Российский иммунологический журнал
2025, Т. 28, № 3, стр. 363-368

Краткие сообщения
Short communications

Russian Journal of Immunology / Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal
2025, Vol. 28, № 3, pp. 363-368

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

Сайдакова Е.В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

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. 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% CO_2). 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 пермеабилизировали, после чего окрашивали антителами к pRb AF488 и pHH3 AF647, а также красителем DAPI. Анализ клеток проводили на проточном цитометре CytoFLEX S. 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. 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

Адрес для переписки:
Сайдакова Евгения Владимировна
Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-83-34.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: radimira@list.ru

Address for correspondence:
Evgeniya V. Saidakova
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (342) 280-83-34.
Fax: +7 (342) 280-92-11.
E-mail: radimira@list.ru

Образец цитирования:
Е.В. Сайдакова «Новый подход к анализу клеточного цикла Т-лимфоцитов методом проточной цитометрии» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 363-368.
doi: 10.46235/1028-7221-17127-NAT

© Сайдакова Е.В., 2025
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:
E.V. Saidakova "Novel approach to cell cycle analysis of T lymphocytes using flow cytometry", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 363-368.
doi: 10.46235/1028-7221-17127-NAT

© Saidakova E.V., 2025
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17127-NAT

NOVEL APPROACH TO CELL CYCLE ANALYSIS OF T LYMPHOCYTES USING FLOW CYTOMETRY

Saidakova E.V.

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

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 definition of dividing cells fraction, proliferation rate, as well as the cell cycle phases, would substantially enhance our understanding of the causes and mechanisms inderlying impaired T lymphocyte division. The aim of our study was to validate a novel approach for analyzing cell cycle of T lymphocytes at different maturation stages via flow cytometry. The study was performed with peripheral blood samples collected from healthy individuals. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by density-gradient centrifugation, stimulated with phytohemagglutinin, and cultivated for 4 days under standard conditions (37 °C, 5% CO_2). 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. The 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. The proposed technique allowed successful distinction between T lymphocytes in 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, we have quantified the numbers of $CD4^+$ and $CD8^+$T lymphocytes progressing into active cell cycle phases, along with their phase-specific distributions. The differences in proliferation dynamics were also observed for naive $CD4^+$ and $CD8^+$T lymphocytes, central memory, effector memory, and terminal effector subsets. The proposed method enables comprehensive evaluation of the cell cycle progression in $CD4^+$ and $CD8^+$T lymphocytes across distinct maturation stages by means of flow cytometry.

Keywords: $CD4^+$T lymphocytes, $CD8^+$T lymphocytes, naive cells, memory cells, cell cycle, flow cytometry

Работа выполнена в рамках государственного задания № 124021900006-5.

Введение

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

В настоящее время для изучения пролиферации Т-лимфоцитов применяются несколько подходов, задействующих проточную цитометрию. Первый – окрашивание клеток 5(6)-карбоксифлуоресцеин диацетат-N-сукцинимидиловым эфиром (CFSE) или его аналогами [2]. Эти флуоресцентные красители способны проникать внутрь клеток и образовывать стабильные ковалентные связи с аминогруппами белков. При каждом делении меченные красителем родительские белки равномерно распределяются между дочерними лимфоцитами. Это приводит к дискретному снижению интенсивности флуоресценции, что позволяет отслеживать количество делений клеток. Второй подход – добавление в среду для культивирования аналога тимидина 5-бромо-2'-дезоксиуридина (BrdU) [9]. Пролиферирующие лимфоциты включают его в состав ДНК дочерних клеток во время синтеза новой цепи (S-фаза клеточного цикла), что позволяет идентифицировать активно делящиеся клетки по наличию в их генетическом материале синтетического нуклеотида. Для обнаружения инкорпорированного BrdU используются меченые флуорохромами моноклональные антитела. Этот подход позволяет определить долю пролиферирующих клеток в популяции и проанализировать количество клеток в S-фазе. Третий подход – детекция внутриклеточных и поверхностных белков, характерных для делящихся иммуноцитов [8]. Такие молекулы, как Ki-67 и CD71, экспрессируются в активных фазах клеточного цикла и не

присутствуют на покоящихся лимфоцитах [1]. Для детекции эти белки также окрашивают флуоресцентными моноклональными антителами. Метод позволяет оценить количество пролиферирующих Т-лимфоцитов. Четвертый подход – оценка содержания нуклеиновых кислот в пролиферирующих клетках с использованием флуоресцентных красителей, способных связываться с двуспиральной ДНК пропорционально ее количеству, таких как 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI) [5]. Так как в процессе деления содержание ДНК временно увеличивается, метод позволяет отличить клетки с диплоидным набором хромосом (2n) от клеток, удвоивших их количество в процессе митоза (4n).

Несмотря на разнообразие, вышеописанные подходы не позволяют оценить эффективность прохождения клетками отдельных фаз клеточного цикла. Более того, не каждая методология дает возможность идентифицировать субпопуляционную принадлежность анализируемых клеток. Наличие метода, позволяющего единовременно анализировать фенотип и фазу клеточного цикла, значительно расширит возможности исследователей.

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

Материалы и методы

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

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

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

Выделенные клетки стимулировали фитогемагглютинином (ФГА, Serva, Германия) в конечной концентрации 15 мкг/мл. Лейкоциты культивировали в 96-луночных планшетах (Costar, США) в полной питательной среде (ППС), содержащей RPMI-1640 (BioinnLabs, Россия), 10% ЭТС, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, Inc., США), в течение 4 суток (37 °C, 5% CO_2). По окончании времени инкубации клетки собирали и для фенотипического анализа окрашивали витальным красителем LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain (LD, Life Technologies, США) и коктейлем анти-CD3-BV605, анти-CD4-PE, анти-CD8-BV510, анти-CCR7-PE/Cy7 (BioLegend, США) и анти-CD45RO-APC-eF780 (Invitrogen, США) антител. После этого образцы фиксировали холодным раствором Fixation Buffer (BioLegend, США) в течение 20 мин в темноте и дважды отмывали избыточным объемом раствора DPBS, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma-Aldrich, США). Зафиксированные клетки пермеабилизировали с использованием True-Phos Perm Buffer (BioLegend, США) в течение 1 ч и дважды отмывали избыточным объемом DPBS/1% BSA. Пробы окрашивали DAPI (BioLegend, США), анти-pRb-AF488 (BD Biosciences, США) и анти-pHH3-AF647 (BioLegend, США) антителами. Окрашенные клетки анализировали с использованием проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США).

Визуализацию данных проводили с помощью программного обеспечения FlowJo 10.3 (FlowJo LLC, США).

Результаты и обсуждение

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

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

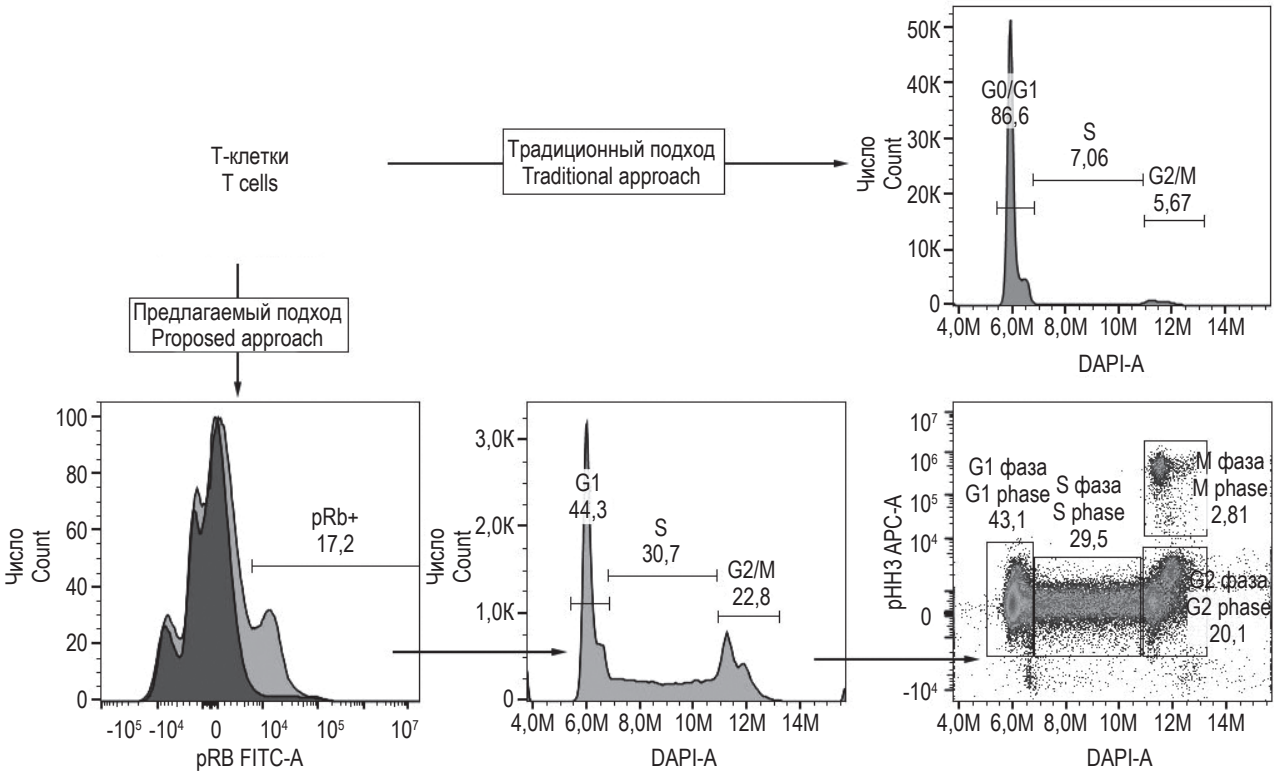

Рисунок 1. Традиционный и предлагаемый подход к анализу клеточного цикла Т-лимфоцитов

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

Для того чтобы отделить G0- от G1- и G2- от M-фазы клеточного цикла, нами было предложено ввести два дополнительных маркера: фосфорилированный белок ретинобластомы (pRb) и фосфорилированный гистон H3 (pHH3). Белок ретинобластомы фосфорилируется при переходе клеток в активные фазы клеточного цикла [3], следовательно, лимфоциты в G1-, S-, G2- и M-фазах имеют фенотип pRb^+. Полученные нами данные показали, что гейтирование pRb требует введения дополнительного контроля (флуоресценция минус один, FMO) для точного определения границы региона. В свою очередь, гистон H3 фосфорилируется при переходе из G2- в M-фазу клеточного цикла [4]. Согласно полученным нами результатам, уровень экспрессии pHH3 достаточно высок и не требует введения дополнительных контролей.

Предлагаемый метод оценки фаз клеточного цикла был апробирован на $CD4^+$ и $CD8^+$T-лимфоцитах различной степени зрелости: $CCR7^+CD45RO^-$ – наивные лимфоциты; $CCR7^+CD45RO^+$ – клетки центральной памяти; $CCR7^-CD45RO^+$ – клетки эффекторной памяти; $CCR7^-CD45RO^-$ – терминально дифференцированные элементы. В результате было показано следующее. Приблизительно равное число $CD4^+$ и $CD8^+$T-клеток экспрессирует pRb после 4 суток культивирования с ФГА: 22,5% и 20,5% соответственно. При этом было отмечено неодинаковое распределение $CD4^+$ и $CD8^+$T-лимфоцитов по фазам клеточного цикла (табл. 1). Так, основная часть $CD4^+$T-клеток была представлена лимфоцитами в G1-фазе. Напротив, для $CD8^+$T-лимфоцитов было характерно более равномерное распределение между G1, S и G2-фазами. По-видимому, это отражает более высокую митотическую активность цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению с хелперными клетками.

Среди $CD4^+$T-лимфоцитов в каждой исследованной нами субпопуляции распределение клеток между фазами клеточного цикла было единообразным и совпадало с таковым в общем пуле. В то же время среди субпопуляций $CD8^+$T-лимфоцитов был выявлен ряд особенностей. Так, большинство клеток, находящихся в M-фазе, было представлено в субпопуляциях эффекторной памяти и терминально-дифференцированных клеток (в среднем 9,8%). Среди наивных лимфоцитов и клеток центральной памяти их количество было существенно ниже и в среднем составило 0,8%. При этом в S-фазе клеточного цикла пул лимфоцитов, относящихся к наивным и центральной памяти, был увеличен по сравнению с таковым у более дифференцированных

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

форм (в среднем 35,2% против 22,7%). Полученные результаты подтверждают сделанное ранее предположение о более высокой, чем у $CD4^+$Т-лимфоцитов митотической активности $CD8^+$Т-клеток. Более того, в пуле цитотоксических Т-лимфоцитов, по-видимому, интенсивно делятся более зрелые элементы: клетки эффекторной памяти и терминально-дифференцированные лимфоциты.

Выводы

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

Благодарности

В работе использовано оборудование ЦКП «Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН. Автор выражает глубокую благодарность младшему научному сотруднику лаборатории молекулярной иммунологии ИЭГМ УрО РАН Власовой В.В. и научному сотруднику лаборатории экологической иммунологии ИЭГМ УрО РАН Королевской Л.Б.

Список литературы / References

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. *Vestnik Permskogo universiteta. Seriya "Biologiya" = Bulletin of Perm University. Biology, 2021, no. 4, pp. 316-323.* (In Russ.)]
2. Banks H.T., Sutton K.L., Thompson W.C., Bocharov G., Roose D., Schenkel T., Meyerhans A. Estimation of cell proliferation dynamics using CFSE data. *Bull. Math. Biol., 2011, Vol. 73, no. 1, pp. 116-150.*
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.*
4. Crosio C., Fimia G.M., Loury R., Kimura M., Okano Y., Zhou H., Sen S., Allis C.D., Sassone-Corsi P. Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol. Cell. Biol., 2002, Vol. 22, no. 3, pp. 874-885.*
5. Darzynkiewicz Z. Critical aspects in analysis of cellular DNA content. *Curr. Protoc. Cytom., 2011, Chapter 7, pp. 721-728.*
6. Kalimuddin S., Tham C.Y.L., Chan Y.F.Z., Hang S.K., Kunasegaran K., Chia A., Chan C.Y.Y., Ng D.H.L., Sim J.X.Y., Tan H.-C., Syenina A., Ngoh A.Q., Hamis N.Z., Chew V., Leong Y.S., Yee J.X., Low J.G., Chan K.R., Ong E.Z., Bertoletti A., Ooi E.E. Vaccine-induced T cell responses control Orthoflavivirus challenge infection without neutralizing antibodies in humans. *Nat. Microbiol., 2025, Vol. 10, no. 2, pp. 374-387.*
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.*
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.*

9. Rothaeusler K., Baumgarth N. Assessment of cell proliferation by 5-bromodeoxyuridine (BrdU) labeling for multicolor flow cytometry. *Curr. Protoc. Cytom., 2007, Chapter 7, Unit 7.31.* doi: 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.*

11. Wang L., Nicols A., Turtle L., Richter A., Duncan C.J., Dunachie S.J., Klenerman P., Payne R.P. T cell immune memory after COVID-19 and vaccination. *BMJ Med., 2023, Vol. 2, no. 1, e000468.* doi: 10.1136/bmjmed-2022-000468.

Автор:

Сайдакова Е.В. *— д.б.н., доцент, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия*

Author:

Saidakova E.V., *PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation*

Поступила 19.03.2025
Отправлена на доработку 09.05.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 19.03.2025
Revision received 09.05.2025
Accepted 25.05.2025