

КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ Т-ЛИМФОЦИТОВ

SHORT TITLE: T LYMPHOCYTE CELL CYCL

10.46235/1028-7221-17127-NAT

НОВЫЙ ПОДХОД К АНАЛИЗУ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА Т-ЛИМФОЦИТОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Сайдакова Е. В. ¹

¹ «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук», Пермь, Россия

КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ Т-ЛИМФОЦИТОВ
SHORT TITLE: T LYMPHOCYTE CELL CYCL

10.46235/1028-7221-17127-NAT

**NEW APPROACH TO ANALYZING THE T LYMPHOCYTE CELL CYCLE
USING FLOW CYTOMETRY**

Saidakova E. V. ^a

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia.

Резюме

Способность Т-лимфоцитов к интенсивной пролиферации является основой формирования как естественного, так и поствакцинального иммунитета. Соответственно, нарушение деления Т-клеток может отражаться на восприимчивости человека к заболеваниям и эффективности вакцинации. Подход, который позволит определять не только долю делящихся клеток и активность пролиферации, но и фазы клеточного цикла, значительно расширит возможности исследования причин и механизмов нарушения деления Т-лимфоцитов.

Цель. Апробировать новый подход к анализу клеточного цикла Т-лимфоцитов разной степени зрелости с использованием проточной цитометрии.

Материалы и методы. Объектом исследования служила периферическая кровь, полученная от здоровых доноров. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли центрифугированием в градиенте плотности диаколла стандартным методом и стимулировали фитогемагглютинином, после чего культивировали в течение 4 суток (37°C, 5 % CO₂). Активированные лейкоциты окрашивали витальным красителем LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain и антителами CD3 BV605, CD4 PE, CD8 BV510, CCR7 PE/Cy7 и CD45RO APC-eF780. Клетки фиксировали и пермеабелизировали, после чего окрашивали антителами к pRb AF488 и pHH3 AF647, а также красителем DAPI. Анализ клеток проводили на проточном цитометре CytoFLEX S.

Результаты. Установлено, что предложенный подход позволяет различать Т-лимфоциты, находящиеся в G₀, G₁, S, G₂ и M-фазах клеточного цикла. Более того, разработанная панель флуоресцентных красителей и антител позволяет одновременно идентифицировать CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки различной степени зрелости. Так, в пилотном исследовании было установлено количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, вступивших в активные фазы клеточного цикла, и особенности их распределения по фазам. Также были выявлены отличия паттернов пролиферации наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, соответствующих клеток центральной и эффекторной памяти, а также терминальных эффекторов.

Выводы. Предложенный метод позволяет проводить комплексный анализ клеточного цикла CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов разной степени зрелости с использованием проточной цитометрии.

Ключевые слова: CD4⁺ Т-лимфоциты, CD8⁺ Т-лимфоциты, наивные клетки, клетки памяти, клеточный цикл, проточная цитометрия.

Abstract

Intensive proliferation of T lymphocytes is essential for the development of both natural and vaccine-induced immunity. As a result, impaired T cell proliferation could influence disease susceptibility and vaccination effectiveness. A methodology enabling determination of not just the fraction of dividing cells and the proliferation rate, but also the cell cycle phases, would substantially enhance our understanding of the causes and mechanisms behind impaired T lymphocyte division.

Aim. This study aimed to validate a novel approach for analyzing the cell cycle of T lymphocytes at different maturational stages via flow cytometry.

Materials and methods. The study utilized peripheral blood samples collected from healthy individuals. Peripheral blood mononuclear cells were isolated through density-gradient centrifugation, stimulated with phytohemagglutinin, and cultivated for 4 days under standard conditions (37°C, 5 % CO₂). Activated leukocytes were labeled with the LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain and antibodies specific for CD3 BV605, CD4 PE, CD8 BV510, CCR7 PE/Cy7, and CD45RO APC-eF780. Fixed and permeabilized cells were further stained with antibodies targeting pRb AF488 and pHH3 AF647, along with the DAPI nuclear stain. Flow cytometric analysis was conducted using a CytoFLEX S instrument.

Results. The proposed technique successfully distinguished T lymphocytes in the G₀, G₁, S, G₂, and M phases of the cell cycle. Moreover, the designed fluorescence panel permits concurrent detection of CD4⁺ and CD8⁺ T cells at diverse maturation states. During the pilot study, the numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes progressing into active cell cycle phases were quantified, along with their phase-specific distributions. Differences in proliferation dynamics were also observed among naive CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, central memory, effector memory, and terminal effector subsets.

Conclusion. The proposed method enables comprehensive evaluation of the cell cycle progression in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes across distinct maturation stages through flow cytometry.

Keywords: CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, naive cells, memory cells, cell cycle, flow cytometry.

1 **1 Введение**

2 Т-лимфоциты играют важную роль в адаптивном иммунном ответе,
3 обеспечивая защиту от инфекций, опухолей и аутоиммунных заболеваний.
4 Способность этих клеток циркулировать в организме в течение
5 продолжительного времени и резко увеличивать свое количество при
6 столкновении с патогеном является основой формирования стойкого
7 поствакцинального иммунитета [6, 7, 11]. Соответственно, нарушение деления
8 Т-лимфоцитов может отражаться на эффективности вакцинации и
9 способности противостоять заболеваниям различного генеза.

10 В настоящее время для изучения пролиферации Т-лимфоцитов
11 применяются несколько подходов, задействующих проточную цитометрию.
12 Первый – окрашивание клеток 5(6)-карбоксихлорофлуоресцеин диацетат-N-
13 сукцинимидиловым эфиром (CFSE) или его аналогами [2]. Эти
14 флуоресцентные красители способны проникать внутрь клеток и
15 образовывать стабильные ковалентные связи с аминогруппами белков. При
16 каждом делении меченные красителем родительские белки равномерно
17 распределяются между дочерними лимфоцитами. Это приводит к
18 дискретному снижению интенсивности флуоресценции, что позволяет
19 отслеживать количество делений клеток. Второй подход – добавление в среду
20 для культивирования аналога тимидина 5-бromo-2'-дезоксиуридина (BrdU) [9].
21 Пролиферирующие лимфоциты включают его в состав ДНК дочерних клеток
22 во время синтеза новой цепи (S-фаза клеточного цикла), что позволяет
23 идентифицировать активно делящиеся клетки по наличию в их генетическом
24 материале синтетического нуклеотида. Для обнаружения
25 инкорпорированного BrdU используются меченые флуорохромами
26 моноклональные антитела. Этот подход позволяет определить долю
27 пролиферирующих клеток в популяции и проанализировать количество
28 клеток в S-фазе. Третий подход – детекция внутриклеточных и поверхностных
29 белков, характерных для делящихся иммуноцитов [8]. Такие молекулы, как Ki-
30 67 и CD71 экспрессируются в активных фазах клеточного цикла и не
31 присутствуют на покоящихся лимфоцитах [1]. Для детекции эти белки также
32 окрашивают флуоресцентными моноклональными антителами. Метод
33 позволяет оценить количество пролиферирующих Т-лимфоцитов. Четвертый
34 подход – оценка содержания нуклеиновых кислот в пролиферирующих
35 клетках с использованием флуоресцентных красителей, способных
36 связываться с двуспиральной ДНК пропорционально ее количеству, таких как
37 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI) [5]. Так как в процессе деления
38 содержание ДНК временно увеличивается, метод позволяет отличить клетки с
39 диплоидным набором хромосом (2n) от клеток, удвоивших их количество в
40 процессе митоза (4n).

41 Несмотря на разнообразие, вышеописанные подходы не позволяют
42 оценить эффективность прохождения клетками отдельных фаз клеточного

43 цикла. Более того, не каждая методология дает возможность
44 идентифицировать субпопуляционную принадлежность анализируемых
45 клеток. Наличие метода, позволяющего одновременно анализировать
46 фенотип и фазу клеточного цикла, значительно расширит возможности
47 исследователей.

48 Цель настоящей работы: апробировать новый подход к анализу
49 клеточного цикла Т-лимфоцитов методом проточной цитометрии.

50 2 Материалы и методы

51 Объектом исследования служили мононуклеарные клетки, полученные
52 от относительно здоровых доноров крови (n=3). Проведение исследования
53 было одобрено этическим комитетом “ИЭГМ УрО РАН” (рег. № комитета
54 IRB00010009). Каждый участник подписал информированное согласие.

55 Кровь объемом до 10 мл забирали натощак из кубитальной вены в
56 вакуумные пробирки, содержащие литий гепарин (Weihai Hongyu Medical
57 Devices Cj., Ltd; Китай).

58 Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования двукратно
59 разведенной фосфатно-солевым буферным раствором Дульбекко (DPBS,
60 Gibco; США) крови в градиенте плотности Диаколла (1,077 г/мл, Диаэм;
61 Россия). Выделенные клетки собирали, дважды отмывали раствором DPBS,
62 подсчитывали в камере Горяева.

63 Выделенные клетки стимулировали фитогемагглютинином (ФГА; Serva,
64 Германия) в конечной концентрации 15 мкг/мл. Лейкоциты культивировали в
65 96-луночных планшетах (Costar, США) в полной питательной среде (ППС),
66 содержащей RPMI-1640 (BioinnLabs, Россия), 10 % ЭТС, 100 Ед./мл
67 пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, Inc.,
68 США), в течение 4 суток (37°C, 5 % CO₂). По окончании времени инкубации
69 клетки собирали и для фенотипического анализа окрашивали витальным
70 красителем LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain (LD, Life
71 Technologies, США) и коктейлем анти-CD3-BV605, анти-CD4-PE, анти-CD8-
72 BV510, анти-CCR7-PE/Cy7 (BioLegend, США) и анти-CD45RO-APC-eF780
73 (Invitrogen, США) антител. После этого образцы фиксировали холодным
74 раствором Fixation Buffer (BioLegend, США) в течение 20 мин в темноте, и
75 дважды отмывали избыточным объемом раствора DPBS, содержащим 1 %
76 бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma-Aldrich, США).
77 Зафиксированные клетки пермеабелизировали с использованием True-Phos
78 Perm Buffer (BioLegend, США) в течение 1 ч и дважды отмывали избыточным
79 объемом DPBS/1 % BSA. Пробы окрашивали DAPI (BioLegend, США), анти-
80 pRB-AF488 (BD Biosciences, США) и анти-pHH3-AF647 (BioLegend, США)
81 антителами. Окрашенные клетки анализировали с использованием проточного
82 цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США).

83 Визуализацию данных проводили с помощью программного
84 обеспечения “FlowJo 10.3” (FlowJo LLC, США).

85 3 Результаты и обсуждение

86 Лейкоциты гейтировали последовательно. По параметрам прямого
87 (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния выделяли регион лимфоцитов. Затем
88 внутри этого региона выделяли клетки, умеренно окрашенные витальным
89 красителем. Интенсивно окрашенные – “мертвые” клетки, мембрана которых
90 ввиду повреждений допустила проникновение красителя – вносят
91 погрешность в получаемые результаты [10] и потому были исключены из
92 анализа. Среди оставшихся жизнеспособных клеток по наличию
93 поверхностной молекулы CD3 идентифицировали Т-лимфоциты.

94 Один из существующих вариантов оценки пролиферации Т-лимфоцитов
95 предполагает окраску интеркалирующими красителями, такими как DAPI.
96 Этот краситель, связываясь с АТ-кластерами в малой бороздке
97 двухцепочечной ДНК, флуоресцирует после облучения лазером. Яркость
98 свечения пропорциональна количеству связавшегося красителя и,
99 следовательно, содержанию ДНК в клетке. Лимфоциты с набором 4n (G2 и M
100 фазы клеточного цикла) светятся в два раза ярче, чем клетки с содержанием
101 ДНК 2n (G0 и G1 фазы). Промежуточной флуоресценцией характеризуются
102 клетки, находящиеся в S-фазе клеточного цикла (рисунок 1).

103 Для того, чтобы отделить G0 от G1 и G2 от M фазы клеточного цикла,
104 нами было предложено ввести два дополнительных маркера:
105 фосфорилированный белок ретинобластомы (pRb) и фосфорилированный
106 гистон H3 (pH3). Белок ретинобластомы фосфорилируется при переходе
107 клеток в активные фазы клеточного цикла [3], следовательно, лимфоциты в
108 G1, S, G2 и M фазах имеют фенотип pRb⁺. Полученные нами данные показали,
109 что гейтирование pRb требует введения дополнительного контроля
110 (флуоресценция минус один, FMO) для точного определения границы региона.
111 В свою очередь гистон H3 фосфорилируется при переходе из G2 в M фазу
112 клеточного цикла [4]. Согласно полученным нами результатам, уровень
113 экспрессии pH3 достаточно высок и не требует введения дополнительных
114 контролей.

115 Предлагаемый метод оценки фаз клеточного цикла был апробирован на
116 CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах различной степени зрелости: CCR7⁺CD45RO⁻ –
117 наивные лимфоциты; CCR7⁺CD45RO⁺ – клетки центральной памяти; CCR7⁻
118 CD45RO⁺ – клетки эффекторной памяти; CCR7⁻CD45RO⁻ – терминально
119 дифференцированные элементы. В результате было показано следующее.
120 Приблизительно равное число CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток экспрессирует pRb после
121 4 суток культивирования с ФГА: 22,5 % и 20,5 % соответственно. При этом
122 было отмечено неодинаковое распределение CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов по
123 фазам клеточного цикла (таблица 1). Так, основная часть CD4⁺ Т-клеток была

124 представлена лимфоцитами в G1-фазе. Напротив, для CD8⁺ Т-лимфоцитов
125 было характерно более равномерное распределение между G1, S и G2-фазами.
126 По-видимому, это отражает более высокую митотическую активность
127 цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению с хелперными клетками.

128 Среди CD4⁺ Т-лимфоцитов в каждой исследованной нами субпопуляции
129 распределение клеток между фазами клеточного цикла было единообразным
130 и совпадало с таковым в общем пуле. В то же время среди субпопуляций CD8⁺
131 Т-лимфоцитов был выявлен ряд особенностей. Так, большинство клеток,
132 находящихся в М-фазе, было представлено в субпопуляциях эффекторной
133 памяти и терминально-дифференцированных клеток (в среднем 9,8 %). Среди
134 наивных лимфоцитов и клеток центральной памяти их количество было
135 существенно ниже и, в среднем, составило 0,8 %. При этом в S-фазе
136 клеточного цикла пул лимфоцитов, относящихся к наивным и центральной
137 памяти, был увеличен по сравнению с таковым у более дифференцированных
138 форм (в среднем 35,2 % против 22,7 %). Полученные результаты
139 подтверждают сделанное ранее предположение о более высокой, чем у CD4⁺
140 Т-лимфоцитов митотической активности CD8⁺ Т-клеток. Более того, в пуле
141 цитотоксических Т-лимфоцитов, по-видимому, интенсивно делятся более
142 зрелые элементы: клетки эффекторной памяти и терминально-
143 дифференцированные лимфоциты.

144 4 Выводы

145 Предлагаемый метод позволяет проводить оценку фаз клеточного цикла
146 в CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах разной степени зрелости. Метод может быть
147 весьма информативен при изучении того, как различные субпопуляции Т-
148 клеток реагируют на антигенную стимуляцию, какие факторы влияют на их
149 пролиферацию и как эти процессы связаны с формированием иммунной
150 памяти. Это может внести вклад в понимание механизмов формирования
151 поствакцинального и противоопухолевого иммунитета.

152 Работа выполнена в рамках государственного задания № 124021900006-
153 5. В работе использовано оборудование ЦКП “Исследования материалов и
154 вещества” ПФИЦ УрО РАН. Автор выражает глубокую благодарность м.н.с.
155 лаборатории молекулярной иммунологии “ИЭГМ УрО РАН” Власовой В.В. и
156 н.с. лаборатории экологической иммунологии “ИЭГМ УрО РАН”
157 Королевской Л.Б.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Распределение стимулированных Т-лимфоцитов по фазам клеточного цикла.

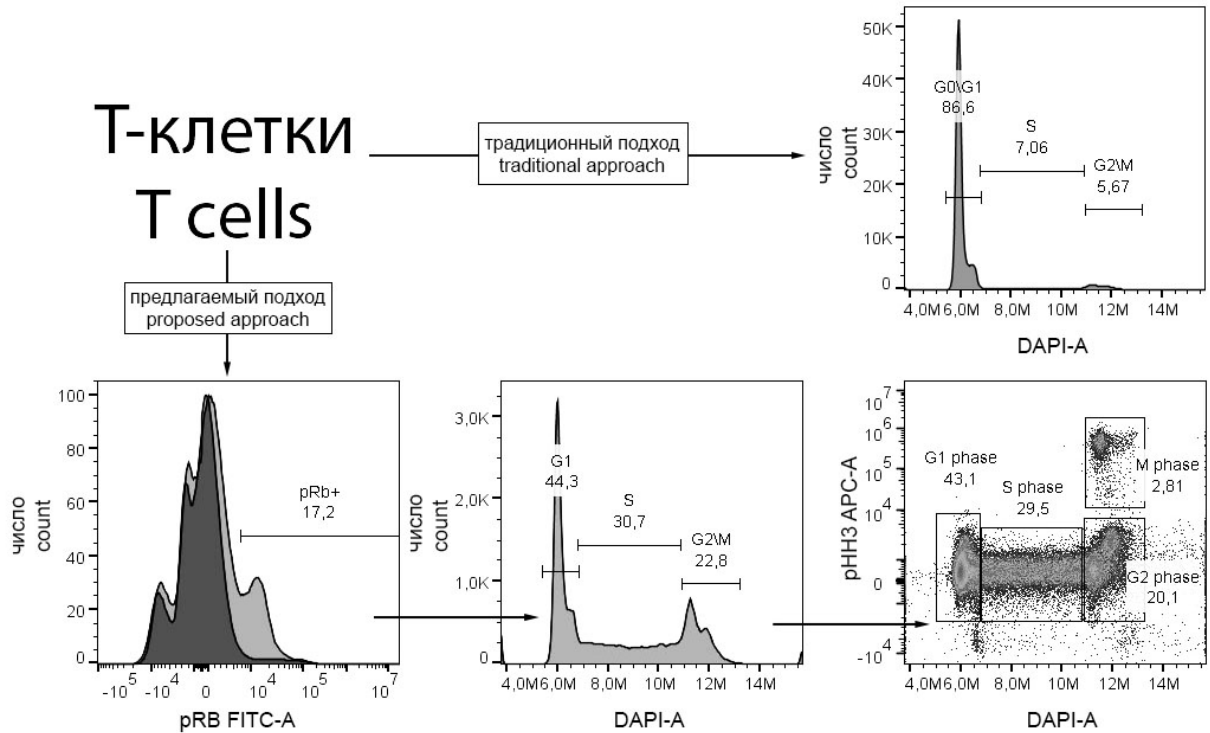
Table 1. The distribution of stimulated T lymphocytes across cell cycle phases.

Фаза клеточного цикла Cell cycle phase	CD4+ Т-клетки CD4+ T cells	CD8+ Т-клетки CD8+ T cells
G1-фаза, % G1-phase, %	87,7	41,7
S-фаза, % S-phase, %	9,7	31,6
G2-фаза, % G2-phase, %	0,3	20,7
M-фаза, % M-phase, %	0,01	2,8

РИСУНКИ

Рисунок 1. Традиционный и предлагаемый подход к анализу клеточного цикла Т-лимфоцитов.

Figure 1. Traditional and proposed approaches to analyzing the T-lymphocyte cell cycle.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Сайдакова Евгения Владимировна – д.б.н., доцент, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»);

«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»), Пермь, Россия;

адрес: 614081, Пермский край, г. Пермь, ул. Голева, 13;

факс: 8(324)280-92-11;

телефон: 8(324)280-83-34;

e-mail: radimira@list.ru

Saidakova Evgeniya Vladimirovna – Dr.Sci.Biol., Associate Professor, Head of Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences;

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia;

address: 614081, Perm, 13Goleva str.;

fax: 8(324)280-92-11;

telephone: 8(324)280-83-34;

e-mail: radimira@list.ru

Блок 2. Метаданные статьи

НОВЫЙ ПОДХОД К АНАЛИЗУ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА Т-ЛИМФОЦИТОВ
МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

NEW APPROACH TO ANALYZING THE T LYMPHOCYTE CELL CYCLE
USING FLOW CYTOMETRY

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ Т-ЛИМФОЦИТОВ
SHORT TITLE: T LYMPHOCYTE CELL CYCL

Ключевые слова: CD4+ Т-лимфоциты, CD8+ Т-лимфоциты, наивные клетки, клетки памяти, клеточный цикл, проточная цитометрия.

Keywords: CD4+ T cells, CD8+ T cells, naive cells, memory cells, cell cycle, flow cytometry.

Иммунологические чтения в Челябинске.

Количество страниц текста – 4,

Количество таблиц – 1,

Количество рисунков – 1.

19.03.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

<i>Порядковый номер ссылки</i>	<i>Авторы, название публикации, выходные данные</i>	<i>ФИО, название публикации на английском</i>	<i>Полный интернет адрес или DOI</i>
1	Марченко Д.М., Сайдакова Е.В. Новые маркеры для исследования пролиферации Т-лимфоцитов человека. Вестник Пермского университета Серия «Биология», 2021, №. 4, С.316-323.	Marchenko D.M., Saidakova E.V. Novel human T-cell proliferation markers.	https://doi.org/10.17072/1994-9952-2021-4-316-323 .
2	Banks H.T., Sutton K.L., Thompson W.C., Bocharov G., Roose D., Schenkel T., et al. Estimation of cell proliferation dynamics using CFSE data. Bull Math Biol., 2011, Vol. 73, No. 1, pp.116-150.		https://doi.org/10.1007/s11538-010-9524-5 .
3	Cooper S., Shayman J.A. Revisiting retinoblastoma protein phosphorylation during the mammalian cell cycle. Cell Mol Life Sci., 2001, Vol. 58, No. 4, pp.580-595.		https://doi.org/10.1007/PL0000883 .
4	Crosio C., Fimia G.M., Loury R., Kimura M., Okano Y., Zhou H., et al. Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. Mol Cell Biol., 2002, Vol. 22, No. 3, pp.874-885.		https://doi.org/10.1128/MCB.22.3.874-885.2002 .

5	Darzynkiewicz Z. Critical aspects in analysis of cellular DNA content. Curr Protoc Cytom., 2011, Chapter 7, pp.7 2 1-7 2 8.		https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0702s56 .
6	Kalimuddin S., Tham C.Y.L., Chan Y.F.Z., Hang S.K., Kunasegaran K., Chia A., et al. Vaccine-induced T cell responses control Orthoflavivirus challenge infection without neutralizing antibodies in humans./ Nat Microbiol., 2025, Vol. 10, No. 2, pp.374-387.		https://doi.org/10.1038/s41564-024-01903-7 .
7	Kim C., Fang F., Weyand C.M., Goronzy J.J. The life cycle of a T cell after vaccination - where does immune ageing strike? Clin Exp Immunol., 2017, Vol. 187, No. 1. pp.71-81.		https://doi.org/10.1111/cei.12829 .
8	Motamedi M., Xu L., Elahi S. Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers. J Immunol Methods, 2016, Vol. 437, pp.43-52.		https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.08.002 .
9	Rothausler K., Baumgarth N. Assessment of cell proliferation by 5-bromodeoxyuridine (BrdU) labeling for multicolor flow cytometry. Curr Protoc Cytom., 2007, Vol. Chapter 7, Unit7, pp. 31.		https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0731s40 .

10	Schmid I., Ferbas J., Uittenbogaart C.H., Giorgi J.V. Flow cytometric analysis of live cell proliferation and phenotype in populations with low viability. Cytometry, 1999, Vol. 35, No. 1, pp.64-74.		<a href="https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(19990101)35:1<64::aid-cyto9>3.0.co;2-y">https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(19990101)35:1<64::aid-cyto9>3.0.co;2-y .
11	Wang L., Nicols A., Turtle L., Richter A., Duncan C.J., Dunachie S.J., et al. T cell immune memory after covid-19 and vaccination. BMJ Med., 2023, Vol. 2, No. 1, pp.e000468.		https://doi.org/10.1136/bmjmed-2022-000468 .