

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-316

**ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДО И ПОСЛЕ МАГНИТНОЙ СЕПАРАЦИИ****FEATURES OF THE METABOLIC PROFILE OF PERIPHERAL BLOOD T-LYMPHOCYTES
BEFORE AND AFTER MAGNETIC SEPARATION**

Я. К. Грищук

Самарский государственный медицинский университет

I. K. Grishchuk

Samara State Medical University

✉ grischukyaroslav@ya.ru

Аннотация

Проведена сравнительная оценка метаболического профиля Т-лимфоцитов и исходной суспензии моноклеарных клеток периферической крови доноров путем измерения скорости потребления кислорода под воздействием энергетических субстратов *in vitro*. Полученные данные подтвердили воспроизводимость метода, а также отсутствие необходимости дополнительной сепарации Т-лимфоцитов из суспензии моноклеаров периферической крови.

Abstract

A comparative assessment of the metabolic profile of T-lymphocytes and the initial suspension of mononuclear cells from the peripheral donors' blood was carried out by measuring the rate of oxygen consumption under the influence of energy substrates *in vitro*. The data obtained confirmed the reproducibility of the method, as well as the absence of the need for additional separation of T-lymphocytes from the suspension of mononuclear cells from the peripheral blood.

Иммунная терапия — один из самых перспективных подходов к лечению онкологических и аутоиммунных заболеваний. В настоящее время идет интенсивный поиск новых иммунокорректоров и способов усиления специфических свойств иммунокомпетентных клеток, в первую очередь Т-лимфоцитов, для первичного скрининга которых необходимы простые и эффективные методы оценки реакции на воздействия *in vitro*. Одним из таких методов оценки процессов энергетического метаболизма лимфоцитов *in vitro* является измерение потребления кислорода клетками при внесении различных энергетических субстратов в присутствии и в отсутствие лекарственных препаратов [1, 2].

Целью исследования явилась сравнительная оценка метаболического профиля (изменение потребления кислорода под воздействием энергетических субстратов *in vitro*) Т-лимфоцитов, выделенных с помощью магнитной сепарации и суспензии моноклеарных клеток периферической крови.

Лимфоциты (моноклеарные клетки) выделяли из цельной крови десяти здоровых доноров, взятой в вакуумные пробирки с К₃ЭДТА, путем центрифугирования в градиенте фикола плотностью 1,079 г/см³ (ООО «Биолот», Россия). Т-лимфоциты из суспензии моноклеарных клеток выделяли методом негативной сепарации с помощью набора Pan T Cell Isolation Kit human (Miltenyi Biotec, США). Содержание популяций лимфоцитов до и после сепарации оценивали методом проточной цитофлуориметрии с помощью моноклональных антител CD45-FITC/CD16-PE+CD56-PE/CD3-ECD/CD19-PC5 на цитометре Navios (Beckman Coulter, США). Клетки фиксировали в области рабочей зоны кислородного электрода Кларка, который помещали в кювету с рабочим раствором, поочередно добавляя растворы субстратов: D-глюкозы, сахарозы, мальтозы, лактозы, раффинозы, глицерина, пирувата натрия, цитрата натрия, глицерофосфата натрия, тартрата натрия, ацетата натрия, глицина, L-лизина гидрохлорида, L-аргинина гидрохлорида и L-орнитина гидрохлорида. Регистрацию и обработку сигналов осуществляли с использованием программного обеспечения Эксперт-00х (ООО «Эконикс-Эксперт», Россия).

В качестве измеряемого параметра сигнала и условного показателя метаболической активности лимфоцитов использовали максимальную скорость изменения концентрации растворенного кислорода после внесения субстрата (мг О₂/л с). Для удобства сравнения данных и нивелирования погрешностей, вызванных возможными различиями в количестве клеток и их метаболической активности у разных доноров, сигналы на субстраты в составе профиля приводили в процентах от сигнала на глицерофосфат натрия [3].

Анализ полученных данных показал, что при негативной магнитной сепарации Т-лимфоцитов чистота выделения клеток из суспензии моноклеаров составляла 92–97 % при исходном относительном содержании

63–74 %. При этом метаболический профиль клеток из суспензии мононуклеаров и обогащенной суспензии Т-лимфоцитов был сопоставим и характеризовался максимально выраженным положительным ответом в виде активного потребления кислорода на глицерофосфат натрия, усиленным потреблением кислорода в ответ на добавление лактозы и раффинозы, слабой реакцией на мальтозу и глицин, сильным подавлением кислородного метаболизма в ответ на добавление к среде цитрата натрия (см. таблицу).

Полученные данные подтверждают хорошую воспроизводимость метода измерения поглощения кислорода с помощью электрода Кларка при добавлении различных энергетических субстратов к лимфоцитам *in vitro*, а также об отсутствии необходимости специальной сепарации Т-лимфоцитов, поскольку основной вклад в потребление кислорода в суспензии мононуклеаров вносят преобладающие там Т-клетки.

Популяционный состав и особенности метаболического профиля сепарированных Т-лимфоцитов и мононуклеарных клеток периферической крови

Показатель	Суспензия мононуклеарных клеток, $n = 10$	Сепарированные Т-клетки, $n = 10$	Уровень статистической значимости отличий
Популяции лимфоцитов, %			
CD3+ (Т-лимфоциты)	$68,5 \pm 5,76$	$94,4 \pm 2,7$	$p < 0,001$
CD3-CD16+CD56+ (натуральные киллеры)	$18,0 \pm 2,1$	$3,5 \pm 0,2$	$p < 0,0001$
CD19+ (В-лимфоциты)	$11,5 \pm 1,9$	$2,3 \pm 0,3$	$p < 0,0001$
Максимальная скорость изменения концентрации растворенного кислорода после внесения субстрата относительно реакции на глицерофосфат натрия, принятой за 100 %			
Д-глюкоза	$2,0 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,3$	$p > 0,05$
Сахароза	$11,5 \pm 1,2$	$13,1 \pm 1,4$	$p > 0,05$
Мальтоза	$2,8 \pm 1,3$	$2,5 \pm 0,4$	$p > 0,05$
Лактоза	$33,4 \pm 2,3$	$29,1 \pm 3,0$	$p > 0,05$
Раффиноза	$43,7 \pm 4,1$	$49,5 \pm 5,3$	$p > 0,05$
Глицин	$2,0 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	$p > 0,05$
Пируват натрия	$10,2 \pm 1,3$	$12,5 \pm 1,1$	$p > 0,05$
Цитрат натрия	$-24,6 \pm 2,3$	$-29,6 \pm 3,8$	$p > 0,05$

Литература

1. Ильясов П. В., Гусева О. С., Курицына А. П., Лимарева Л. В. Оценка физиолого-биохимических характеристик клеток на основе регистрации их респираторной активности при воздействии субстратов и токсических веществ // Гены и клетки. 2022. Т. 17, № 4. С. 115–124.
2. Russo Eleonora et al. Energy Metabolism Analysis of Three Different Mesenchymal Stem Cell Populations of Umbilical Cord Under Normal and Pathologic Conditions // Stem cell reviews and reports. 2020. Vol. 16, No. 3. P. 585–595.
3. Ильясов П. В., Лимарева Л. В., Сизова А. И. и др. Оценка токсического действия 2-(хлординитрометил)-4-метокси-6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1,3,5-триазина по дыхательной активности лимфоцитов // Биологические мембраны. 2023. Т. 40, № 5. С. 342–350.