

МОДИФИКАЦИЯ ПРОТОКОЛА ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ОТТАЯВШИХ ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Сайдакова Е.В.^{1,2},
Королевская Л.Б.¹,
Пономарева В.Н.²,
Власова В.В.¹

¹ Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН –
филиал ФГБУН Пермского федерального
исследовательского центра УрО РАН
(614081, г. Пермь, ул. Голева, 13, Россия)

² ФГАОУ ВО «Пермский государственный
национальный исследовательский
университет» (614068, г. Пермь,
ул. Букирева, 15, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Сайдакова Евгения Владимировна,
e-mail: radimira@list.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Иммунологические исследования невозможны без длительного хранения биоматериала в условиях криоконсервации. Стандартные методики работы с мононуклеарными лейкоцитами, подвергавшимся криоконсервации, отсутствуют.

Цель исследования. Оптимизировать протокол культивирования оттаявших после криоконсервации Т-лимфоцитов по оценке их жизнеспособности и пролиферативной активности.

Методы. Мононуклеарные лейкоциты выделяли из периферической крови относительно здоровых добровольцев ($n = 18$). Клетки подвергали контролируемому замораживанию до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ и переносили в жидкий азот. Первый этап: после оттаивания клетки окрашивали CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester), делили на две части и культивировали в присутствии/отсутствии интерлейкина 2 (ИЛ-2). Пролиферацию клеток стимулировали фитогемагглютинином-П. Клетки инкубировали в течение 7 суток. Анализ образцов проводили методом проточной цитофлуориметрии. Второй этап: оттаявшие клетки делили на три части. Две части ресуспендировали в полной питательной среде с ИЛ-2 и помещали в термостат ($+37\text{ }^{\circ}\text{C}$) для «отдыха» на 1 час или на ночь. После «отдыха» клетки окрашивали CFSE. Третью часть размороженных лейкоцитов окрашивали CFSE сразу после оттаивания. Клетки стимулировали, культивировали и анализировали единообразно на обоих этапах исследования.

Результаты. Установлено, что добавление ИЛ-2 в культуральную среду способствует лучшему выживанию клеток. Кроме того, в присутствии ИЛ-2 стимулированные CD4^{+} и CD8^{+} Т-лимфоциты производят больше дочерних поколений. По сравнению с пробами, сразу помещёнными в культуру, в пробах, прошедших «отдых», снижено число лейкоцитов по окончании 7-суточной инкубации. Количество дочерних поколений, формируемых стимулированными CD4^{+} и CD8^{+} Т-клетками, снижается при включении этапа «отдых» в протокол исследования.

Заключение. Внесение ИЛ-2 в культуральную среду может увеличить жизнеспособность и митотическую активность размороженных Т-клеток, приближая их состояние к таковому свежесделенных лимфоцитов. «Отдых» клеток после оттаивания оказывает негативный эффект на жизнеспособность и пролиферативную активность Т-лимфоцитов при их последующей недельной инкубации.

Ключевые слова: Т-лимфоциты, криоконсервация, культивирование, ИЛ-2, отдых

Статья поступила: 18.09.2023

Статья принята: 27.05.2024

Статья опубликована: 15.07.2024

Для цитирования: Сайдакова Е.В., Королевская Л.Б., Пономарева В.Н., Власова В.В. Модификация протокола исследования функциональной активности оттаявших после криоконсервации Т-лимфоцитов. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(3): 256-265. doi: 10.29413/ABS.2024-9.3.26

ADAPTING THE PROTOCOL FOR STUDYING THE FUNCTIONAL CAPACITY OF T LYMPHOCYTES THAWED FROM CRYOPRESERVATION

Saidakova E.V.^{1,2},
 Korolevskaya L.B.¹,
 Ponomareva V.N.²,
 Vlasova V.V.¹

¹ Institute of Ecology and Genetics
 of Microorganisms UB RAS –
 Branch of the Perm Federal Research
 Center, Ural Branch of the Russian Academy
 of Sciences (Goleva str. 13, Perm 614081,
 Russian Federation)

² Perm State University (Bukireva str. 15,
 Perm 614068, Russian Federation)

Corresponding author:
 Evgeniya V. Saidakova,
 e-mail: radimira@list.ru

ABSTRACT

Background. Immunological studies are impossible without long-term storage of cryopreserved biomaterial. There are no standard procedures for working with cryopreserved mononuclear leukocytes.

The aim of the study. To optimize the protocol for culturing T lymphocytes thawed after cryopreservation by assessing their viability and proliferative capacity.

Methods. Mononuclear leukocytes were isolated from the peripheral blood of relatively healthy volunteers ($n = 18$). Cells were subjected to controlled freezing down to -80°C and were transferred to liquid nitrogen. First step: after thawing, the cells were stained with CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester), were divided into two parts and cultured in the presence/absence of interleukin 2 (IL-2). Cell proliferation was stimulated with phytohemagglutinin (type P). Cells were incubated for 7 days. Sample analysis was performed using flow cytometry. Second stage: thawed cells were divided into three parts. Two parts were resuspended in a full growth medium with IL-2 and were placed in a thermostat ($+37^{\circ}\text{C}$) to “rest” for one hour or overnight. After “resting”, the cells were stained with CFSE. One third of the thawed leukocytes were stained with CFSE immediately after thawing. Cells were stimulated, cultured and analyzed the same way at both stages of the study.

Results. It has been established that adding IL-2 to the culture medium contributes to a better cell survival. In the presence of IL-2, stimulated CD4^{+} and CD8^{+} T lymphocytes produced more daughter cell generations. At the end of the 7-day incubation “rested” samples had reduced leukocyte counts compared to the samples that were cultured immediately after thawing. The number of daughter cell generations formed by stimulated CD4^{+} and CD8^{+} T cells decreased when the “rest” stage was included into the study protocol.

Conclusion. Adding IL-2 into culture medium can increase the viability and mitotic capacity of thawed T cells, making their state more similar to that of freshly isolated lymphocytes. Cell “rest” after thawing negatively affects the viability and proliferative activity of T lymphocytes during their weekly incubation.

Keywords: T lymphocytes, cryopreservation, primary cell culture, interleukin 2, rest

Received: 18.09.2023
 Accepted: 27.05.2024
 Published: 15.07.2024

For citation: Saidakova E.V., Korolevskaya L.B., Ponomareva V.N., Vlasova V.V. Adapting the protocol for studying the functional capacity of T lymphocytes thawed from cryopreservation. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(3): 256-265. doi: 10.29413/ABS.2024-9.3.26

ОБОСНОВАНИЕ

Эффективные исследования в области иммунологии невозможны без постоянного доступа к биологическому материалу, что предполагает необходимость его сбора, накопления и хранения. На сегодняшний день единственным способом длительного хранения ядерных клеток периферической крови является их криоконсервация: содержание при очень низких температурах ($-80 \dots -196^\circ\text{C}$). Использование биобанков, позволяющих накапливать и хранить в жидком азоте биологические образцы, значительно облегчает проведение исследований, направленных на изучение причин развития различных заболеваний, разработку и апробацию лекарственных средств [1].

Следует отметить, что криоконсервация может влиять на экспрессию фенотипических маркеров и функциональную активность моноклеарных клеток периферической крови [2, 3]. Для нивелирования эффектов криоконсервации рядом исследователей [4, 5] было предложено после проведения процедуры оттаивания ввести в протокол работы этап «отдыха»: помещение клеток в полную питательную среду (ППС) на период от 1 до 24 ч при температуре $+37^\circ\text{C}$. Было показано, что эта процедура оказывает позитивный эффект на клетки, в частности способствует восстановлению функциональности антигенспецифических Т-лимфоцитов при оценке методом ELISPOT [6–10]. Другие исследователи [11–14] предложили обогащать среду для культивирования добавками, такими как цитокины, в частности интерлейкин 2 (ИЛ-2), пируват натрия, заменимые аминокислоты, β -меркаптоэтанол и др., что должно способствовать лучшему выживанию Т-лимфоцитов в культуре и в конечном итоге повышению их функциональной активности. Однако на сегодняшний день методики работы с моноклеарными лейкоцитами, подвергавшимися длительной (более 24 мес.) криоконсервации, не разработаны.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оптимизация протокола культивирования оттаявших после криоконсервации Т-лимфоцитов по оценке их жизнеспособности и пролиферативной активности.

МЕТОДЫ

Участники исследования. В качестве доноров периферической крови в исследовании приняли участие добровольцы ($n = 18$; 39% – женщины; средний возраст $37,4 \pm 1,2$ года). Критерием включения в исследование был возраст старше 18 лет. Критерии исключения: острые инфекционные заболевания менее чем за 4 недели до начала исследования; беременность.

Получение биоматериала. Забор крови осуществляли натошак из локтевой вены в вакуумные пробирки (Weihai Hongyu Medical Devices Co, Ltd., Китай), содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту. Монокле-

арные лейкоциты выделяли стандартным методом путём центрифугирования двукратно разведённой крови раствором фосфатно-солевого буфера Дульбекко (DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline; Gibco, США) в градиенте плотности Диаколл (1,077 г/мл; Диаэм, Россия). Изолированные клетки дважды отмывали в растворе DPBS и помещали в среду, содержащую 90 % инактивированной теплом эмбриональной сыворотки (ЭТС; Biowest, Колумбия) и 10 % внутриклеточного криопротектора диметилсульфоксида (AppliChem, Германия). Клетки, ресуспендированные в этой среде, переносили в криопробирки и подвергали контролируемому замораживанию в коммерческих штативах CoolCell (Corning, США) с регулируемой скоростью снижения температуры ($-1^\circ\text{C}/\text{мин}$) в морозильной камере (-80°C) в течение суток, чтобы свести к минимуму повреждение клеток. Затем пробы переносили в резервуар с жидким азотом (-196°C) и хранили до последующего использования. Средняя продолжительность хранения образцов составила $40 \pm 1,4$ мес.

Перед проведением исследования моноклеарные лейкоциты размораживали при $+37^\circ\text{C}$ в водяной бане в течение 1–2 мин. Клетки переносили в 15 мл пробирки, после чего к образцам капельно добавляли по 10 мл ППС: RPMI-1640, содержащей 25 мМ Хепеса и 2 мМ L-глутамина (Gibco, США), с добавлением 10 % ЭТС, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma, США). Образцы аккуратно перемешивали, наклоняя из стороны в сторону, и центрифугировали в течение 10 мин при 400 g. Клеточный осадок ресуспендировали в ППС. Жизнеспособность размороженных лейкоцитов при оценке с трипановым синим стандартным методом составила не менее 92 %.

Культивирование моноклеарных лейкоцитов.

На первом этапе исследования приготовленные после оттаивания клетки окрашивали 5 мкМ 5,6-карбоксифлуоресцеина диацетат-N-сукцинимидилового эфира (CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester; Biolegend, США), дважды отмывали средой RPMI-1640, содержащей 20 % ЭТС. Затем клетки подсчитывали в камере Горяева, делили на две части и ресуспендировали в концентрации $1 \times 10^6/\text{мл}$ в ППС с добавлением ИЛ-2 (100 нг/мл; Gibco, США) или без него (рис. 1а). Пролиферацию клеток стимулировали фитогемагглютинином-П (ФГА; Serva, Германия) в конечной концентрации 15 мкг/мл. В качестве контроля использовали нестимулированные клетки. Общая продолжительность культивирования лейкоцитов составила 7 суток с заменой на 3–4-е сутки культуральной среды в каждой пробе на среду аналогичного состава. Для поддержания постоянства pH среды клетки инкубировали в эксикаторе со свечой, помещёнными в термостат ($+37^\circ\text{C}$). По окончании времени инкубации клетки собирали, подсчитывали их количество и окрашивали анти-CD3-BV605, анти-CD4-PE и анти-CD8-BV510 антителами (Biolegend, США). Для оценки жизнеспособности моноклеарных лейкоцитов применяли краситель Zombie UV (Biolegend, США).

На втором этапе исследования (рис. 1б) культивирование клеток проводили в ППС, содержащей 100 нг/мл ИЛ-2. Полученные после разморозки моноклеарные лейкоци-

ты делили на три части, две из которых помещали в культуральную среду и убирали в термостат (+37 °C) для «отдыха» на 1 час (Ч) или на ночь (Н). После «отдыха» клетки окрашивали CFSE, стимулировали ФГА и культивировали, согласно описанному ранее протоколу. Третью часть размороженных лейкоцитов сразу после оттаивания (С) окрашивали CFSE и культивировали в присутствии ФГА, согласно указанному выше протоколу. Культивирование, смена среды, подсчёт клеток и анализ результатов проводились единообразно на протяжении всего исследования.

Проточная цитометрия. Анализ моноклеарных лейкоцитов проводили с использованием проточного цитофлюориметра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Логика гейтирования представлена на рисунке 2.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ и визуализацию данных проводили с помощью программного обеспечения «GraphPad Prism 8» (GraphPad Software, США). Количественные данные в тексте и таблицах представлены в виде средних и их стандартных ошибок. Для сравнения двух групп количественных данных использовали t-тест Стьюдента; нескольких групп – однофакторный дисперсионный анализ; множественные сравнения между группами проводили с помощью критерия Тьюки. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез приняли равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Модификация полной питательной среды внесением ИЛ-2. Проанализирована жизнеспособность моноклеарных лейкоцитов периферической крови, размороженных после длительной ($40 \pm 1,4$ мес.) криоконсервации и культивированных в течение 7 суток в различных условиях. Показано, что численность клеток резко снижается по окончании времени культивирования: в среднем в пробе оставалось 33 % от числа изначально внесённых клеток.

Вместе с тем было установлено, что добавление ИЛ-2 в культуральную среду способствует лучшему выживанию моноклеарных лейкоцитов (рис. 3). Наиболее выраженный позитивный эффект на жизнестойкость был отмечен среди клеток, стимулированных ФГА. Так, численность лейкоцитов в пробах, содержащих ИЛ-2, была существенно выше, чем в образцах без дополнительно внесённого цитокина ($p < 0,001$). Аналогичные результаты были получены при исследовании нестимулированных клеток. Однако в данных условиях культивирования различия в численности клеток между пробами, содержащими и не содержащими ИЛ-2, не достигли уровня статистической значимости ($p > 0,05$).

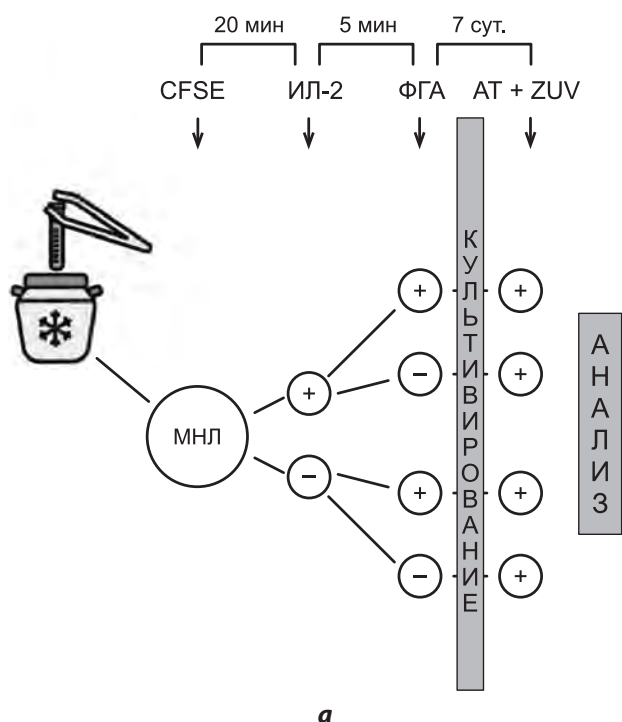


РИС. 1.
Общая схема исследования: **а** – первый этап исследования; **б** – второй этап исследования. МНЛ – моноклеарные лейкоциты; AT + ZUV – коктейль из анти-CD3-BV605, анти-CD4-PE, анти-CD8-BV510 антител и витального красителя Zombie UV. Типы «отдыха»: С – сразу после оттаивания (без «отдыха»); Ч – часовой «отдых»; Н – ночной «отдых»

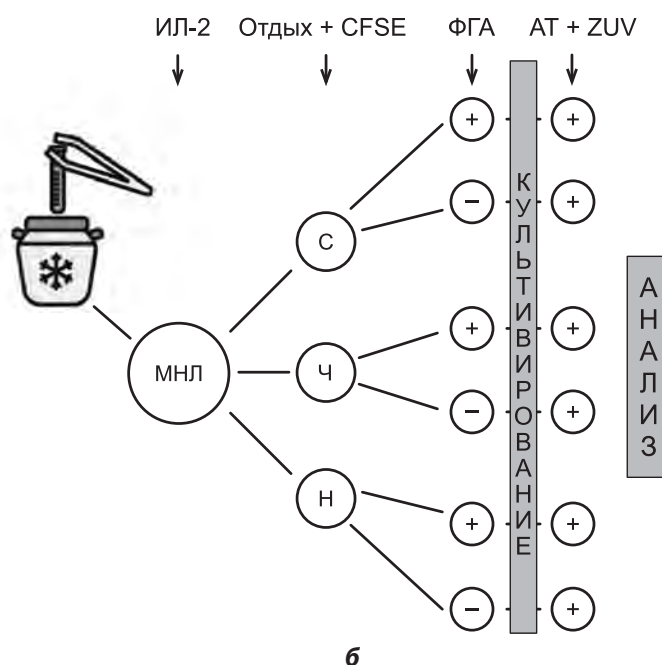


FIG. 1.
Study overview: **а** – first stage of the experiment; **б** – second stage of the experiment. МНЛ – mononuclear leukocytes; AT + ZUV – a cocktail of anti-CD3-BV605, anti-CD4-PE, anti-CD8-BV510 antibodies and Zombie UV vital stain. Types of “rest”: С – immediately after thawing (without “rest”); Ч – hourly “rest”; Н – overnight “rest”

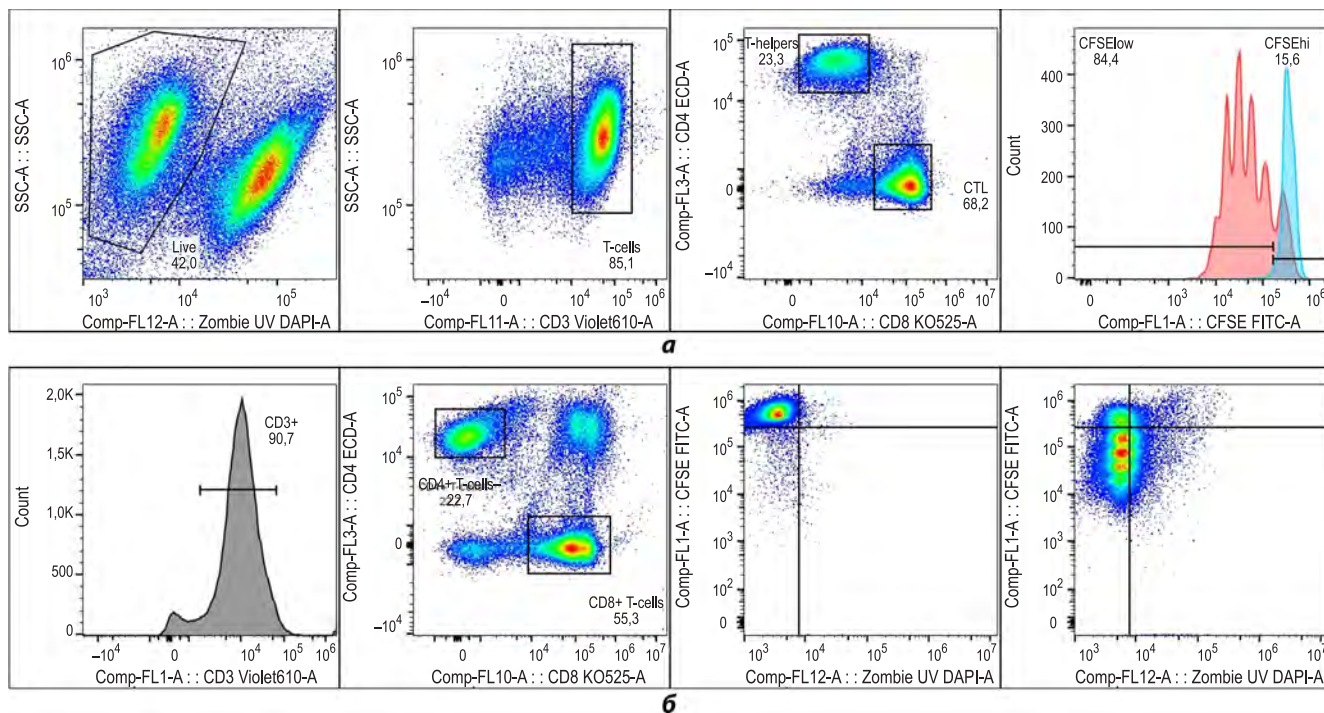


РИС. 2.

Логика гейтирования мононуклеарных лейкоцитов (типичные диаграммы светорассеяния). **а** – подсчёт числа дочерних генераций в пробах стимулированных Т-лимфоцитов: выделение пула жизнеспособных элементов с последующим гейтированием $CD3^+$ Т-клеток, их разделением на $CD4^+$ и $CD8^+$ субпопуляции и анализом окрашивания трекинговым красителем CFSE в каждой из субпопуляций. **б** – определение жизнеспособности делящихся Т-лимфоцитов: выделение $CD3^+$ Т-клеток с последующим разделением на субпопуляции $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов, установкой границ квадрантов по нестимулированной пробе и анализом одновременного окрашивания витальным красителем Zombie UV и трекинговым красителем CFSE стимулированного образца

FIG. 2.

The gating approach used to distinguish mononuclear leukocytes (typical scatter diagrams). **a** – enumeration of daughter cell generations in stimulated T lymphocyte samples: viable elements isolation followed by $CD3^+$ T cells gating, subsequent $CD4^+$ and $CD8^+$ subsets isolation, and CFSE staining analysis. **б** – determination of the dividing T lymphocytes viability: $CD3^+$ T cells isolation with subsequent dividing into $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes subsets, gating of unstimulated sample, following the simultaneous analysis of vital Zombie UV and CFSE staining of stimulated sample

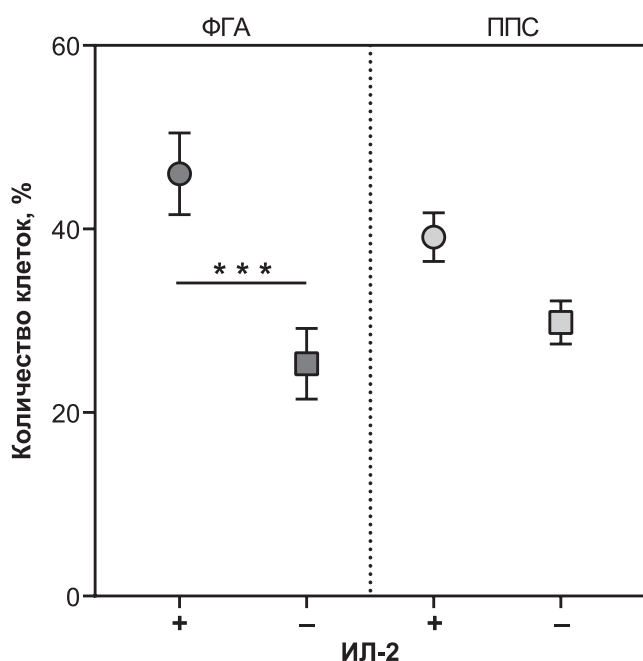


РИС. 3.

Влияние внесения в культуральную среду ИЛ-2 на численность мононуклеарных лейкоцитов после инкубации в течение 7 суток. Представлены средние и стандартные ошибки средних ($n = 18$ в каждой группе). Для сравнения групп количественных данных использовали однофакторный дисперсионный анализ; множественные сравнения между группами проводили с помощью критерия Тьюки; *** – $p < 0,001$

FIG. 3.

The impact of adding IL-2 to the growth medium on the mononuclear leukocytes count following 7 days of incubation. The means and standard errors of the means are presented ($n = 18$ in each group). One-way analysis of variance was used to compare groups of quantitative data; multiple comparisons between groups were performed using Tukey's test; *** – $p < 0.001$

Выявлен позитивный эффект экзогенно добавленного ИЛ-2 на пролиферативную способность Т-клеток, размороженных после длительной криоконсервации. Было показано, что в присутствии этого цитокина *in vitro* сти-

мулированные CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты производят больше дочерних генераций (рис. 4).

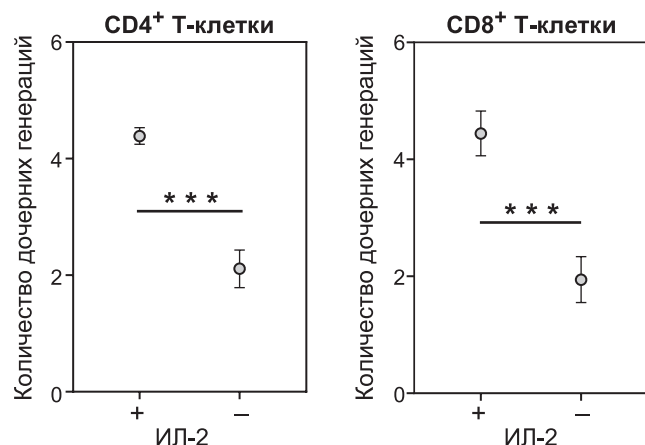


РИС. 4.

Влияние содержания в культуральной среде ИЛ-2 на пролиферативную способность CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, стимулированных в условиях *in vitro* в течение 7 суток. Представлены средние и стандартные ошибки средних ($n = 18$ в каждой группе). Для сравнения двух групп количественных данных использовали парный *t*-тест; *** – $p < 0,001$

FIG. 4.

The impact of adding IL-2 to the growth medium on the proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes during 7 days of *in vitro* stimulation. The means and standard errors of the means are presented ($n = 18$ in each group). Paired *t*-test was used to compare two groups of quantitative data; *** – $p < 0.001$

Таким образом, было определено, что добавление ИЛ-2 в среду для культивирования повышает как жизнеспособность, так и пролиферативную способность Т-лимфоцитов, прошедших длительную криоконсервацию.

Модификация протокола разморозки мононуклеарных лейкоцитов введением этапа «отдыха» клеток. Проведено исследование трёх протоколов разморозки клеток: без «отдыха», с часовым или ночным «отдыхом». В каждом случае культуральная среда содержала в своём составе ИЛ-2.

Установлен негативный эффект «отдыха» на жизнеспособность мононуклеарных лейкоцитов в культуре. Подсчёт клеток через 7 суток инкубации с ФГА показал, что по сравнению с пробами «С» число лейкоцитов в пробах «Ч» ($p < 0,05$) и «Н» ($p < 0,001$) было снижено (рис. 5а). Важно отметить, что длительность «отдыха» существенно влияла на жизнеспособность стимулированных клеток: различия между пробами «Ч» и «Н» были статистически значимыми ($p < 0,05$). При этом в пробах «Н» доля сохранившихся клеток была снижена более чем в 2 раза по сравнению с таковой в пробах «С». Кроме того, оказалось, что стимулированные клетки были более чувствительными к негативным эффектам «отдыха», чем покоящиеся элементы. В культурах без добавления ФГА различия численности клеток выявлены только между пробами «С» и «Н» ($p < 0,05$).

Анализ пролиферативной способности CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов подтвердил, что «отдых» является негативным фактором. Так, было показано, что количество дочерних генераций, формируемых стимулированными CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами, снижается при включении этапа «отдых» любого временного режима в протокол исследования (рис. 5б).

Примечательно, что относительное количество вступивших в деление CFSE^{low} клеток среди стимулированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов не зависело от типа «отдыха» ($p > 0,05$; рис. 5в).

Введение в протокол разморозки ночного «отдыха» существенно увеличивало процентное содержание гибнущих клеток среди вступивших в деление CD4⁺ Т-лимфоцитов, стимулированных в условиях *in vitro* в течение 7 суток (рис. 5г). Этот феномен не был отмечен при анализе CD8⁺ Т-клеток.

Таким образом, включение этапа «отдых» в протокол разморозки мононуклеарных лейкоцитов с последующим культивированием стимулированных клеток в течение 7 суток негативно сказывается на жизнеспособности и пролиферативной способности CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Рекомендуется приступать к работе с культурами клеток сразу после оттаивания криоконсервированных мононуклеарных лейкоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование поднимает ряд фундаментальных вопросов, касающихся особенностей изучения функциональной активности Т-лимфоцитов с применением клеток, прошедших криоконсервацию.

При проведении исследования нами было определено, что через 7 суток культивирования оттаявших после длительной ($40 \pm 1,4$ мес.) криоконсервации клеток в среднем в пробе сохраняется лишь треть от их изначально внесённого количества. Ранее при культивировании мононуклеарных лейкоцитов, не подвергавшихся заморозке, нами не было отмечено такого существенного снижения их численности. Анализ литературных источников подтвердил, что высокая склонность к гибели является характерной чертой клеток, прошедших процедуры криоконсервации и оттаивания [15].

Известно, что замораживание и размораживание запускают процессы, ведущие к клеточной смерти – некрозу и апоптозу. Некроз является следствием повреждения мембран внутриклеточными кристаллами льда и осмотическим стрессом. Причиной апоптоза могут быть различные факторы, в том числе физический стресс, вызванный изменением морфологии клетки; активация рецепторов смерти; накопление в цитозоле свободных радикалов; активация каскада каспаз [16, 17]. При использовании оптимального протокола криоконсервации основной причиной гибели размороженных клеток в культуре является апоптоз [15]. Было показано, что значительное количество Т-лимфоцитов постоянно запускает программу гибели, что приводит к статистически значимому сокращению доли жизнеспособных клеток уже через сутки

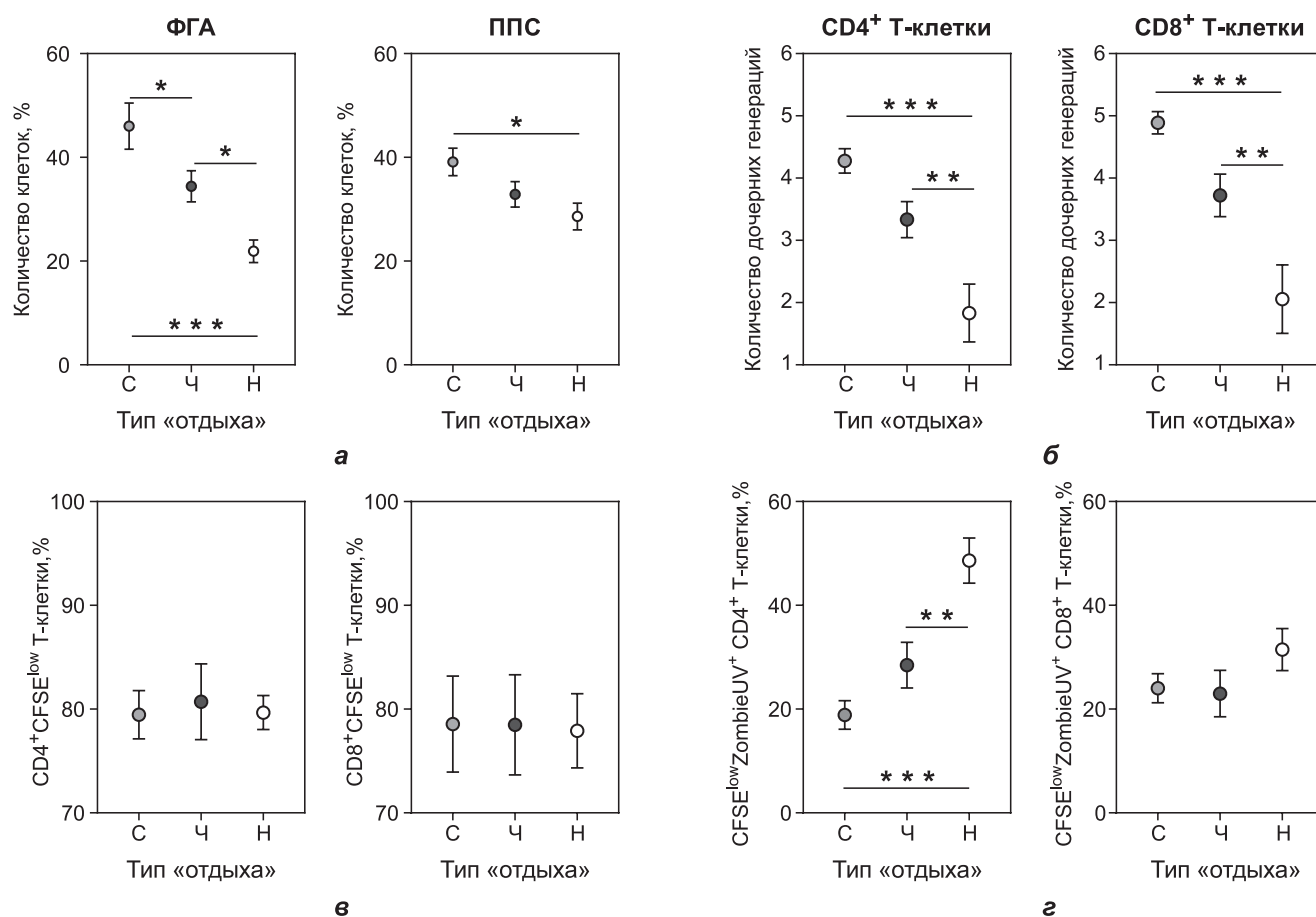


РИС. 5.

Влияние типа «отдыха» оттаявших после криоконсервации на параметры клеток в 7-суточной культуре (представлены средние и стандартные ошибки средних): **а** – численность мононуклеарных лейкоцитов в стимулированных и контрольных пробах; **б** – количество дочерних поколений стимулированных Т-лимфоцитов; **в** – доля пролиферирующих Т-лимфоцитов; **г** – процент Т-лимфоцитов, гибнущих в процессе деления. Типы «отдыха»: С – сразу после оттаивания (без «отдыха»; n = 18); Ч – часовой «отдых» (n = 18); Н – ночной «отдых» (n = 18). Для сравнения групп количественных данных использовали однофакторный дисперсионный анализ; множественные сравнения между группами проводили с помощью критерия Тьюки; * – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001

FIG. 5.

Effect of the type of "rest" on the thawed cells parameters in a 7-day culture (the means and standard errors of the means are presented). **a** – number of mononuclear leucocytes in stimulated and control samples; **б** – number of daughter T cell generations in stimulated samples; **в** – number of proliferating T lymphocytes; **г** – number of T cells dying while dividing. Types of "rest": С – immediately after thawing (without "rest"; n = 18); Ч – hourly "rest" (n = 18); Н – overnight "rest" (n = 18). One-way analysis of variance was used to compare groups of quantitative data; multiple comparisons between groups were performed using Tukey's test; * – p < 0.05; ** – p < 0.01; *** – p < 0.001

после начала инкубации. Исходя из того, что стимуляция оттаявших клеток цитокинами может значительно повысить жизнеспособность культивируемых клеток [15], мы исследовали эффект внесения ИЛ-2 в культуральную среду на функциональность Т-лимфоцитов, размороженных после длительной криоконсервации.

ИЛ-2, как и другие цитокины с общей гамма-цепью, принято рассматривать в качестве фактора выживания Т-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro* [18, 19]. Известно, что под воздействием ИЛ-2 активируются тирозинкиназы Янус-киназы (Jak) 1 и Jak3, примыкающие к цитоплазматическим фрагментам цепей цитокиновых рецепторов [20]. Эти ферменты фосфорилируют остатки тирозина, локализованные в цепях рецепторов, что созда-

ёт сайты для связывания и фосфорилирования адаптерного белка Shc и транскрипционного фактора STAT5 (преобразователь сигнала и активатор транскрипции 5) [21]. Фосфорилированный Shc активирует несколько сигнальных путей, минимум один из которых – PI3K/Akt (путь фосфатидилинозитол-3-киназы/протеинкиназы B) – играет важную роль в пролиферации Т-клеток [22]. В свою очередь фосфорилирование молекул STAT5, их димеризация и транслокация в ядро стимулируют экспрессию генов, участвующих в делении и защищающих лимфоциты от апоптоза [23].

В наших исследованиях было подтверждено положительное влияние внесённого в культуральную среду ИЛ-2 на жизнеспособность и пролиферативную ак-

тивность размороженных после криоконсервации Т-клеток. В присутствии этого цитокина мы наблюдали менее выраженное сокращение численности лейкоцитов в культуре и увеличение количества дочерних генераций при стимуляции Т-лимфоцитов. Однако культивируемые клетки по-прежнему массово умирали: их количество существенно сократилось после 7 суток инкубации.

Наиболее выраженный эффект ИЛ-2 оказывал на стимулированные CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты. По-видимому, более высокая чувствительность этих клеток обусловлена особенностью экспрессии рецептора, связывающего цитокин. Высокоаффинный рецептор к ИЛ-2 является комплексом трёх цепей: CD25, CD122 и CD132 [24]. На покоящихся Т-клетках в ограниченном количестве экспрессируются только две из них – CD122 и CD132. Связывая ИЛ-2, они могут формировать промежуточный по аффинности комплекс, способный передавать сигнал внутрь клетки. Стимулированные Т-лимфоциты в свою очередь индуцируют экспрессию CD25, что позволяет активированным Т-клеткам формировать примерный высокоаффинный рецептор, делающий стимулированные лимфоциты более чувствительными к действию цитокина.

Также в настоящем исследовании мы оценили, как введение в протокол разморозки клеток этапа «отдыха» влияет на функциональность прошедших криоконсервацию Т-лимфоцитов. Ранее несколько исследований [7–10], хотя и не все [25], продемонстрировали позитивные эффекты «отдыха»: снижение неспецифической продукции цитокинов Т-клетками; увеличение количества активных и доли полифункциональных Т-лимфоцитов. Все перечисленные феномены были обнаружены с использованием метода ELISPOT. Представленные авторами результаты, по-видимому, связаны с гибелью склонных к апоптозу Т-клеток в процессе «отдыха», что способствует увеличению доли истинно жизнеспособных лимфоцитов в анализируемом образце [9]. Это актуально ввиду того, что присутствие апоптотических клеток может снижать функциональность живых CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов [26] и препятствовать процессингу антигенов [27].

Как было отмечено выше, при культивировании оттаявшие после криоконсервации Т-клетки постоянно запускают процессы программируемой гибели [15], что проявилось в постепенном увеличении количества мёртвых и умирающих Т-лимфоцитов в поставленной нами 7-суточной культуре моноклеарных лейкоцитов. Можно предположить, что накопление апоптотических клеток при многосуточном культивировании оказывает негативный эффект на функциональную способность оставшихся Т-лимфоцитов, что не было отмечено при непродолжительных по времени исследованиях методом ELISPOT. Действительно, в нашем исследовании дополнительный «отдых» клеток (как часовой, так и ночной) приводил к существенному снижению численности лейкоцитов и увеличению доли апоптотических Т-лимфоцитов после 7 суток инкубации. Более того, мы отметили уменьшение количества дочерних

генераций среди прошедших «отдых» стимулированных Т-лимфоцитов без изменения доли CFSE^{low} клеток. Вероятно, в таких культурах по сравнению с образцами, где этап «отдыха» был исключён из протокола работы, большее число клеток вступают в деление, однако они совершают меньше митозов.

Следует отметить некоторые ограничения настоящего исследования. Во-первых, мы не воспроизвели результаты других научных групп и потому можем лишь предполагать, что «отдых» оказывает положительное влияние при последующих кратковременных исследованиях (например, методом ELISPOT), но негативное при дальнейшем более продолжительном культивировании клеток (в нашей работе – 7 суток). Во-вторых, для модификации ППС нами был использован единственный цитокин – ИЛ-2, эффектами которого могут быть не только стимулирование пролиферации Т-лимфоцитов, но также индукция регуляторных Т-клеток и запуск активационно-индуцированного апоптоза эффекторных элементов [28]. В дальнейших исследованиях мы предполагаем вносить в культуральную среду другие цитокины семейства ИЛ-2, в т. ч. ИЛ-7 и ИЛ-15, которые, как известно, эффективно поддерживают жизнеспособность и пролиферацию Т-лимфоцитов [29].

Невзирая на ограничения, следует подчеркнуть, что в настоящем исследовании мы впервые оценили влияние «отдыха» на результаты оценки пролиферативной способности и жизнеспособности при культивировании прошедших длительную (40 ± 1,4 мес.) криоконсервацию Т-лимфоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные побуждают к созданию новых протоколов работы с оттаявшими после криоконсервации моноклеарными лейкоцитами. Очевидно, что внесение экзогенных цитокинов может увеличить жизнеспособность и функциональную активность размороженных Т-клеток, приближая их состояние к таковому свежесыведенных лимфоцитов. Подбор оптимального сочетания компонентов среды для культивирования клеток позволит получать данные, более объективно отражающие процессы, происходящие *in vivo*. Обращает на себя внимание и то, что «отдых» моноклеарных лейкоцитов после оттаивания оказывает негативный эффект на жизнеспособность и пролиферативную активность стимулированных Т-лимфоцитов при недельной инкубации. Это ещё раз подчёркивает необходимость оптимизации исследовательских протоколов.

Финансирование

Исследование выполнено в рамках государственного задания № 124021900006-5.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Исследования материалов и вещества» ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН.

Соблюдение этических норм

План исследования был утверждён этическим комитетом (рег. № IRB00008964; протокол № 31 от 03.03.2017). Каждый донор крови предоставил письменное информированное согласие. Все процедуры, выполненные в рамках исследований с участием людей, соответствовали этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 г. и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Annaratone L, De Palma G, Bonizzi G, Sapino A, Botti G, Berrino E, et al. Basic principles of biobanking: From biological samples to precision medicine for patients. *Virchows Arch.* 2021; 479(2): 233-246. doi: 10.1007/s00428-021-03151-0
- Capelle CM, Ciré S, Ammerlaan W, Konstantinou M, Balling R, Betsou F, et al. Standard peripheral blood mononuclear cell cryopreservation selectively decreases detection of nine clinically relevant T cell markers. *Immunohorizons.* 2021; 5(8): 711-720. doi: 10.4049/immunohorizons.2100049
- Li B, Yang C, Jia G, Liu Y, Wang N, Yang F, et al. Comprehensive evaluation of the effects of long-term cryopreservation on peripheral blood mononuclear cells using flow cytometry. *BMC Immunol.* 2022; 23(1): 30. doi: 10.1186/s12865-022-00505-4
- Freer G, Rindi L. Intracellular cytokine detection by fluorescence-activated flow cytometry: Basic principles and recent advances. *Methods.* 2013; 61(1): 30-38. doi: 10.1016/j.jmeth.2013.03.035
- Horton H, Thomas EP, Stucky JA, Frank I, Moodie Z, Huang Y, et al. Optimization and validation of an 8-color intracellular cytokine staining (ICS) assay to quantify antigen-specific T cells induced by vaccination. *J Immunol Methods.* 2007; 323(1): 39-54. doi: 10.1016/j.jim.2007.03.002
- Santos R, Buying A, Sabri N, Yu J, Gringeri A, Bender J, et al. Improvement of IFNg ELISPOT performance following overnight resting of frozen PBMC samples confirmed through rigorous statistical analysis. *Cells.* 2015; 4(1): 1-18. doi: 10.3390/cells4010001
- Janetzki S, Panageas KS, Ben-Porat L, Boyer J, Britten CM, Clay TM, et al. Results and harmonization guidelines from two large-scale international ELISPOT proficiency panels conducted by the Cancer Vaccine Consortium (CVC/SVI). *Cancer Immunol Immunother.* 2008; 57(3): 303-315. doi: 10.1007/s00262-007-0380-6
- Britten CM, Gouttefangeas C, Welters MJ, Pawelec G, Koch S, Ottensmeier C, et al. The CIMT-monitoring panel: A two-step approach to harmonize the enumeration of antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes by structural and functional assays. *Cancer Immunol Immunother.* 2008; 57(3): 289-302. doi: 10.1007/s00262-007-0378-0
- Kutscher S, Dembek CJ, Deckert S, Russo C, Körber N, Bogner JR, et al. Overnight resting of PBMC changes functional signatures of antigen specific T cell responses: Impact for immune monitoring within clinical trials. *PLoS One.* 2013; 8(10): 76215. doi: 10.1371/journal.pone.0076215
- Boaz MJ, Hayes P, Tarragona T, Seamons L, Cooper A, Birungi J, et al. Concordant proficiency in measurement of T-cell immunity in human immunodeficiency virus vaccine clinical trials by peripheral blood mononuclear cell and enzyme-linked immunospot assays in laboratories from three continents. *Clin Vaccine Immunol.* 2009; 16(2): 147-155. doi: 10.1128/CVI.00326-08
- Wang H, Tsao ST, Gu M, Fu C, He F, Li X, et al. A simple and effective method to purify and activate T cells for successful generation of chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells from patients with high monocyte count. *J Transl Med.* 2022; 20(1): 608. doi: 10.1186/s12967-022-03833-6
- Mora-Buch R, Tomás-Marín M, Enrich E, Antón-Iborra M, Martorell L, Valdivia E, et al. Virus-specific T cells from cryopreserved blood during an emergent virus outbreak for a potential off-the-shelf therapy. *Transplant Cell Ther.* 2023; 29(9): 572.e1-572.e13. doi: 10.1016/j.jtct.2023.06.001
- Herda S, Heimann A, Obermayer B, Ciraolo E, Althoff S, Ruß J, et al. Long-term *in vitro* expansion ensures increased yield of central memory T cells as perspective for manufacturing challenges. *Int J Cancer.* 2021; 148(12): 3097-3110. doi: 10.1002/ijc.33523
- Clarkson BD, Johnson RK, Bingel C, Lothaller C, Howe CL. Preservation of antigen-specific responses in cryopreserved CD4(+) and CD8(+) T cells expanded with IL-2 and IL-7. *J Transl Autoimmun.* 2022; 5: 100173. doi: 10.1016/j.jtauto.2022.100173
- Sarkar S, Kalia V, Montelaro RC. Caspase-mediated apoptosis and cell death of rhesus macaque CD4⁺ T-cells due to cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells can be rescued by cytokine treatment after thawing. *Cryobiology.* 2003; 47(1): 44-58. doi: 10.1016/s0011-2240(03)00068-3
- Baust JM, Buskirk RV, Baust JG. Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2000; 36(4): 262. doi: 10.1290/1071-2690(2000)036<0262:cvifo>2.0.co;2
- Fu Y, Dang W, He X, Xu F, Huang H. Biomolecular pathways of cryoinjuries in low-temperature storage for mammalian specimens. *Bioengineering (Basel).* 2022; 9(10): 545. doi: 10.3390/bioengineering9100545
- Benczik M, Gaffen SL. The interleukin (IL)-2 family cytokines: Survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. *Immunol Invest.* 2004; 33(2): 109-142. doi: 10.1081/imm-120030732
- Abbas AK. The surprising story of IL-2: From experimental models to clinical application. *Am J Pathol.* 2020; 190(9): 1776-1781. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.05.007
- Leonard WJ, O'Shea JJ, Jaks and STATs: Biological implications. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16: 293-322. doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.293
- Friedmann MC, Migone TS, Russell SM, Leonard WJ. Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(5): 2077-2082. doi: 10.1073/pnas.93.5.2077
- Lali FV, Crawley J, McCulloch DA, Foxwell BM. A late, prolonged activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway is required for T cell proliferation. *J Immunol.* 2004; 172(6): 3527-3534. doi: 10.4049/jimmunol.172.6.3527

23. Mui AL, Wakao H, O'Farrell AM, Harada N, Miyajima A. Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin-5 transduce signals through two forms of STAT5. *J Leukoc Biol.* 1995; 57(5): 799-803. doi: 10.1002/jlb.57.5.799
24. Malek TR, Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: At the interface between tolerance and immunity. *Immunity.* 2010; 33(2): 153-165. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.004
25. Kuerten S, Batoulis H, Recks MS, Karacsony E, Zhang W, Subbramanian RA, et al. Resting of cryopreserved PBMC does not generally benefit the performance of antigen-specific T cell ELISPOT assays. *Cells.* 2012; 1(3): 409-427. doi: 10.3390/cells1030409
26. Smith JG, Joseph HR, Green T, Field JA, Wooters M, Kaufhold RM, et al. Establishing acceptance criteria for cell-mediated-immunity assays using frozen peripheral blood mononuclear cells stored under optimal and suboptimal conditions. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14(5): 527-537. doi: 10.1128/0014-8177.14.5.527
27. Lenders K, Ogunjimi B, Beutels P, Hens N, Van Damme P, Berneman ZN, et al. The effect of apoptotic cells on virus-specific immune responses detected using IFN-gamma ELISPOT. *J Immunol Methods.* 2010; 357(1-2): 51-54. doi: 10.1016/j.jim.2010.03.00128
28. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells *in vivo*. *Blood.* 2006; 108(5): 1571-1579. doi: 10.1182/blood-2006-02-004747
29. Oh S, Berzofsky JA, Burke DS, Waldmann TA, Perera LP. Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(6): 3392-3397. doi: 10.1073/pnas.0630592100

Сведения об авторах

Сайдакова Евгения Владимировна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН; профессор биологического факультета, ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», e-mail: radimira@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4342-5362>

Королевская Лариса Борисовна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, e-mail: bioqueen@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9840-7578>

Пономарева Валерия Николаевна – студент биологического факультета, ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», e-mail: ponomarevav@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0000-9863-8907>

Власова Виолетта Викторовна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, e-mail: violetbaudelaire73@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1656-7277>

Information about the authors

Evgeniya V. Saidakova – Dr. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS – Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; Professor at the Biological Faculty, Perm State University, e-mail: radimira@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4342-5362>

Larisa B. Korolevskaya – Cand. Sc. (Med.), Research Officer at the Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS – Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, e-mail: bioqueen@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9840-7578>

Valeria N. Ponomareva – Student, Perm State University, e-mail: ponomarevav@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0000-9863-8907>

Violetta V. Vlasova – Junior Research Officer at the Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS – Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, e-mail: violetbaudelaire73@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1656-7277>