaadiga AML-patsiendi analüüs näitas oluliselt väiksemat retsidiivi sagedust, kui doonori NK-rakud olid võimelised alloreaktiivseteks reaktsioonideks (15 vs 68%) (4).

Seega, NK-rakkude alloreaktiivsus mängib vere tüvirakkude transplantatsioonis olulist rolli. Sobivalt valitud haploidentne doonori-retsiipiendi paar, kelle vahel toimub ühesuunaline NK alloreaktiivsusreaktsioon, on saanud nimeks „täiuslik sobimatus“ (5).

Doonori lümfotsüütide (põhiliselt T-rakud) infusiooni (DLI) on kasutatud retsidiiviraviks VTT juures alates 1990. aastast (6). Kuigi see meetod on tõhus retsidiiviravimiseks, põhjustavad ülekantud T-rakud TPvH, mis on sageli eluohtlik komplikatsioon (III–IV aste). DLId kasutatakse haploidense transplantatsiooni juures harva.

Arvestades NK-rakkude sobilikke omadusi, on mitmed grupid uurinud NK-rakkude kasutamist DLI tarbeks eesmärgiga konsolideerida ülekannet ning vältida retsidiivi TPvH-d põhjustamata. Enamik uuringuid on kasutanud värskest eraldatud NK-rakke, mida mõnikord on rakukultuuri tingimustes 1–2 päeva aktiveeritud. Tulemused näitavad, et NK-rakud ei põhjusta TPvH-d ja on võimelised remissiooni indutseerima (7). Miller jt publitseerisid hiljuti tulemused, kus NK-rakke oli kasutatud adoptiivseks immuunteraapiaks ilma VTTta. NK-rakkude teraapiaga oli võimalik indutseerida remissiooni eriti AMLi korral, soliidtuumorid ja lümfoidsed leukeemiad on üldiselt NK-rakkude suhtes pigem resistentsed, vähemalt siiani kasutatud koguste juures. Milleri uuring näitas samuti, et *in vivo* on võimalik NK-rakkude homeostaatiline ekspansioon kõrgdoosikemoterapia kasutamisel, mis oli seotud seerumi IL-15 kõrgeenenud tasemega.

NK-RAKKUDE KASUTAMINE TRANSPLANTATSIOONI ETTEVALMISTAMISEKS

Üheks TPvH vallandavaks teguriks on patoloogiline immuunaktiivsus patsiendi transplantatsiooniks ettevalmistamise ajal. Sellega kaasneb dendriitrakkude aktiivsus. Need rakud esitlevad patsiendi antigeene doonori T-rakkudele. NK-rakud on võimelised hävitama dendriittrake nagu kõiki teisi veresüsteemi rakke, seega vähendades ning isegi vältides TPvH tekkimist. Loomkatsed on näidanud, et alloreaktiivsete doonori NK-rakkude ülekande enne tüvirakkude transplantatsiooni hoiab ära TPvH tekke ning võimaldab isegi mittesobivaid transplantaate üle kanda ilma TPvH

histoloogiliste tunnuste ilmnemiseta (2). Samuti toimus NK ülekande saanud hiirtel tunduvalt paremini implanteerumine: kõik leukotsüütide populatsioonid taastusid kiiremini, sealhulgas ka doonori päritoluga dendriittrakud (A. Velardi. Ceppellini immunoloogia suvekooli loeng. Napoli, 2005).

NK-rakkude soodsad toimed immuun-teraapias ja VTT korral on kokku võetud tabelis 1.

Tabel 1. NK-rakkude soodsad toimed immuunteraapias ja VTT korral

NK-rakkude toime	Bioloogiline mehhanism
1. Äratõuke vähenemine	Patsiendi T-rakkude hävitamine
2. Retsidiivi vähenemine	Leukeemiliste rakkude hävitamine
3. TPvH vähenemine	Patsiendi dendriitrakkude hävitamine
4. Nakkuste vähenemine	Kiirem immuuntaastumine

MIKS MÄÄRATAKSE NK AKTIIVSUST?

NK-rakkude aktiivsuse mõõtmine on vajalik NK-rakkude kasutamisel immunoterapiaks ja enne transplantatsiooni, et selgitada doonori ja retsiptiendi rakkude omavahelist reaktiivsust, samuti ka mõnede NK-rakkudega seotud geneetiliste haiguste tuvastamisel. NK-rakkude puuduliku aktiivsusega seotud pärilikud haigused on perekondlikud hemofagotsütaarsed lümfohistiotsütoosid (FHL1-FHL4), mis on seotud mutatsioonidega perforiini geenis *PRF1* (FHL2) (8) ning geenides *munc13-4* (FHL3) (9) ja *syntaxin-11* (FHL4) (10) (FHL1-geeni ei ole kindlaks tehtud, kuid selle asukoht on kaardistatud 9q22 kromosoomipiirkonda (11)); samuti Chédiaki-Higashi sündroom, (*CHS1/LYST* geen) (12) ja Griscelli sündroom (*Rab27a* geen) (13), mis avalduvad muu hulgas NK-rakkude lüütilise aktiivsuse puudumise ja T-rakkude ning monotsüütide kontrollimatu aktiviseerumisena; ning X-liiteline lümfoproliferatiivne haigus (*SH2D1A/SAP* geen), mis avadub üliraske-

tes herpesviirusinfektsioonides (põhiliselt Epstein-Barr viirus) ning on seotud 2B4 retseptori signaaliülekande regulatsiooni häirega (14). Kõik need geneetilised haigused on siiski üsna haruldased.

SENISED MEETODID, PROBLEEMID

Alates NK-rakkude avastamisest 1970. aastatel on nende lüütilist aktiivsust mõõdetud radioaktiivse naatriumkromadi ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) söötmesse vabanemise määramise kaudu eelnevalt märgistatud märklaudrakkudest beetaloenduri abil. Selline meetod nõuab spetsiaalset aparatuuri ning radioaktiivse isotoobiga töötamiseks kohandatud laborit, väljaõpet ning erivahendeid.

Tsütomeetri kasutamine selleks otstarbeks annab võimaluse ühendada rakkude tsütolüütilise aktiivsuse mõõtmist immuunfenotüübi ning rakupopulatsioonide arvukuse mõõtmisega, mis on immunoloogiliste analüüside puhul igal juhul vajalik.

MATERJALID JA MEETODID

RAKUD

Märklaudrakud – K562 (inimese müeloid-leukeemia rakuliin), Namalwa (inimese B-rakulise lümfoomi rakuliin) ja 721.221 (inimese B-lümfoblastoidne rakuliin) – kasvatati RPMI 1640 söötmes (Invitrogen Gibco) 10% vasikaseerumiga (Invitrogen Gibco) tiheduse juures 250–500 000 rakku/ml ning söödet vahetati iga 2 päeva järel.

Doonori veri koguti pärast informeeritud nõusoleku saamist Utrechti Ülikooli haiglas Utrechti Ülikooli eetikakomisjoni juhiste kohaselt ning Tartu Ülikooli hematoloogia ja onkoloogia kliiniku hematoloogia ja luuüdi transplantatsiooni osakonnas Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee juhiste kohaselt. Lümfootsüüdid eraldati Lymphoprep Ficoll-Paque PLUSi (Amersham Biosciences) kiti abil ning külmutati vitaalselt edasiseks kasutamiseks.

NK-rakke kasvatati CellGro SCGM (CellGenix GmbH) söötmes 5% inimeseserumi, 1000 ü/ml IL-2 (Proleukin, Chiron) ja 10 ng/ml OKT3 antikeha juuresolekul. Efek-

torrakke analüüsiti tsütomeetriliselt antikehadega NKp46-APC, CD3-PerCP-Cy5.5, CD4-FITC, CD25-PE, CD19-APC-Cy7 ja CD33-PE-Cy7 (komplekt 1) ning CD158a-FITC, CD56-PE CD3-PerCP-Cy5.5, NK-G2D-APC, CD19-APC-Cy7 ja CD33-PE-Cy7 (komplekt 2). Kõik antikehad osteti Becton Dickinsonist.

Märklaudrakkude märgistamiseks kasutati karboksüfluorestsini suksiinimidüülestri (CFSE, Invitrogen Gibco) 1 μ M lahust RPMI 1640 söötmes 15 min 37° C juures. Märgistatud ja pestud rakud kanti pipetiga 96 kaevuga V-kujulise põhja ristlõikega mikrotiiterplaadile (10 000 raku kaevu kohta) ning lisati erineval hulgal efektorrakke. Inkubatsioon toimus 37° C juures 5% CO₂ inkubaatoris 4 tundi, misjärel lisati rakumembraani permeabiliseerumise tuvastamiseks 7-aminoaktinomütsiin D (7-AAD, Molecular Probes) lahust lõppkontsentratsiooniga 3 μ g/ml.

TSÜTOMEETRIA

Analüüsideks kasutati Becton Dickinson LS-RII masinat 488 nm sinise ja 633 nm punase laseriga ning filtritega kuue fluorestsentsignaali analüüsiks (sinine laser: 530/30 nm, FITC/GFP; 575/26 nm, PE/PI; 695/40 nm, PerCP-Cy5.5/7-AAD; 780/60 nm, PE-Cy7 ja punane laser: 660/20 nm, APC/AlexaFluor647; 780/60 nm, APC-Cy7).

Analüüsivate rakkude eraldamiseks rakufragmentidest määrati R1 – rakkude piirkond (vt jn 1A). R2 – märklaudrakkude piirkonna – määramiseks analüüsiti CFSE ja 7-AADga värvitud märklaudrakke (vt jn 1B). R3 – permeabiliseerunud märklaudrakkude piirkonna – leidmiseks analüüsiti TritonX-100-ga lüüsitud märklaudrakke (vt jn 1C). Mõlemad piironnad tuleks võtta piisavalt kitsad, et välistada rakufragmentide sattumine analüüsi piirkonda. Seejuures tuleb jälgida, et rakupopulatsioon võib olla 7-AAD teljel kaheosaline. R4 – efektorrakke populatsioon – leiti samuti 7-AAD/CFSE plotil (vt jn 1D).

Kontrollväärtuse L_{max} leidmiseks analüüsiti rakke, mis olid inkubeeritud 1% TritonX-

100 (Sigma) lahuses, mis lüüsib kõik rakud (vt jn 1C ja E), ja L_{spont} leidmiseks analüüsiti märklaudrakke, mis olid inkubeeritud ilma efektorrakkudeta (vt jn 1B ja F).

Tsütolüüsi efektiivsuse määramiseks võrreldi NK-rakkudega koinkubeeritud märklaudrakkude lüüsi samades tingimustes inkubeeritud kontrollrakkude lüüsi. Spetsiifiline tsütotoksilisus (C) väljendatakse valemil abil $C = (L_{exp} - L_{spont}) / (L_{max} - L_{spont}) \times 100$, kus L (lüüs) on $L = R3 / R2 \times 100$, kus R2 on märklaudrakkude hulk ja R3 on 7-AAD-positiivsete märklaudrakkude hulk.

Andmete analüüsiks kasutati MS Office'i paketti ja statistikaprogrammi GraphPad Prism.

TULEMUSED

Pärast kahepäevast *in vitro* ekspansiooni oli NK-rakkude osa kultuuris suurenenud kuni 90%-ni. Tsütomeetriline analüüs näitas, et ligikaudu 90% rakkudest olid CD56+CD3-NKG2D+NKp46+ (NK-rakud) ja 10% CD3+CD4- T-rakud (vt jn 2). Erinevad antikehade kombinatsioonid andsid sama tulemuse ainult mõneprotsendise erinevusega.

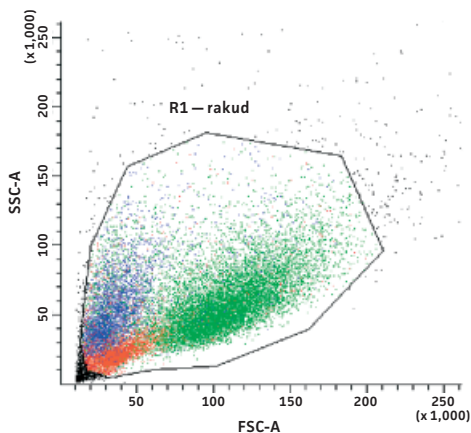
TSÜTOMEETRIA VÕIMALDAB MÄÄRATA NK AKTIIVSUST LAIADES PIIRIDES

Tsütotoksilisuse mõõtmisel on vajalik jälgida efektor-/märklaudrakkude suhet. Käesolevas töös varieerisime efektor-/märklaudrakkude suhet laiades piirides (0,05–20). Pipeteerimisvigade vältimiseks arvestasime ka tegelikku efektor-/märklaudrakkude vahetõrget tsütomeetri plotil (vt jn 3). Spetsiifilist tsütotoksilisust C väljendatakse seega kindla N väärtuse juures $N = (R4 / R2) \times NK\% / 100$. NK tsütotoksilisust on 5% täpsusega tsütomeetriliselt võimalik määrata $N = 0,1-10$ vahemikus (vt jn 4).

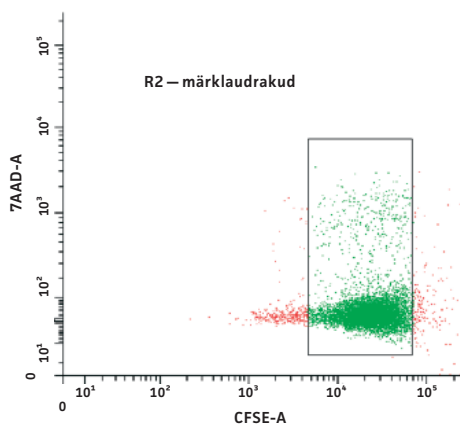
NK TSÜTOTOKSILINE FUNKTSIOON JÄRGIB MICHAELISE-MENTENI SEADUST

C-N seos ei ole lineaarne, vaid järgib massitoime (Michaelise-Menteni) seadust. Nelja erineva rakuliini analüüsil selgus, et märk-

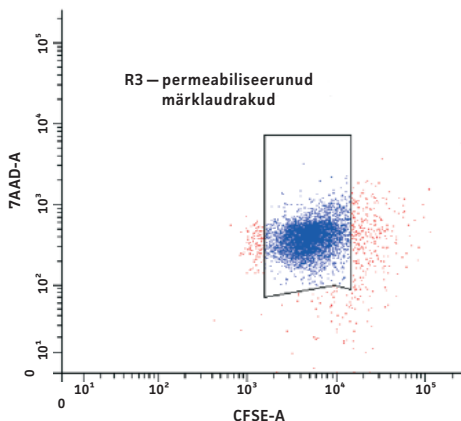
A.



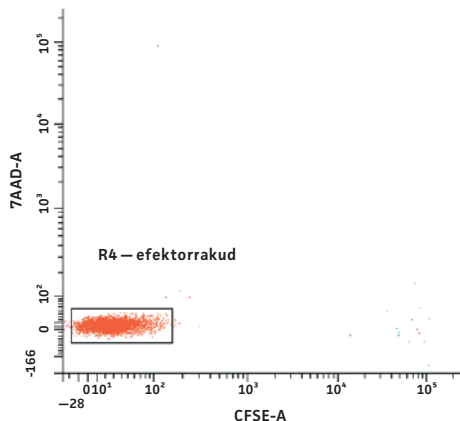
B. CFSE ja 7-AAD-ga värvitud märklaudrakud



C. TritonX-100-ga lüüsitud märklaudrakud



D. Efektorrakud



E. Tuub: CFSE ja 7-AAD-ga värvitud märklaudrakud

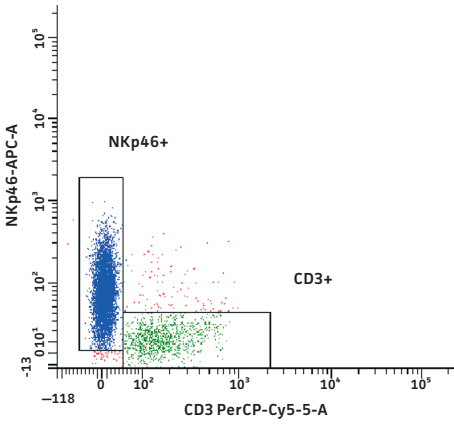
Populatsioon	# Sündmused	% lähtest	% kõigist
■ Kõik	10000		100,0
■ R1 - rakud	9382	93,8	93,8
■ R2 - märklaudrakud	8852	94,4	88,5
■ R3 - permeabiliseerunud märklaudrakud	360	4,1	3,6
■ R4 - efektorrakud	1	0,0	0,0

F. Tuub: TritonX-100-ga lüüsitud märklaudrakud

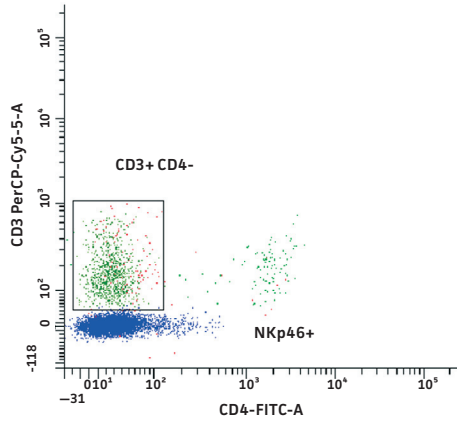
Populatsioon	# Sündmused	% lähtest	% kõigist
■ Kõik	10000		100,0
■ R1 - rakud	7624	76,2	76,2
■ R2 - märklaudrakud	7222	94,7	72,2
■ R3 - permeabiliseerunud märklaudrakud	7081	98,0	70,8
■ R4 - efektorrakud	0	0,0	0,0

Joonis 1. Rakupopulatsioonide defineerimine tsütomeetrial. **A:** R1 määrab analüüsitava rakkude populatsiooni Ssc/Fsc plotil. Oluline on kaasa arvata ka kõrge Ssc / madala Fsc surnud rakud, kuid mitte väikesi rakufragmente. **B:** R2 määrab 7-AAD/CFSE plotil märklaudrakkude populatsiooni. **C:** R3 määrab 7-AAD/CFSE plotil permeabiliseerunud märklaudrakkude populatsiooni. **D:** R4 määrab 7-AAD/CFSE plotil efektorrakkude populatsiooni. **E:** Populatsioonide hierarhia ning kontrollväärtused maksimaalse tsütolüüsi (L_{max}) puhul. **F:** kontrollväärtused spontaanse tsütolüüsi (L_{spont}) puhul.

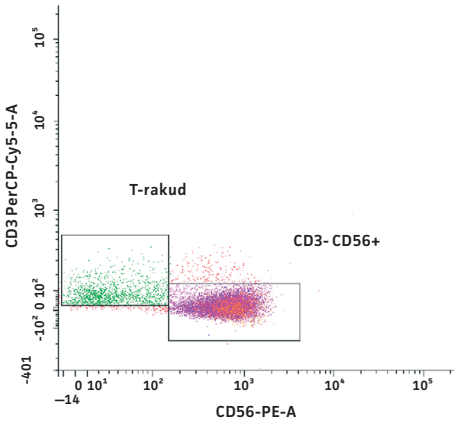
Efektorrakud



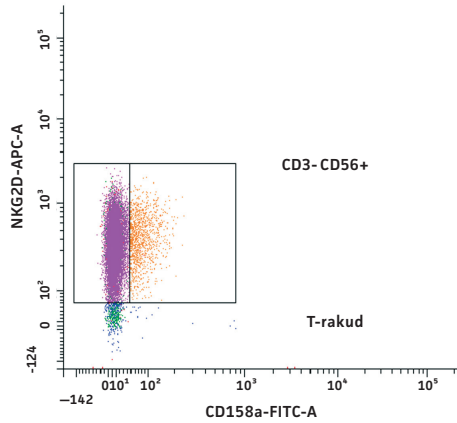
Efektorrakud



Efektorrakud



Efektorrakud



A. Tuub: Efektorrakud

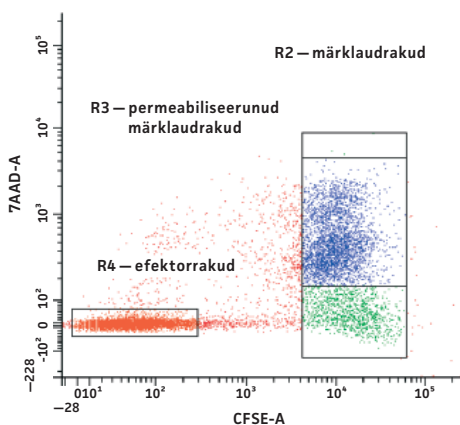
Populatsioon	# Sündmused	% lähtest	% kõigest
■ Kõik	10000		100,0
■ Rakud	8523	85,2	85,2
■ NKp46+	7430	87,5	74,3
■ CD3+	953	11,2	9,5
■ CD3+ CD4-	854	89,6	8,5

B. Tuub: Efektorrakud

Populatsioon	# Sündmused	% lähtest	% kõigest
■ Kõik	20000		100,0
■ Rakud	16829	84,1	84,1
■ CD3- CD56+	15008	89,2	75,0
■ NKG2D+	14612	97,4	73,1
■ CD158a+	1281	8,8	6,4
■ T-rakud	1437	8,5	7,2

Joonis 2. Efektorrakkude tsütomeetriline analüüs. **A:** Antikehade kombinatsioon 1; **B:** Antikehade kombinatsioon 2.

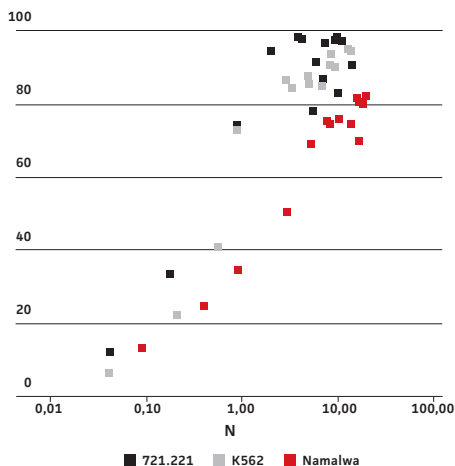
A.



B. Tuub: Tsütotoksilisuse reaktsioon, efektor-/märklaudrakud suhtes 2:1

Populatsioon	# Sündmused	% lähtest	% kõigist
■ Kõik	12620		100,0
■ R1 – rakud	11696	92,7	92,7
■ R2 – märklaudrakud	4079	34,9	32,3
■ R3 – permeabiliseerunud märklaudrakud	3048	74,7	24,2
■ R4 – efektorrakud	6418	54,9	50,9

Joonis 3. Tsütotoksilise reaktsiooni analüüs. A: 7-AAD/CFSE plot; B: populatsioonide hierarhia ja väärtused.



Joonis 4. Tsütotoksilise analüüsi piirkond. Analüüsi tundlikkus võimaldab määrata tsütotoksilisust (C) efektor-/märklaudrakkude suhte (N) vahemikus 0,1–10.

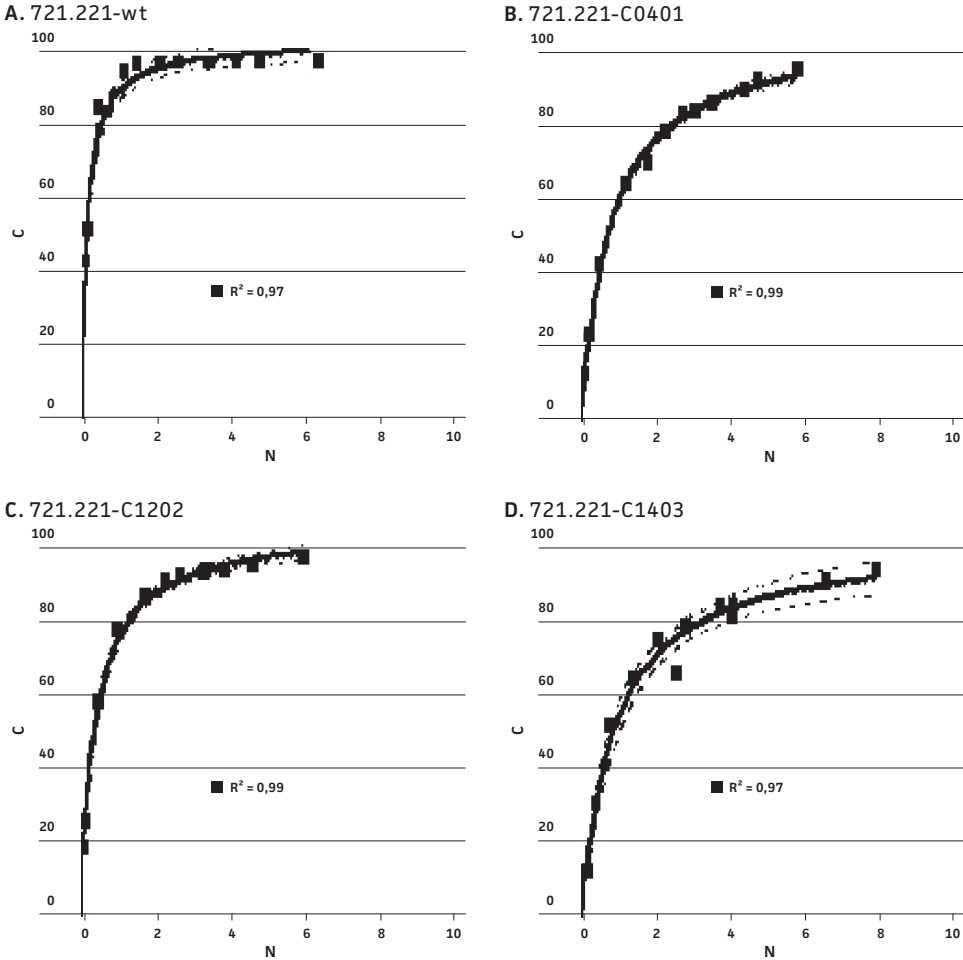
laudrakkude tundlikkus NK-rakkude poolse lüüsi suhtes on erinev, kuid allub sarnasele mehhanismile (vt jn 5). 721.221 rakuliinid

on suure lüüsitundlikkusega, saavutades maksimaalse lüüsi väärtuse 100%. Rakkude lüüsitundlikkus sõltub koosobivusantigeeni-ekspressioonist. Seetõttu on katses kasutatud 721.221 alaliinid stabiilselt transfekteeeritud erinevate koosobivusantigeenidega. Nende rakuliinide poolmaksimaalse lüüsi N väärtused (see tähendab N väärtused, kus on lüüsitud 50% märklaudrakkudest), on toodud tabelis 2.

Tabel 2. 721.221 rakuliinide poolmaksimaalse lüüsi väärtused

Rakuliin	NC ₅₀
721.221-wt	0,15
721.221-C0401	0,77
721.221-C1201	0,39
721.221-C1401	0,87

95% usaldusintervall C_{max} juures oli kõigil juhtudel ± < 5%.



Joonis 5: Tsütotoksiline reaktsioon järgib massitoime reeglit. Graafikud kujutavad NK tsütotoksilisust nelja erineva rakuliini vastu. Näidatud on parima sobivuse kõver, 95% konfidentsusintervall ja R2 väärtus. Regressioonianalüüsil on kasutatud ühe seondumiskohaga retseptori-ligandi mudelit. Rakuliinid **A:** 721.221-wt, **B:** 721.221-C0401, **C:** 721.221-C1202, **D:** 721.221-C1403.

ARUTELU

NK-rakkude immuunfenotüübi kindlakstegemisel kasutati algselt eelkõige nende T- ja B-raku markerite puudumist ning CD16 ja CD56 ekspressiooni. CD16 ja CD56 ei ole kahjuks NK-spetsiifilised, CD16 ekspresseerub veel neutrofiilidel ja CD56 esineb ka T-rakkudel ning neuronitel. Viimasel ajal on leitud ka rühm NK-spetsiifilisi pinnamarkereid, mis kuuluvad NK-rakkude aktivatsioonireseptorite hulka. Nende kasutamine tsütomeetrias annab võimaluse NK-rak-

ke üheselt positiivselt määrata. NKp30 ja NKp46 ekspresseeruvad kõigil NK-rakkudel nii puhkeolekus kui ka aktivatsiooniseisundis, lisaks ekspresseerub NKp44 aktiiveeritud NK-rakkudel.

In vitro ekspansiooni meetodite arendamine on võimaldanud planeerida ekspandeeritud NK-rakkude kasutamist immunoterapeutilistel eesmärkidel. NK-rakkude ekspansiooni efektiivsus ja pinnamarkerite ekspressioon sõltuvad doonori KIR-HLA geenide kombinatsioonist (andmed avalda-

takse eraldi publikatsioonis). Seejuures on oluline mõõta kasvatatud rakkude aktiivsust nii standardsete testrakkude kui ka konkreetse patsiendi normaalsete ja pahaloomuliste rakkude vastu. Tsütomeetriline meetod annab selliste analüüside tegemisel eelise, sest paljud primaarsed rakud, eriti tuumorirakud, ei omasta märkimisväärsel määral radioaktiivset kroomi. Teisi tsütolüüsi määramise meetodeid, nagu tsütoplasmaatilise LDH (laktaadi dehüdrogenaasi) vabanemise mõõtmisel põhinev meetod, häirib NK-rakkudest vabanev LDH. CFSE seevastu värvib tõhusalt kõiki rakutüüpe, sest värving põhineb tsütoplasmaatiliste esteraaside toimel. Reaktsiooni käigus tekkiv reaktiivne aldehüüdgrupp põhjustab värvaine seondumise rakuvalkudega ning see tagab värvingu püsimise ka rakumembraani lagunemise korral. 7-AAD, mis seondub DNAGA ja tungib ainult kahjustatud membraaniga rakkudesse, on propiidiidumjodiidiga võrreldes pikemalainelise emissioonimaksimumi ning kitsama spektriga, mis kergendab analüüsi.

Analüüsi tuleks teha erinevate efektor-/märklauadrakkude suhte juures, sest eri doonorite rakkude aktiivsus võib erineda. Tüüpilisel juhul langeb spetsiifilise tsütotoksilisuse näitaja (C) alla 5% $N = 0,1$ juures ning lüüs küllastub $N = 5$ kuni $N = 10$ juures. N tähistab sealjuures NK-rakkude absoluut-hulka ühe märklauadraku kohta.

NK-rakkude tsütokoksiline mõju allub massitoime seadusele. Lüüsi intensiivsuse sõltuvust efektorrakkude hulgast kirjeldab seejuures ühe seondumiskohaga retseptori-ligandi mudel. On teada, et NK-rakud on võimelised teisi rakke lüüsima paljude

erinevate aktivatsioonisignaali tulemusel ning isiklikud erinevused NK-rakkude aktiivsuses on märkimisväärsed. Erinevad märklauadrakud jällegi ekspresseerivad erinevaid ligandeid aktivatsiooni- ning pidurdusretseptorite jaoks. Oluline on märkida, et kasutatud testrakud K562 ja 721.221 ei ekspresseeri MHC-I grupi antigeene, mis seondudes KIR-L molekulidega NK-rakkudel on inhibeeriva toimega. 721.221 HLA-C geenidega transfekteeeritud subliinid ja Namalwa rakuliin, mis ekspresseerib MHC-I antigeene, olid lüüsi eest osaliselt kaitstud.

KOKKUVÕTE

NK-rakkude funktsionaalne analüüs on vajalik nende toime uurimiseks rakulise immu-noteraapia ettevalmistamisel ja jälgimisel. NK-rakkude toime sõltub märklauadrakkude tüübist ning nende poolt ekspresseeritavatest pinnaretseptoritest, alludes seejuures massitoime seadusele. Tsütomeetriline analüüs on täpne (standardhälve C_{max} juures 2,0–2,6; 95% usaldusvahemik $\pm < 5\%$). Tsütotoksilisuse tsütomeetriline analüüs on teostatav radioaktiivseks tööks kohandamata, näiteks kliinilistes laborites ka tsütomeetri vanemate mudelite abil.

TÄNUAVALDUS

Töö valmimist on toetanud Eesti Teadusfond (grant ETF-6976), Haridus- ja Teadusministeerium (SF0180161s08 “Kasvajaliste haiguste märklauadravi – peremeesorganismi mõjutamise võimalused”), Ettevõtlike Arendamise Sihtasutus ja Euroopa Liidu struktuurifondid. Autorid tänavad prof Marcel Tilanust ja dr Jennifer Schelleckensi töös kasutatud rakkude eest.

Alar.Aints@ut.ee

KIRJANDUS

1. Ljunggren HG, Karre K. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med* 1985;162(6):1745–59.
2. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295(5562):2097–100.
3. Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* 2003;102(3):814–9.
4. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, et al. Exploitation of alloreactive NK cells in adoptive immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol* 2005;17(2):211–7.
5. Karre K. Immunology. A perfect mismatch. *Science* 2002;295(5562):2029–31.
6. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990;76(12):2462–5.

7. Passweg JR, Stern M, Koehl U, et al. Use of natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005;35(7):637–43.
8. Dufourcq-Lagelouse R, Pastural E, Barrat FJ, et al. Genetic basis of hemophagocytic lymphohistiocytosis syndrome (Review). *Int J Mol Med* 1999;4(2):127–33.
9. Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, et al. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 2003;115(4):461–73.
10. zur Stadt U, Schmidt S, Kasper B, et al. Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Hum Mol Genet* 2005;14(6):827–34.
11. Ohadi M, Lalloz MR, Sham P, et al. Localization of a gene for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis at chromosome 9q21.3-22 by homozygosity mapping. *Am J Hum Genet* 1999;64(1):165–71.
12. Karim MA, Nagle DL, Kandil HH, et al. Mutations in the Chediak-Higashi syndrome gene (CHS1) indicate requirement for the complete 3801 amino acid CHS protein. *Hum Mol Genet* 1997;6(7):1087–9.
13. Rath S, Jain V, Marwaha RK, et al. Griscelli syndrome. *Indian J Pediatr* 2004;71(2):173–5.
14. Nakajima H, Cella M, Bouchon A, et al. Patients with X-linked lymphoproliferative disease have a defect in 2B4 receptor-mediated NK cell cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2000;30(11):3309–18.

SUMMARY

Cytometric analysis of natural killer cell activity

AIM. Analysis of cytotoxic functions is required for characterization of cells for cell-based immunotherapy. However, the radioisotope-based methods used so far require specific working conditions and equipment. In order to optimize a non-radioactive method for analysis cytotoxic function of in vitro cultured natural killer (NK) cells for use in clinical laboratories, we investigated use of cytometry.

METHODS. By using CFSE and 7-AAD double labelling of target cells and simultaneous multiparameter analysis of effector cells, we optimized the analysis of cytotoxicity as a cytometry-based assay.

RESULTS. Our results established the useful range of effector/target ratio to be 0.1 to 10. We found that cytolysis depends on the effector/target ratio according to the law of mass action. The in vitro cultivated NK cells are highly cytotoxic, yet their function is regulated by target cell histocompatibility antigens (MHC I). The standard error of our assays at C_{max} was 2.0–2.6% and 95% confidence interval $\pm < 5\%$.

CONCLUSION. We conclude that cytometric analysis of cytotoxic function is highly sensitive, consistent, and well suited for laboratories not equipped for work with radioisotopes.