

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ PD1 НА CD3⁺ ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ КРЫСЫ, СТИМУЛИРОВАННЫХ АНТИТЕЛАМИ К CD3, МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Храмова Т.В., Бедулева Л.В., Фомина К.В., Абишева Н.Н.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Россия

ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия

Резюме. Исследование PD-1/PD-L сигнального пути в регуляции иммунного ответа является фокусом исследований в настоящее время. Показана ключевая роль PD-1 молекулы в регуляции ауто-иммунных, противоопухолевых и противовирусных реакций. Культура лимфоцитов крыс и мышей, а также экспериментальные модели иммунопатологий на животных широко используются в исследованиях. Однако лимфоциты крыс почти не используют для изучения PD-1/PD-L пути. Нет данных об экспрессии PD-1 или ее индукции в лимфоцитах крыс. В культуре Т-лимфоцитов человека экспрессию PD-1 можно индуцировать с помощью сорбированных в лунках планшета антител к CD3 клона N1B1412. В настоящем исследовании мы выясняли влияние антител к CD3 крысы клона G4.18 на экспрессию PD-1 в культуре лимфоцитов периферической крови интактных крыс Wistar. По некоторым данным литературы, антитела к CD3 клона G4.18 в иммобилизованном виде могут активировать изолированные Т-клетки крыс, а по другим, ингибируют аллогенные реакции в смешанной культуре лимфоцитов, блокируют цитотоксичность клеток, полученных от крыс с развившейся реакцией отторжения трансплантата. Мы обнаружили, что инкубация лимфоцитов крови крыс с иммобилизованными на пластике антителами к CD3 клона G4.18 приводит к изменению морфологии клеток и индукции PD-1 на CD3⁺ лимфоцитах. После инкубации с антителами к CD3 доля PD-1⁺ лимфоцитов среди CD3⁺ лимфоцитов составила 12,05±6,04%, что достоверно больше, чем доли таких клеток до инкубации и при инкубации в питательной среде, составившие 2,60±2,62% и 4,59±5,81% соответственно. На графиках дот-плот, показывающих распределение клеток по параметрам прямого и бокового светорассеяния, PD-1⁺CD3⁺ лимфоциты, индуцированные антителами к CD3, локализованы в области относительно меньшей величины прямого светорассеяния и большей величины бокового светорассеяния. Возможно, данные клетки относятся к клеткам, вступившим в апоптоз.

Ключевые слова: индукция PD-1, антитела к CD3, Т-лимфоциты, проточная цитометрия

Адрес для переписки:

Храмова Татьяна Владимировна
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный
университет»
426034, Россия, г. Ижевск, ул. Университетская, 1.
Тел.: 8 (909) 058-32-07.
E-mail: khratat@mail.ru

Address for correspondence:

Tatyana V. Khratova
Udmurt State University
1 Universitetskaya St
Izhevsk
426034 Russian Federation
Phone: +7 (909) 058-32-07.
E-mail: khratat@mail.ru

Образец цитирования:

Т.В. Храмова, Л.В. Бедулева, К.В. Фомина, Н.Н. Абишева «Анализ экспрессии PD1 на CD3⁺ лимфоцитах крови крысы, стимулированных антителами к CD3, методом проточной цитометрии» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 415-420.
doi: 10.46235/1028-7221-9639-FCA

© Храмова Т.В. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T.V. Khratova, L.V. Beduleva, K.V. Fomina, N.N. Abisheva "Flow cytometry analysis of PD1 expression on rat blood CD3⁺ lymphocytes stimulated by CD3 antibodies", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 415-420.
doi: 10.46235/1028-7221-9639-FCA

© Khratova T.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-9639-FCA

FLOW CYTOMETRY ANALYSIS OF PD1 EXPRESSION ON RAT BLOOD CD3⁺ LYMPHOCYTES STIMULATED BY CD3 ANTIBODIES

Khramova T.V., Beduleva L.V., Fomina K.V., Abisheva N.N.

Udmurt State University, Izhevsk, Russian Federation

Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation

Abstract. The role of PD-1/PD-L signaling pathway in the regulation of the immune response is currently in the focus of research. Numerous studies have shown the key role of PD-1 molecules in regulation of autoimmune, antitumor and antiviral responses. The culture of rat and mice lymphocytes, as well as animal experimental models of immunopathologies are widely used in research. However, rat lymphocytes are infrequently used for studying the PD-1/PD-L pathway. There are no data on PD-1 expression or methods of its induction in rat lymphocytes. In human T lymphocyte culture, PD-1 expression can be induced by NIB1412 anti-CD3 antibodies immobilized onto the wells of culture plates. In this study, we investigated the effect of G4.18 anti-CD3 antibody on the *in vitro* PD-1 expression by peripheral blood lymphocyte of intact Wistar rats. According to some literature data, the immobilized G4.18 anti-CD3 antibodies may activate isolated rat T cells, and, as elsewhere reported, inhibit allogeneic reactions in mixed lymphocyte culture and block cytotoxicity of cells obtained from the rats with a developed graft rejection response. We have found that incubation of rat blood lymphocytes with G4.18 anti-CD3 antibodies immobilized on plastic is associated with changes in cell morphology and induction of PD-1 on CD3⁺ lymphocytes. After incubation with anti-CD3 antibodies, the proportion of PD-1⁺ lymphocytes among CD3⁺ lymphocytes was 12.05±6.04%, thus being significantly higher than the proportion of such cells before incubation and during incubation in a cultural medium, which amounted to 2.60±2.62% and 4.59±5.81%, respectively. In the dot-plot graphs showing the cell distribution by the parameters of forward- and side-scatter, the PD-1⁺CD3⁺ lymphocytes induced by anti-CD3 antibodies are localized in the area of relatively low forward scatter and great side scatter. Hence, these cells may represent apoptotic cells.

Keywords: PD-1 induction, anti-CD3 antibodies, T lymphocytes, flow cytometry

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 0827-2020-0012).

Введение

PD-1 – молекула запрограммированной гибели 1 – экспрессируется Т-лимфоцитами во время активации и действует как естественный тормоз для сдерживания гиперактивации Т-лимфоцитов [6]. Ингибирующий рецептор PD-1 был назван «иммунным контрольным пунктом» в связи с его ролью в качестве привратника иммунных реакций [4]. В сигнальном пути PD-1 было обнаружено два лиганда: PD-L1 и PD-L2. Взаимодействие PD-1 с PD-L1 и PD-L2 вызывает функциональное истощение Т-клеток за счет ослабления пролиферации Т-клеток, продукции цитокинов и снижения выживаемости

Т-клеток [1]. Считается, что через путь PD-1 осуществляется негативная регуляция иммунной системы, поддерживающая периферическую толерантность и защищающая ткани от аутоиммунной атаки [2]. PD-L1, экспрессируемые на опухолевых клетках, взаимодействуют с PD-1 на атакующих их Т-клетках, что предотвращает их активацию и способствует индукции иммунной толерантности к опухоли [1].

Роль PD1/PD-L пути в функционировании Т-лимфоцитов человека исследуют в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Известно, что индуцировать экспрессию PD-1 в Т-лимфоцитах человека *in vitro* можно стимуляцией антителами к CD3 и антителами к CD28 [5]. Так, Thaventhiran и соавт. показали, что инкубация изолированных CD4⁺Т-клеток памяти человека в присутствии иммобилизованных в лунках планшета антител клона NIB1412, специфичных к эпсилон субъе-

динице CD3 человека, приводит к повышению числа PD-1 экспрессирующих клеток уже в первый день инкубации с максимумом на третий день [7].

В ряде случаев работа с использованием материалов человека ограничена, тогда исследования проводят на лабораторных животных. Мало известно об экспрессии PD-1 у крыс и возможности индукции экспрессии PD-1 *in vitro* и *in vivo*. Для индукции PD-1 на лимфоцитах крыс в настоящем исследовании мы апробировали антитела к CD3 клона G4.18. Показано, что данные антитела вызывают ингибирование аллогенных реакций в смешанной культуре лимфоцитов, блокируют цитотоксичность клеток, полученных от крыс с развившейся реакцией отторжения трансплантата [3]. В *in vivo* экспериментах показано, что терапия крыс антителами клона G4.18 индуцирует долгосрочную специфическую толерантность к аллотрансплантату органа [3], и способствует снижению тяжести и ускорению выздоровления от экспериментального аллергического энцефаломиелита путем блокирования функций эффекторных Th1-клеток [8]. Возможно, иммуносупрессивный эффект антител к CD3 клона G4.18 опосредован через сигнальный PD-1/PD-L путь. Однако вызывают ли антитела к CD3 клона G4.18 индукцию экспрессии PD-1 на лимфоцитах не известно.

Цель работы – исследовать влияние антител к CD3 клона G4.18 на экспрессию PD-1 на T-лимфоцитах *in vitro* у крыс Wistar.

Материалы и методы

Лимфоциты выделяли из свежей крови 13 интактных крыс Wistar (Питомник лабораторных животных «Рапполово») центрифугированием в растворе фикола, 400g, 30 минут. 1 млн лимфоцитов крови крыс в 1 мл полной питательной среды (ППС), содержащей среду RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), 50 Ед/мл пенициллина («ПанЭко», Россия), 0,05 мг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) культивировали 2,5 суток при 37 °С, 5% CO₂ в 24-луночном планшете с предварительно засорбированными на дне лунок антителами к CD3 клона G4.18 (Anti-Rat CD3 SAFIRE Purified, MBS696583, MyBioSource, США). Для сорбции антител, 500 мкл раствора антител в ЗФР с С = 5 мкг/мл инкубировали 2 часа при 37 °С, затем дважды отмывали ЗФР и один раз питательной средой RPMI-1640. После культивирования клетки извлекали из лу-

нок, центрифугировали и измеряли популяции клеток на проточном цитометре CytoFLEX Flow Cytometer Beckman Coulter (предоставлен Центром коллективного пользования приборами ФГБОУ ВО УдГУ) с использованием антител к CD3 крысы, меченных FITC, антител к PD-1 крысы, меченных APC (MyBioSource, США). Статистический анализ проводили с помощью ANOVA, GraphPad Prism 8.4.3. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Типичная картина распределения клеток по параметрам бокового и прямого светорассеяния, выявленная до культивирования, после 2,5 дней культивирования без антител и в присутствии антител к CD3 клона G4.18 представлена на рисунке 1 А-В (см. 2-ю стр. обложки). Область I по параметрам прямого и бокового светорассеяния соответствует интактным лимфоцитам крыс. Как видно на рисунке 1А (см. 2-ю стр. обложки), большая часть интактных лимфоцитов крови, изолированных на фиколе, локализуется в области I. После 2,5-дневного инкубирования клеток в питательной среде без антител к CD3 большая часть клеток остается в той же области I (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки). Клетки, культивированные 2,5 дня в присутствии антител к CD3, локалируются в области II, т. е. характеризуются относительно большей величиной бокового светорассеяния и малой величиной прямого светорассеяния, что указывает на уменьшение размеров клеток и усложнение их внутренней структуры под действием антител к CD3 (рис. 1В, см. 2-ю стр. обложки; табл. 1).

Таким образом, стимуляция лимфоцитов крови крыс иммобилизованными на пластике антителами к CD3 клона G4.18 вызывает изменение их морфологии. Возможно, это связано с инициацией в этих клетках апоптоза, т. к. известно, что по мере развития апоптоза клетки уменьшаются в размерах.

Процент CD3⁺ лимфоцитов от области I после инкубирования в ППС остается прежним, в то время как культивирование в присутствии антител к CD3 ведет к достоверному уменьшению процента CD3⁺ лимфоцитов в области I и достоверному увеличению доли CD3⁺ лимфоцитов от области II относительно исходного количества CD3⁺ клеток в этой области, более значительно, чем увеличение доли CD3⁺ лимфоцитов, ин-

ТАБЛИЦА 1. ПРОЦЕНТНОЕ КОЛИЧЕСТВО ЛИМФОЦИТОВ И ИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ДО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ПОСЛЕ 2,5 ДНЕВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ПРИСУТСТВИИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ АНТИТЕЛ К CD3 КЛОНА G4.18 И БЕЗ НИХ, СРЕДНЕЕ \pm S D, n = 13

TABLE 1. PERCENTAGE OF LYMPHOCYTES AND LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS BEFORE CULTIVATION AND AFTER 2.5 DAYS OF CULTIVATION IN THE PRESENCE OF IMMOBILIZED G4.18 ANTI-CD3 ANTIBODIES AND WITHOUT THEM, MEAN \pm SD, n = 13

% клеток Percentage of cells	Интактные лимфоциты Intact lymphocytes	Лимфоциты, инкубированные в ППС Lymphocytes incubated in a complete culture medium	Лимфоциты, инкубированные в присутствии антител к CD3 Lymphocytes incubated in the presence of anti-CD3 antibodies
Лимфоциты от области I Lymphocytes from gate I	47,60 \pm 17,43	37,69 \pm 15,63	9,48 \pm 11,41**
Лимфоциты от области II Lymphocytes from gate II	7,37 \pm 2,47	35,04 \pm 8,44*	56,22 \pm 12,45**
CD3 ⁺ лимфоциты от области I CD3 ⁺ lymphocytes from gate I	66,60 \pm 7,86	69,99 \pm 8,02	25,08 \pm 19,63**
CD3 ⁺ лимфоциты от области II CD3 ⁺ lymphocytes from gate II	14,13 \pm 10,03	44,99 \pm 9,24*	23,04 \pm 8,97**
PD-1 ⁺ лимфоциты среди CD3 лимфоцитов области I PD-1 ⁺ lymphocytes from CD3 lymphocytes of gate I	0,24 \pm 0,19	0,32 \pm 0,26	0,64 \pm 0,76
PD-1 ⁺ лимфоциты среди CD3 лимфоцитов области II PD-1 ⁺ lymphocytes from CD3 lymphocytes of gate II	2,60 \pm 2,62	4,59 \pm 5,81	12,05 \pm 6,04**

Примечание. * – достоверно, по сравнению с данными интактных лимфоцитов ($p < 0,01$, ANOVA), ** – достоверно, по сравнению с данными двух других групп ($p < 0,01$, ANOVA).

Note. *, significantly, compared with the data of intact lymphocytes ($p < 0,01$, ANOVA); **, significantly, compared with the data of the other two groups ($p < 0.01$, ANOVA).

кубированных в ППС, доля которых в области II тоже достоверно увеличивается (табл. 1).

Исследование экспонирования PD-1 на мембране лимфоцитов показало, что в области I PD-1⁺CD3⁺ лимфоциты отсутствуют (табл. 1). PD-1⁺ лимфоциты найдены в области II (табл. 1). В области II доля PD-1⁺ лимфоцитов среди CD3⁺ лимфоцитов достоверно выше в образцах лимфоцитов, инкубированных в присутствии антител к CD3, чем в образцах, инкубированных в ППС без антител (табл. 1; рис. 1, см. 2-ю стр. обложки). Таким образом, антитела к CD3 кло-

на G4.18 индуцируют экспрессию PD1⁺ в CD3⁺ лимфоцитах и вызывают изменение их морфологии.

Выводы

Культивирование лимфоцитов крови крыс Wistar в присутствии иммобилизованных в лунках планшета антител к CD3 клонa G4.18 приводит к увеличению числа PD1⁺ экспрессирующих клеток среди Т-лимфоцитов и изменению их морфологии.

Список литературы / References

1. Chikuma S. Basics of PD-1 in self-tolerance, infection, and cancer immunity. *Int. J. Clin. Oncol.*, 2016, Vol. 21, no. 3, pp. 448-455.
2. Francisco L.M., Sage P.T., Sharpe A.H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol. Rev.*, 2010, Vol. 236, pp. 219-242.
3. Nicolls M.R., Aversa G.G., Pearce N.W., Spinelli A., Berger M.F., Gurley K.E., Hall B.M. Induction of long-term specific tolerance to allografts in rats by therapy with an anti-CD3-like monoclonal antibody. *Transplantation*, 1993, Vol. 55, no. 3, pp. 459-468.
4. Pauken K.E., Torchia J.A., Chaudhri A., Sharpe A.H., Freeman G.J. Emerging concepts in PD-1 checkpoint biology. *Semin. Immunol.*, 2021, Vol. 52, 101480. doi: 10.1016/j.smim.2021.101480.
5. Riella L.V., Paterson A.M., Sharpe A.H., Chandraker A. Role of the PD-1 pathway in the immune response. *Am. J. Transplant.*, 2012, Vol. 12, no. 10, pp. 2575-2587.
6. Sharpe A.H., Pauken K.E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat. Rev. Immunol.*, 2018, Vol. 18, no. 3, pp. 153-167.
7. Thaventhiran T., Alhumeed N., Yeang H.X., Sethu S., Downey J.S., Alghanem A.F., Olayanju A., Smith E.L., Cross M.J., Webb S.D., Williams D.P., Bristow A., Ball C., Stebbings R., Sathish J.G. Failure to upregulate cell surface PD-1 is associated with dysregulated stimulation of T cells by TGN1412-like CD28 superagonist. *MAbs*, 2014, Vol. 6, no. 5, pp. 1290-1299.
8. Tran G.T., Carter N., He X.Y., Spicer T.S., Plain K.M., Nicolls M., Hall B.M., Hodgkinson S.J. Reversal of experimental allergic encephalomyelitis with non-mitogenic, non-depleting anti-CD3 mAb therapy with a preferential effect on T(h)1 cells that is augmented by IL-4. *Int. Immunol.*, 2001, Vol. 13, no. 9, pp. 1109-1120.

Авторы:

Храмова Т.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия

Бедулева Л.В. — д.б.н., доцент, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; ведущий научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия

Authors:

Khramova T.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Research Associate, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation

Beduleva L.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Leading Research Associate, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation

Фомина К.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; старший научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия

Fomina K.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Senior Research Associate, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation

Абисева Н.Н. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия

Abisheva N.N., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Research Associate, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation

Поступила 15.05.2023
Отправлена на доработку 29.06.2023
Принята к печати 05.07.2023

Received 15.05.2023
Revision received 29.06.2023
Accepted 05.07.2023

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ИНФОРМАТИВНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ СИСТЕМНЫХ ПОРАЖЕНИЯХ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ У ДЕТЕЙ» (АВТОРЫ: ЖУЖУЛА А.А., КУРБАТОВА О.В., СНОВСКАЯ М.А., ПЕТРИЧУК С.В., КОМЯГИНА Т.М., ТРЯПОЧКИНА А.С. [с. 251-258])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "SIGNIFICANCE OF DETERMINING ANTINUCLEAR ANTIBODIES IN SYSTEMIC CONNECTIVE TISSUE DISORDERS IN CHILDREN" (AUTHORS: ZHUZHULA A.A., KURBATOVA O.V., SNOVSKAYA M.A., PETRICHUK S.V., KOMYAGINA T.M., TRYAPOCHKINA A.S. [pp. 251-258])

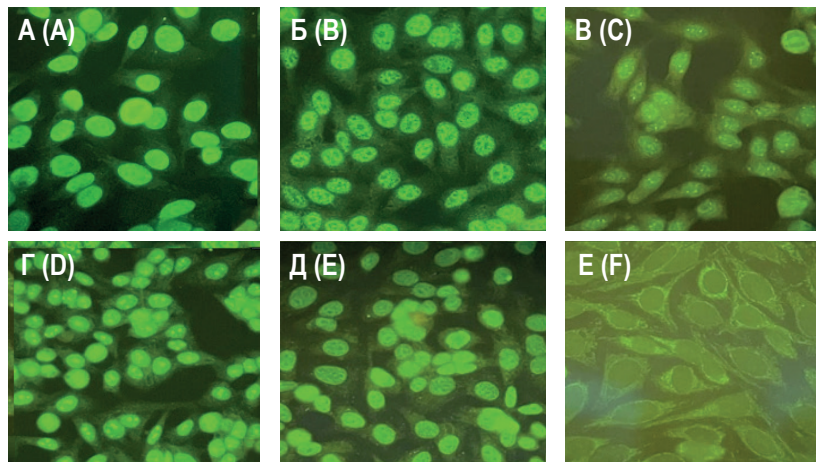


Рисунок 1. АНА на клеточной линии HEp-2 (Immco Diagnostics, Inc., США)

Примечание. А – гомогенный; Б – гранулярный; В – точки в ядре; Г – ядрышковый; Д – смешанный; Е – цитоплазматические типы свечения, флюоресцентная микроскопия, микроскоп Nikon Eclipse Ni (Япония), при $\times 40$ увеличении.

Figure 1. ANA on the HEp-2 cell substrates (Immco Diagnostics, Inc., USA)

Note. A, homogenous; B, speckled; C, nuclear dots; D, nucleolar; E, homogenous+ speckled; F, cytoplasmic types of luminescence, fluorescence microscopy, Nikon Eclipse Ni microscope (Japan), $\times 40$ magnification.

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ PD1 НА CD3+ ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ КРЫСЫ, СТИМУЛИРОВАННЫХ АНТИТЕЛАМИ К CD3, МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ» (АВТОРЫ: ХРАМОВА Т.В., БЕДУЛЕВА Л.В., ФОМИНА К.В., АБИШЕВА Н.Н. [с. 415-420])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "FLOW CYTOMETRY ANALYSIS OF PD1 EXPRESSION ON RAT BLOOD CD3+ LYMPHOCYTES STIMULATED BY CD3 ANTIBODIES" (AUTHORS: KHRAMOVA T.V., BEDULEVA L.V., FOMINA K.V., ABISHEVA N.N. [pp. 415-420])

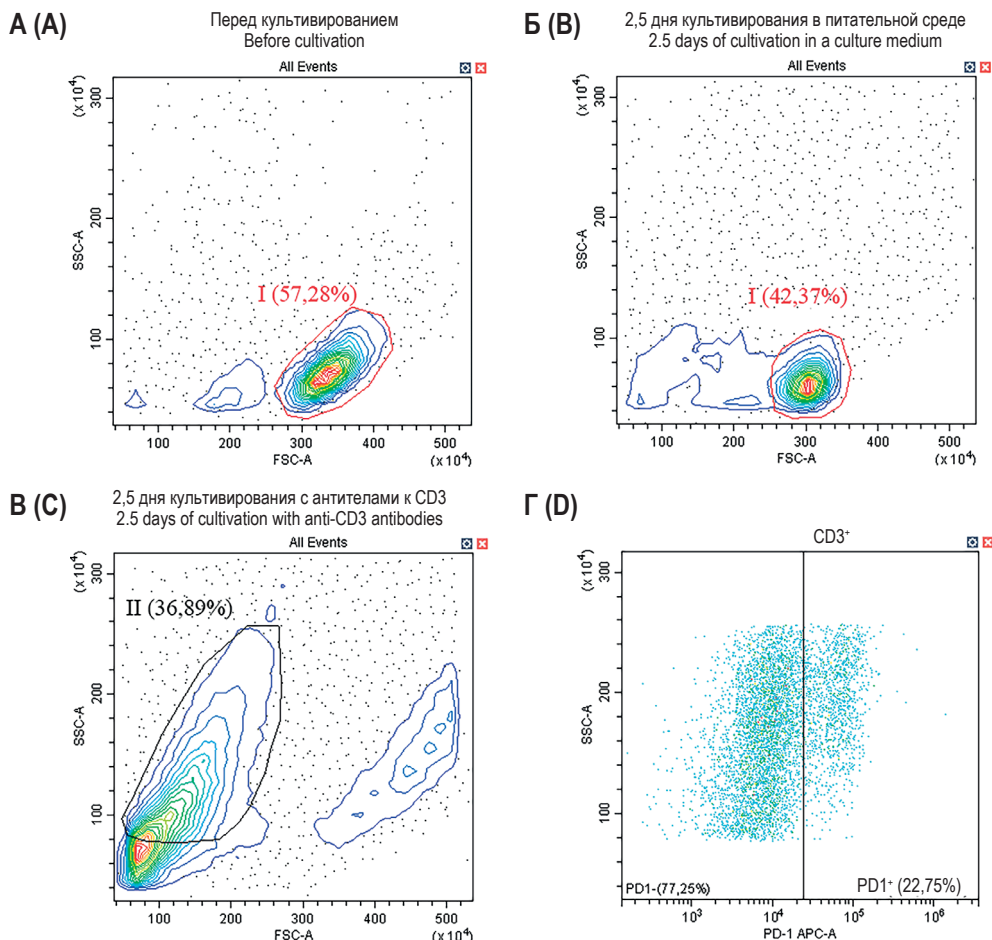


Рисунок 1. Репрезентативные диаграммы распределения лимфоцитов периферической крови крыс по параметрам прямого и бокового светорассеяния клеток перед культивированием (А), после 2,5-дневного инкубирования в питательной среде (Б) и после 2,5-дневного культивирования с иммобилизованными на дне лунок антителами к CD3 (В). Г – пример диаграммы для определения процента PD1+ клеток среди CD3+Т-лимфоцитов

Figure 1. Representative forward and side scatter plot of rat peripheral blood lymphocytes before cultivation (A), after 2,5 days of cultivation in a culture medium (B) and after 2,5 days of cultivation with anti-CD3 antibodies immobilized at the bottom of the wells (C). D is an example of a plot for determining the percentage of PD1+ cells among CD3+T lymphocytes