10.46235/1028-7221-17390-DOP

ДИНАМИКА ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ОТВЕТА И СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА CD4+ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ КРАТКОСРОЧНОМ И ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНОМ

Сайдакова Е. В. [1]

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»), Пермь, России

ISSN 1028-7221 (Print)
ISSN 2782-7291 (Online)

10.46235/1028-7221-17390-DOP

DYNAMICS OF PROLIFERATIVE RESPONSE AND SUBSET COMPOSITION OF CD4+ T LYMPHOCYTES DURING SHORT-TERM AND LONG-TERM CULTIVATION WITH PHYTOHEMAGGLUTININ

Saidakova E. V. [a]

[a] Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

ISSN 1028-7221 (Print)
ISSN 2782-7291 (Online)

Резюме

Оценка пролиферативной активности CD4+ Т-лимфоцитов является важным инструментом для характеристики функционального статуса адаптивного иммунитета. Использование метода проточной цитометрии с красителем CFSE позволяет отслеживать кинетику клеточного деления. Однако данные о гетерогенности пролиферативного ответа на Т-клеточные митогены, такие как фитогемагглютинин (ФГА) остаются ограниченными. В частности, малоизученным остается феномен сверхбыстрого деления малой фракции стимулированных Т-клеток in vitro. Целью настоящего исследования было изучить динамику пролиферативного ответа и проанализировать изменения субпопуляционного состава (наивные, центральные и эффекторные клетки памяти) CD4+ Т-лимфоцитов при краткосрочном (1–3 суток) и более длительном (6 суток) культивировании с ФГА in vitro. Мононуклеарные клетки периферической крови условно здоровых доноров окрашивали CFSE и культивировали в присутствии ФГА (15 мкг/мл) в течение 1, 3 и 6 суток. Анализ пролиферации и субпопуляционного состава CD4+ Т-клеток (CCR7+CD45RO– — наивные; CCR7+CD45RO+ — центральные Т-лимфоциты памяти; CCR7–CD45RO+ — эффекторные Т-клетки памяти) проводили методом многоцветной проточной цитометрии. Детально исследовали клетки, совершившие более 5 митотических циклов (CFSE-негативные). Установлено, что через 3 суток культивирования с ФГА относительное количество CD4+ Т-клеток, ушедших в деление, составляет 68,8%. При этом 21,4% относятся к субпопуляции, полностью утратившей метку CFSE, т.е. совершившей более пяти циклов митоза. Анализ CFSE-негативной фракции показал, что на 3-и сутки состав быстро пролиферирующих клеток был разнообразным (наивные — 20,8%, центральные клетки памяти — 67,9%, эффекторные клетки памяти — 10,7%). На 6 сутки уже 84,5% CD4+ Т-клеток завершили один или более цикл деления. Доля многократно поделившихся лимфоцитов составила 34,3%. В отличие от CFSE-негативных клеток, сформировавшихся при краткосрочном культивировании, к 6-м суткам фракция многократно поделившихся клеток была представлена почти исключительно клетками памяти (центральные клетки памяти — 72,8%, эффекторные клетки памяти — 25,1%). Это указывает на конверсию фенотипа в процессе деления или селективное преимущество клеток памяти при длительной стимуляции. Таким образом, было продемонстрировано, что при краткосрочном культивировании с ФГА выявляется фракция CD4+ Т-лимфоцитов со сверхбыстрой пролиферацией, которая не связана с доминированием какой-либо одной субпопуляции. Игнорирование феномена сверхбыстрого деления части клеток при непродолжительных экспериментах может привести к искажению выводов о функциональной активности Т-клеток.

Ключевые слова: CD4+ Т-лимфоциты, субпопуляции Т-клеток, фитогемагглютинин, пролиферация, CFSE, проточная цитометрия.

 10.46235/1028-7221-17390-DOP

Abstract

Assessment of the proliferative activity of CD4+ T lymphocytes is an important tool for characterizing the functional status of adaptive immunity. The use of flow cytometry with the CFSE dye allows for the tracking of cell division kinetics. However, data on the heterogeneity of the proliferative response to T-cell mitogens, such as phytohemagglutinin (PHA), remain limited. In particular, the phenomenon of ultra-fast division of a small fraction of stimulated T cells in vitro is poorly understood. The aim of this study was to investigate the dynamics of the proliferative response and to analyze changes in the subset composition (naive, central memory, and effector memory cells) of CD4+ T lymphocytes during short-term (1–3 days) and longer-term (6 days) cultivation with PHA in vitro. Peripheral blood mononuclear cells from relatively healthy volunteers were stained with CFSE and cultured in the presence of PHA (15 μg/ml) for 1, 3, and 6 days. Analysis of proliferation and the subset composition of CD4+ T cells (CCR7+CD45RO– – naive; CCR7+CD45RO+ – central memory T cells; CCR7–CD45RO+ – effector memory T cells) was performed using multicolor flow cytometry. Cells that had completed more than five mitotic cycles (CFSE-negative) were examined in detail. It was found that after 3 days of culture with PHA, the relative number of CD4+ T cells that had entered division was 68.8%. Of these, 21.4% belonged to a subset that had completely lost the CFSE label, i.e., had completed more than five mitotic cycles. Analysis of the CFSE-negative fraction on day 3 showed that the composition of rapidly proliferating cells was diverse (naive – 20.8%, central memory T cells – 67.9%, effector memory T cells – 10.7%). By day 6, 84.5% of CD4+ T cells had completed one or more division cycles. The proportion of extensively divided lymphocytes was 34.3%. In contrast to the CFSE-negative cells formed during short-term culture, by day 6 the fraction of extensively divided cells consisted almost exclusively of memory cells (central memory T cells – 72.8%, effector memory T cells – 25.1%). This indicates either phenotypic conversion during division or a selective advantage of memory cells upon prolonged stimulation. Thus, it was demonstrated that short-term cultivation with PHA reveals a fraction of CD4+ T lymphocytes with ultra-fast proliferation that is not associated with the dominance of any single subset. Ignoring the phenomenon of ultra-fast division of a subset of cells in short-term experiments may lead to skewed conclusions regarding T-cell functional activity.

Keywords: CD4+ T-cells, T-cell subsets, phytohemagglutinin, proliferation, CFSE, flow cytometry.

1 Введение

Проточная цитометрия с применением трекинговых красителей, таких как 5(6)-карбоксифлуоресцеин диацетат-N-сукцинимидиловый эфир (CFSE), позволяет не только констатировать факт деления CD4+ Т-лимфоцитов, но и визуализировать несколько последовательных циклов митоза [1]. Экспериментально установлено, что после стимуляции CD4+ Т-клетки вступают в пролиферацию с разной скоростью, а их деление характеризуется различной интенсивностью [2]. Математическое моделирование подтвердило, что эта гетерогенность отражает реальные отличия пролиферативной активности клеток [3].

В иммунологии для запуска пролиферации CD4+ Т-лимфоцитов в условиях *in vitro* используют три основных подхода. Первый – стимуляция через Т-клеточный рецептор и ко-стимулирующие молекулы для имитации антиген-зависимого деления. Второй – стимуляция цитокинами: интерлейкином (ИЛ)-7/ИЛ-15, запускающими гомеостатическую пролиферацию. Третий – активация клеток митогенами, такими как фитогемагглютинин (ФГА). В отличие от первых двух подходов, стимуляция митогенами, как правило, используется для оценки общей функциональной компетентности Т-клеток при экспериментальных воздействиях [4]. Данные о том, является ли ответ CD4+ Т-клеток на митоген синхронным, и как он отражается на субпопуляционном составе лимфоцитов в литературе ограничены.

Цель настоящей работы: изучение динамики пролиферативного ответа и анализ субпопуляционного состава CD4+ Т-лимфоцитов при краткосрочном и длительном культивировании с фитогемагглютинином.

2 Материалы и методы

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

Кровь объемом до 20 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, Диаэм; Россия). Выделенные клетки собирали, дважды отмывали раствором DPBS, подсчитывали в камере Горяева.

Выделенные мононуклеарные лейкоциты окрашивали 5 мкМ CFSE (Biolegend, США), дважды отмывали средой RPMI-1640 (Sigma-Aldrich; США), содержащей 20 % термоинактивированной эмбриональной телячьей (ЭТС, Gibco; Колумбия). 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). Пролиферацию индуцировали внесением ФГА (Serva, Германия) в конечной концентрации 15 мкг/мл. Пробы культивировали в течение 1, 3 и 6 суток (37ºC, 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-CCR7-PE/Cy7 (BioLegend, США) и анти-CD45RO-APC-eF780 (Invitrogen, США) антител. Окрашенные клетки анализировали с использованием проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США).

С использованием многоступенчатой стратегии гейтирования из общей популяции клеток выделяли жизнеспособные CD4+ Т-лимфоциты и их субпопуляции. Первоначально по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния идентифицировали регион лимфоцитов. Для того, чтобы избежать возможных искажений, из анализа исключали мертвые клетки. В оставшейся популяции жизнеспособных лимфоцитов идентифицировали CD4+ Т-лимфоциты на основании ко-экспрессии поверхностных молекул CD3 и CD4. Среди $CD4^+$ Т-лимфоцитов идентифицировали клетки различной степени зрелости: $CCR7^+CD45RO^-$ – наивные лимфоциты; $CCR7^+CD45RO^+$ – центральные клетки памяти (TCM); $CCR7^-CD45RO^+$ – эффекторные клетки памяти (TEM). Визуализацию данных проводили с помощью программного обеспечения “FlowJo 10.3” (FlowJo LLC, США).

3 Результаты и обсуждение

Анализ пролиферации после культивирования в различные временные точки выявил существенные различия в кинетике ответа на ФГА (рисунок 1). После 6-суточного культивирования подавляющее большинство CD4+ Т-клеток (84,5 %) вступило в деление. Лимфоциты совершили более пяти митозов. При этом 34,3 % клеток полностью утратили флуоресцентную метку (CFSE-негативная популяция) из-за многократного деления.

Принципиально иная картина наблюдалась в пробах, собранных после 3 суток культивирования. Хотя 68,8 % CD4+ Т-лимфоцитов уже завершили один или более циклов деления, на гистограмме распределения флуоресценции CFSE отчетливо визуализировались только две дочерние генерации (рисунок 1). Также была выявлена субпопуляция (21,4 % от всех CD4+ Т-клеток), полностью утратившая флуоресцентную метку (CFSE-негативные клетки). Эта фракция лимфоцитов, по-видимому, вступила в пролиферацию практически сразу после постановки культуры и за короткий промежуток времени совершила более пяти митозов.

Проведенный анализ субпопуляционного состава CD4+ Т-лимфоцитов среди клеток, не вступивших в деление (G0), выявил следующее. В популяции G0 после суточной инкубации преобладали наивные CD4+ Т-лимфоциты (66,8 %). К концу 3 суток культивирования их доля снизилась в два раза (до 35 %), что, вероятно, связано со вступлением в пролиферацию (рисунок 2). Количество наивных CD4+ Т-лимфоцитов не изменилось и при более длительной инкубации (6 суток), по-прежнему составляя около 35 %. Относительное количество ТСМ в G0 после 1, 3 и 6 суток культивирования составило 23,1 %, 52,7 % и 38,3 % соответственно. Это может свидетельствовать о несколько более позднем, чем у наивных CD4+ Т-лимфоцитов переходе клеток в пролиферирующий пул. Процентное содержание ТЕМ во фракции G0 неуклонно возрастало на протяжении всего периода культивирования, начиная с 7,9 % после суточной инкубации. В течение 3 суток оно увеличилось до 11,2 %. Максимальное значение было зафиксировано при оценке доли ТЕМ после 6-суточного культивирования – 23,2 %. По-видимому, эти клетки наименее активно запускают деление после стимуляции ФГА.

Анализ субпопуляционного состава CD4+ Т-лимфоцитов среди клеток, завершивших более пяти циклов деления (CFSE-негативная популяция), выявил следующие особенности. После культивирования в течение 6 суток основу этой фракции составили клетки памяти: доля ТСМ достигла 72,8 %, ТЕМ – 25,1 %. Наивные Т-лимфоциты практически отсутствовали в данной популяции, составляя лишь 1,8 %. Мы предполагаем, что причиной такого распределения может быть один из следующих факторов или их совокупность. Во-первых, к многократному делению могут быть более склонны клетки памяти, в частности ТСМ. Во-вторых, многократное деление наивных Т-лимфоцитов может сопровождаться конверсией их фенотипа, что было показано при антиген-зависимой и гомеостатической пролиферации [5].

После 3-суточного культивирования субпопуляционный состав многократно поделившихся CD4+ Т-клеток существенно отличался от такового после шести суток. Хотя ТСМ доминировали (67,9 %), ТЕМ составили только 10,7 %. При этом наивные CD4+ Т-клетки присутствовали в количестве 20,8 %. Полученные данные наглядно демонстрируют, что быстрая пролиферация CD4+ Т-клеток в течение 3 суток не связана с преимущественным делением какой-либо субпопуляции или конверсией фенотипа. Напротив, многократное деление CD4+ Т-клеток на протяжении более продолжительного времени существенно меняет субпопуляционный состав культивируемых клеток.

Известно, что в норме во вторичных лимфоидных органах мышей более 10 % CD4+ Т-клеток находятся в состоянии деления [6]. Их пролиферация не связана со стимуляцией антигенами комменсальной микрофлоры и не сопряжена со снижением разнообразия Т-клеточных рецепторов. У здоровых

 10.46235/1028-7221-17390-DOP

людей процентное содержание CD4+ Т-клеток в лимфоузлах, экспрессирующих маркеры деления, также сравнительно высока (6,4 %, данные не показаны). Можно предположить, что небольшая фракция таких «заранее активированных» клеток может выходить в периферическую кровь и детектироваться при краткосрочных исследованиях пролиферации с использованием CFSE в условиях *in vitro*.

4 Выводы

Таким образом, проведенное исследование демонстрирует, что пролиферативный ответ CD4+ Т-лимфоцитов на поликлональный митоген ФГА является гетерогенным. При кратковременном, в течение трех суток, культивировании выявляется популяция клеток со сверхбыстрой пролиферацией, завершающая более пяти делений. Это деление не связано с какой-либо одной субпопуляцией и не приводит к конверсии фенотипа наивных клеток.

Вместе с тем, на основании полученных результатов возникает вопрос: надо ли учитывать быстро пролиферирующие CD4+ Т-клетки при непродолжительном культивировании с ФГА? Возможно, что игнорирование феномена сверхбыстрой пролиферации части клеток и субпопуляционной динамики может приводить к неверной оценке функциональной активности CD4+ Т-лимфоцитов в экспериментальных исследованиях.

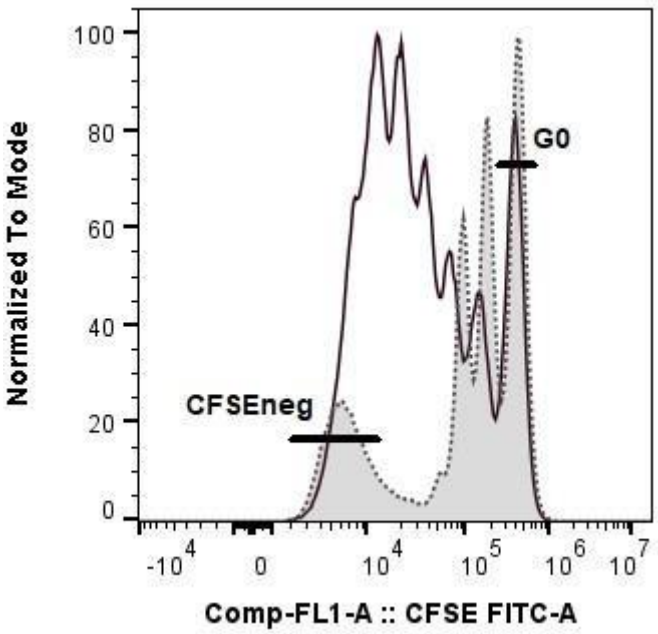
Работа выполнена в рамках государственного задания № 124021900006-5. В работе использовано оборудование ЦКП “Исследования материалов и вещества” ПФИЦ УрО РАН. Автор выражает глубокую благодарность м.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии “ИЭГМ УрО РАН” Мокрушину Г.К. и н.с. лаборатории экологической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

 10.46235/1028-7221-17390-DOP

РИСУНКИ

Рисунок 1. Сравнение профилей флуоресценции CFSE CD4+ Т-лимфоцитов после трех и шести суток инкубации в присутствии фитогемагглютинина

Figure 1. Comparison of CFSE fluorescence profiles of CD4+ T lymphocytes after 3 and 6 days of incubation with phytohemagglutinin



Представлены гистограммы распределения флуоресценции CFSE. Серым указаны результаты после 3 суток культивирования; белым – после 6 суток. Отмечены регионы неделившихся клеток (G0) и клеток, совершивших более 5 циклов митоза (CFSEneg).

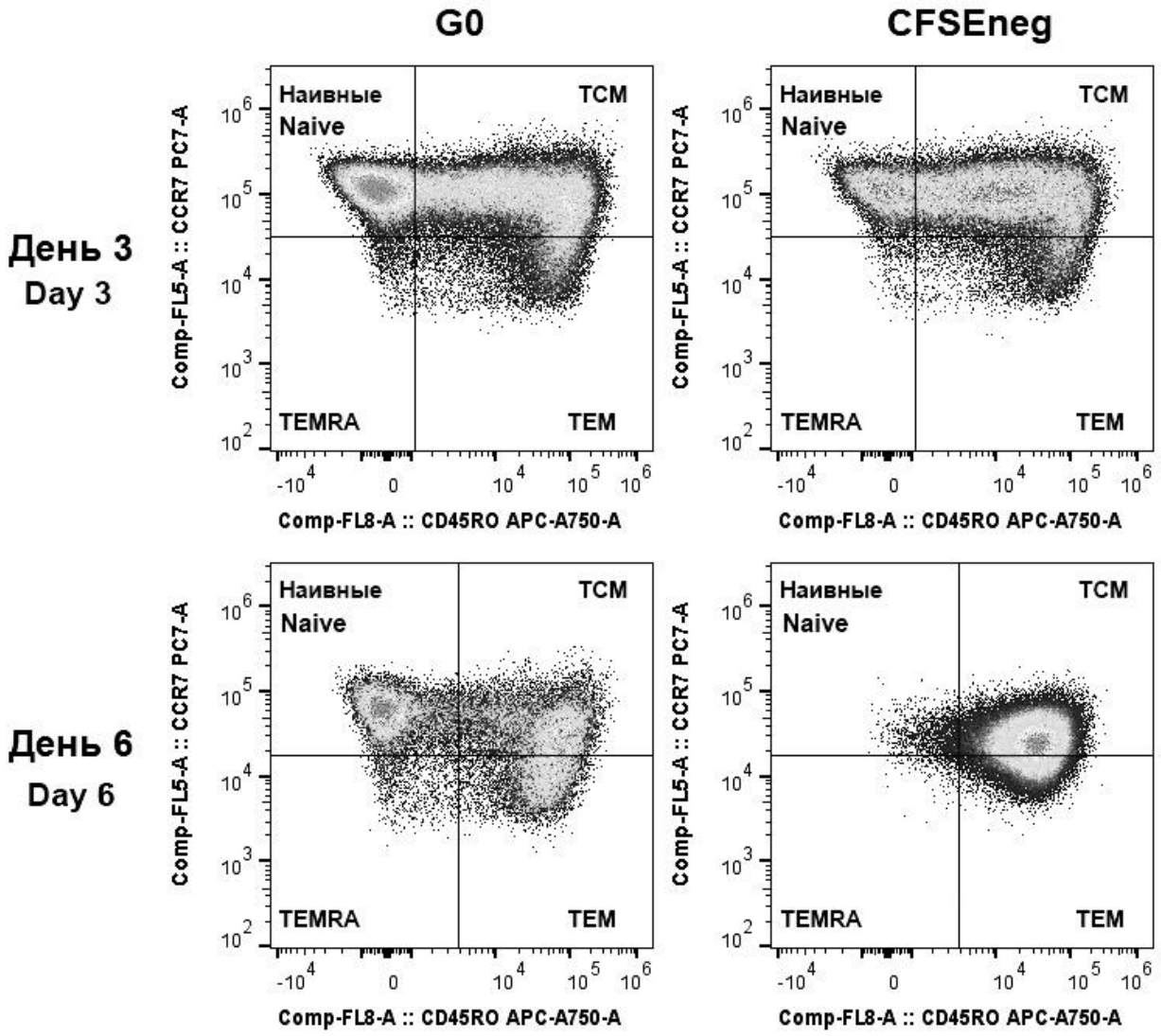
CFSE fluorescence histograms are shown. Grey histogram represents the results after 3 days of culture; white histogram represents the results after 6 days. The regions corresponding to non-dividing cells (G0) and cells that have completed more than five mitotic cycles (CFSEneg) are indicated.

 ISSN 1028-7221 (Print)
ISSN 2782-7291 (Online)

 10.46235/1028-7221-17390-DOP

Рисунок 2. Показательные графики распределения не поделившихся (G0) и многократно поделившихся (CFSEneg) CD4+ Т-лимфоцитов по субпопуляциям на 3 и 6 сутки инкубации в присутствии фитогемагглютинина

Figure 2. Representative pseudo color plots showing the subset distribution of non-dividing (G0) and extensively divided (CFSEneg) CD4+ T lymphocytes on days 3 and 6 of culture with phytohemagglutinin



Представлены графики плотности распределения с указанием квадрантов наивных клеток (naive), центральных клеток памяти (TCM), эффекторных клеток памяти (TEM) и эффекторных клеток, ре-экспрессирующих RA (TEMRA)

Density plots indicating the quadrants for naive cells, central memory T cells (TCM), effector memory T cells (TEM), and effector cells re-expressing RA (TEMRA) are shown.

 ISSN 1028-7221 (Print)
ISSN 2782-7291 (Online)

 10.46235/1028-7221-17390-DOP

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

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»)
Адрес: 614081, Пермский край, г. Пермь, ул. Голева, 13;
Номер телефона: +7 (324) 280-83-34;
Факс: +7 (324) 280-92-11;
Email: 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.
Address: 614081, Perm, 13Goleva str.;
telephone: +7 (324) 280-83-34;
Факс: +7 (324) 280-92-11;
Email: radimira@list.ru

 ISSN 1028-7221 (Print)
ISSN 2782-7291 (Online)

 10.46235/1028-7221-17390-DOP

Блок 2. Метаданные статьи

ДИНАМИКА ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ОТВЕТА И СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА CD4+ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ КРАТКОСРОЧНОМ И ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНОМ

DYNAMICS OF PROLIFERATIVE RESPONSE AND SUBSET COMPOSITION OF CD4+ T LYMPHOCYTES DURING SHORT-TERM AND LONG-TERM CULTIVATION WITH PHYTOHEMAGGLUTININ

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:
Т-КЛЕТОК *IN VITRO*
FAST T CELL DIVISION *IN VITRO*

Ключевые слова: CD4+ Т-лимфоциты, субпопуляции Т-клеток, фитогемагглютинин, пролиферация, CFSE, проточная цитометрия.
Keywords: CD4+ T-cells, T-cell subsets, phytohemagglutinin, proliferation, CFSE, flow cytometry.

Иммунологические чтения в Челябинске.
Количество страниц текста – 4,
Количество таблиц – 0,
Количество рисунков – 2.
12.03.2026

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	*Авторы, название публикации, выходные данные*	*ФИО, название публикации на английском*	*Полный интернет адрес или DOI*
4	Duthoo E., Vral A., Baeyens A. An updated view into the cell cycle kinetics of human T lymphocytes and the impact of irradiation. Sci Rep, 2022, Vol. 12, No. 1, pp.7687.		https://doi.org/10.1038/s41598-022-11364-9
3	Li C.R., Santoso S., Lo D.D. Quantitative analysis of T cell homeostatic proliferation. Cell Immunol., 2007, Vol. 250, No. 1-2, pp. 40-54.		https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.01.003
2	Min B. Spontaneous T Cell Proliferation: A Physiologic Process to Create and Maintain Homeostatic Balance and Diversity of the Immune System. Front Immunol., 2018, Vol. 9, pp. 547.		https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00547
5	Voehringer D., Liang H.E., Locksley R.M. Homeostasis and effector function of lymphopenia-induced "memory-like" T cells in constitutively T cell-depleted mice. J Immunol., 2008, Vol. 180, No. 7, pp. 4742-4753.		https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4742
1	Wallace P.K., Tario J.D. Jr., Fisher J.L., Wallace S.S., Ernstoff M.S., Muirhead K.A. Tracking antigen-driven responses by flow cytometry: monitoring proliferation by dye dilution. Cytometry A, 2008, Vol. 73, No. 11, pp. 1019-1034.		https://doi.org/10.1002/cyto.a.20619

6	Younes S.A., Punkosdy G., Caucheteux S., Chen T., Grossman Z., Paul W.E. Memory phenotype CD4 T cells undergoing rapid, nonburst-like, cytokine-driven proliferation can be distinguished from antigen-experienced memory cells. PLoS Biol., 2011, Vol. 9, No. 10, pp. e1001171.		https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001171

ISSN 1028-7221 (Print)
ISSN 2782-7291 (Online)