

## ФЕНОТИПИРОВАНИЕ АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧНЫХ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ МЕТОДОМ МНОГОЦВЕТНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

© 2019 г. М. С. Кузнецова<sup>1</sup>, Ю. А. Лопатникова<sup>1</sup>, С. В. Сенников<sup>1,2\*</sup>

\*E-mail: sennikovsv@gmail.com

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 03.04.2019

Современные методы многоцветной проточной цитометрии в сочетании с технологиями МНС-мультимеров позволяют не только идентифицировать и выделять популяции цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), но также вести фенотипическое исследование уровня дифференцировки, функциональных особенностей данных клеток, и даже исследовать распределение субпопуляций Т-клеток памяти внутри популяций, специфичных к конкретным эпитомам опухолевых антигенов. В настоящем исследовании мы оценили уровень дифференцировки и содержание субпопуляций Т-клеток памяти в популяциях цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитомам антигена HER2/neu (HER2), с использованием метода окрашивания антиген-специфических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов МНС-мультимерами и многоцветной проточной цитометрии. В результате исследования популяции *in vitro* активированных HER2-специфичных ЦТЛ были проанализированы по фенотипу и разделены на основные субпопуляции, выделяемые исследователями в пуле циркулирующих эффекторных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Полученные HER2-специфичные Т-клетки в значительной степени (порядка 40–50%) имеют фенотип TSCM – популяции, способной к наиболее выраженному противоопухолевому иммунному ответу за счет сочетания эффекторных свойств со способностью к самоподдержанию.

**Ключевые слова:** цитотоксические Т-лимфоциты, CD8<sup>+</sup> Т-клетки, фенотипирование Т-клеток памяти, многоцветная проточная цитометрия, МНС-мультимеры, HER2/neu

DOI: 10.31857/S102872210006680-3

**Адрес:** 630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, д.14., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Сенников Сергей Витальевич. Тел.: +7(383) 2221910.

**E-mail:** sennikovsv@gmail.com

**Авторы:**

**Кузнецова М. С.**, м.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ, Новосибирск, Россия;

**Лопатникова Ю. А.**, к.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ, Новосибирск, Россия;

**Сенников С. В.**, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии НИИФКИ, Новосибирск, Россия.

Эффекторные CD8<sup>+</sup> Т-клетки, также обычно описываемые как цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), играют важную роль в реализации противоопухолевого клеточного иммунитета

и при правильной активации способны эффективно уничтожать опухолевые клетки, экспрессирующие опухолевые антигены. Мощность и продолжительность противоопухолевого ответа в значительной степени зависит от уровня дифференцировки и соотношения субпопуляций ЦТЛ. К числу выделяемых исследователями субпопуляций в пуле циркулирующих эффекторных CD8<sup>+</sup> Т-клеток можно выделить следующие основные: наивные Т-лимфоциты (T<sub>N</sub>, CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD95<sup>-</sup>), Т-клетки памяти со свойствами стволовых клеток (T<sub>SCM</sub>, CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>), Т-клетки центральной памяти (T<sub>CM</sub>, CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>), Т-клетки эффекторной памяти (T<sub>EM</sub>, CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) и терминально-дифферен-

цированные цитотоксические Т-лимфоциты (T<sub>EMRA</sub>, CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) [1, 2].

Основным методом оценки гетерогенности Т-клеточного пула периферической крови является проточная цитометрия [2, 3]. На сегодняшний день возможно одновременное выявление всех перечисленных субпопуляций циркулирующих Т-клеток памяти по одновременной экспрессии ряда поверхностных маркеров [1, 2]. При этом добавление в цитометрическую панель антител МНС-мультимеров, конъюгированных с молекулами флуорохромов, позволяет прицельно исследовать особенности дифференцировки и субпопуляционный состав антиген-специфических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

**Целью** настоящего исследования стала оценка субпопуляционного состава и содержания Т-клеток памяти внутри популяций HER2-специфических ЦТЛ.

Получение целевых популяций HER2-специфических ЦТЛ производилось по протоколу, разработанному нами ранее [4]. Кратко, ЦТЛ, специфичные к эпитомам E75 и E88 опухолевого антигена HER2/neu, получали с помощью совместного культивирования МНК ПК с аутологичными дендритными клетками, трансфицированными плазмидой, кодирующей эпитопы E75 и E88 HER2/neu.

Для выявления популяции HER2-специфических Т-лимфоцитов совместные культуры МНК и ДК окрашивались МНС-мультимерами технологии Streptamer (Iba, Германия), после чего окрашенные пробы дополнительно метились антителами для фенотипирования цитотоксических Т-клеток и затем анализировались методом проточной цитометрии на приборе BD FACS Verse.

В результате анализа схем цитометрического определения перечисленных субпопуляций Т-клеток, предложенных в научной литературе, для разделения клеток на популяции была подобрана панель антител и реагентов для проточной цитометрии, состоящая из следующих элементов: CD8-Brilliant-Violet-510, CD28-FITC, CD27-PerCP, CD95-PE-Cy7, CD127-APC, CD62L-APC-Cy7, CD45RA-Pacific-Blue и МНС-мультимеры, специфичные к эпитомам

E75 и E88 (Streptamer-PE). Цитометрический анализ HER2-специфических ЦТЛ с использованием описанной панели показал, что популяции активированных E75- и E88-специфических ЦТЛ характеризуются схожим распределением долей исследуемых субпопуляций (3–5% T<sub>N</sub>, 4–6% T<sub>EM</sub>, 9–11% T<sub>EMRA</sub>, 10–16% T<sub>CM</sub>, 42–52% T<sub>SCM</sub>), которое отличается от такового для общей популяции CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов существенно более низким содержанием наивных Т-клеток и более высоким содержанием клеток T<sub>SCM</sub>.

Таким образом, с использованием многоцветной проточной цитометрии и технологии Streptamer было показано, что субпопуляционный состав HER-специфических Т-лимфоцитов характеризуется значительным содержанием (более 40%) Т-клеток памяти со свойствами стволовых клеток и существенно меньшей долей наивных Т-клеток по сравнению с таковым в популяции CD8<sup>+</sup> Т-клеток периферической крови.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Mahnke Y. D., Brodie T. M., Sallusto F., Roederer M., Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets // *Eur J Immunol* 2013, 43, 2797–2809.
2. Кудрявцев И. В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // *Российский иммунологический журнал* 2014, 8(17), 4, 947–964. [Kudryavtsev I. V. Memory T cells: main populations and differentiation stages // *Rus Immunol J* 2014, 8(17), 4, 947–964].
3. Хайдуков С. В., Зурочка А. В., Толоян А. А., Черешнев В. А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) // *Медицинская Иммунология* 2009, 11, 2–3, 227–238. [Khaidukov S. V., Zurochka A. V., Totolyan A. A., Chereshev V. A. The main and small populations of human peripheral blood lymphocytes and their normative values (by the method of multicolor cytometric analysis) // *Meditsinskaya Immunologia* 2009, 11, 2–3, 227–238.
4. Kuznetsova M., Lopatnikova J., Khantakova J., Maksyutov R., Maksyutov A., Sennikov S. Generation of populations of antigen-specific cytotoxic T cells using DCs transfected with DNA construct encoding HER2/neu tumor antigen epitopes. // *BMC Immunol* 2017, 18, doi:10.1186/s12865-017-0219-7.

**PHENOTYPING OF ANTIGEN-SPECIFIC CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTES  
BY THE METHOD OF MULTICOLOR FLOW CYTOMETRY**© 2019 M. S. Kuznetsova<sup>1</sup>, J. A. Lopatnikova<sup>1</sup>, S. V. Sennikov<sup>1,2\*</sup>*\*E-mail: sennikovsv@gmail.com*<sup>1</sup>*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;*<sup>2</sup>*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia***Received:** 15.03.2019. **Accepted:** 03.04.2019

Modern methods of multicolor flow cytometry in combination with MHC multimer technologies allow not only to identify and isolate cytotoxic T-lymphocyte (CTL) populations, but also to conduct phenotypic research on the level of differentiation, functional features of these cells, and even to investigate the distribution of memory T-cell subsets inside populations specific to particular epitopes of tumor antigens. In the present study, we assessed the level of differentiation and the content of memory T-cell subpopulations in cytotoxic T-lymphocyte populations specific for HER2/neu antigen epitopes (HER2) using the MHC-multimers antigen-specific CD8<sup>+</sup> T-cell staining method and multicolor flow cytometry. The resulting HER2-specific T cells to a large extent (about 40–50%) have the TSCM phenotype, a population capable of the most pronounced antitumor immune response due to a combination of effector properties with self-sustainability.

*Key words:* cytotoxic T lymphocytes, CD8<sup>+</sup> T cells, memory T-cell phenotyping, multicolor flow cytometry, MHC multimers, HER2/neu

**Authors:**

**Kuznetsova M. S.**, junior researcher of the Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

**Lopatnikova J. A.**, PhD, senior researcher of the Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

**Sennikov S. V.**, ✉ PhD, MD, professor, head of the Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia. **E-mail:** sennikovsv@gmail.com