

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 мононуклеарных 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 мононуклеаров 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 мононуклеарных клеток периферической крови.

Лимфоциты (мононуклеарные клетки) выделяли из цельной крови десяти здоровых доноров, взятой в вакуумные пробирки с К<sub>3</sub>ЭДТА, путем центрифугирования в градиенте фиколла плотностью 1,079 г/см<sup>3</sup> (ООО «Биолот», Россия). Т-лимфоциты из суспензии мононуклеарных 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 цитофлюориметрии 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, тарtrата натрия, ацетата натрия, глицина, L-лизина гидрохлорида, L-аргинина гидрохлорида и L-орнитина гидрохлорида. Регистрацию и обработку сигналов осуществляли с использованием программного обеспечения Эксперт-00x (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 О<sub>2</sub>/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 мононуклеаров 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 ± 5,76	94,4 ± 2,7	p < 0,001
CD3-CD16+CD56+ (натуральные киллеры)	18,0 ± 2,1	3,5 ± 0,2	p < 0,0001
CD19+ (В-лимфоциты)	11,5 ± 1,9	2,3 ± 0,3	p < 0,0001
Максимальная скорость изменения концентрации растворенного кислорода после внесения субстрата относительно реакции на глицерофосфат натрия, принятой за 100 %			
D-глюкоза	2,0 ± 0,3	2,5 ± 0,3	p > 0,05
Сахароза	11,5 ± 1,2	13,1 ± 1,4	p > 0,05
Мальтоза	2,8 ± 1,3	2,5 ± 0,4	p > 0,05
Лактоза	33,4 ± 2,3	29,1 ± 3,0	p > 0,05
Раффиноза	43,7 ± 4,1	49,5 ± 5,3	p > 0,05
Глицин	2,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1	p > 0,05
Пируват натрия	10,2 ± 1,3	12,5 ± 1,1	p > 0,05
Цитрат натрия	-24,6 ± 2,3	-29,6 ± 3,8	p > 0,05

#### **Литература**

- 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.
- 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.
- 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 мембранны. 2023. Т. 40, № 5. С. 342–350.