

Определение метаболического фенотипа и функции клеток с помощью тестов на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent XF

Авторы

George W. Rogers (Джордж В. Роджерс)
Agilent Technologies,
La Jolla, CA

Lisa P. Winer (Лиза П. Вайнер)
Agilent Technologies,
Lexington, MA

Ryan McGarrigle (Райан МакГарригл)
Agilent Technologies,
Cork, Ireland

Alice Gao (Элис Гао)
Agilent Technologies
Lexington, MA

James Hynes (Джеймс Хайнс)
Agilent Technologies,
Cork, Ireland

Аннотация

Технология Agilent Seahorse XF позволяет в реальном времени измерять метаболизм живой клеточной культуры, давая тем самым крайне важную функциональную информацию, напрямую связанную с состоянием и выживаемостью клеток. Тест на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent Seahorse XF позволяет получить важные показатели, способствующие исследованиям отдельных митохондриальных матриц, важных или необходимых для определения фенотипа и функции клетки. В данном исследовании рассматривается стратегия применения данного теста, примеры получаемых с его помощью данных, способы, позволяющие наиболее эффективным способом применить его в исследовании метаболизма опухолевых и иммунных клеток, и то, как это может помочь в процессе разработки новых лекарственных препаратов.

Введение

В настоящее время метаболизм признается одним из самых значительных факторов многих важных функций клетки — как нормальной, так и переродившейся^{1,2}. Возможность определить требования к матрице в контролируемом эксперименте может пригодиться в самых разных областях исследований, в том числе при поиске и валидации новых мишеней для лекарственных препаратов, применяемых для терапии онкологических и нейродегенеративных заболеваний, расстройств иммунной и сердечно-сосудистой систем и дефицита стволовых клеток^{3,4,5}.

Технология Agilent Seahorse XF — это комбинированная платформа, не требующая использования меток, которая объединяет в себе анализаторы Agilent XF, патроны датчиков, наборы реагентов и ПО и позволяет получать функциональные данные о клеточном метаболизме путем кинетических измерений в реальном времени. На основе этой платформы компания Agilent предлагает широкий ассортимент наборов тестов Agilent XF, которые позволяют получить полный спектр информации: от общей оценки клеточной функции до специфичных деталей метаболических механизмов, кратко представленных на рис. S1.

В рамках этой платформы компанией Agilent был разработан ряд оптимизированных тестов для измерения скорости окисления клеточной матрицы: тесты на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent XF. Эти тесты позволяют исследовать три основных типа матриц, которые влияют на митохондриальную активность: длинноцепочечные жирные кислоты, глюкозу/пируват и глутамин (рис. 1). Применение специфичных антиокислителей отдельных метаболических путей окисления матрицы позволяет выполнить с помощью теста на митохондриальное дыхание в условиях стресса Agilent XF всестороннюю оценку функции митохондрий и исследовать клеточную культуру не только в условиях минимальной (т. е. базальную скорость дыхания), но и в условиях повышенной скорости потребления матрицы (т. е. максимальную скорость потребления матрицы), в которых зачастую выявляются важные детали зависимости клеточного метаболизма от матрицы (рис. 2). Эти тесты помогают упростить исследования специфичных процессов окисления матриц и центральной роли, которую эти процессы играют в базовых функциях активации, пролиферации и дифференцировки клеток. Кроме того, эти тесты можно использовать для характеристики того, как генная инженерия, фармакологические вмешательства и специфичные, связанные с определенными заболеваниями условия микроокружения влияют на скорость окисления каждой матрицы.

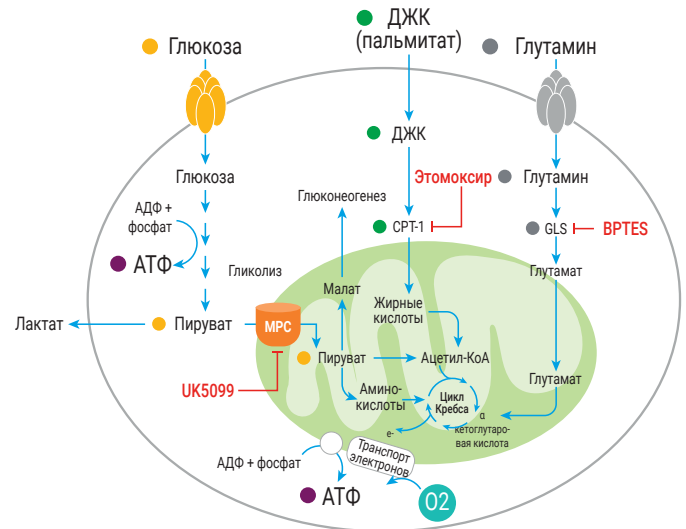


Рис. 1. Основные метаболические пути, в том числе гликолиз, цикл Кребса, транспорт электронов и окислительное фосфорилирование. Выделены реакции окисления глюкозы/пирувата, глутамина и длинноцепочечных жирных кислот (ДЖК). Красные линии и текст показывают соответствующие антиокислители метаболизма глюкозы/пирувата, длинноцепочечных жирных кислот и глутамина, что в свою очередь специфично ограничивает окисление соответствующей матрицы.

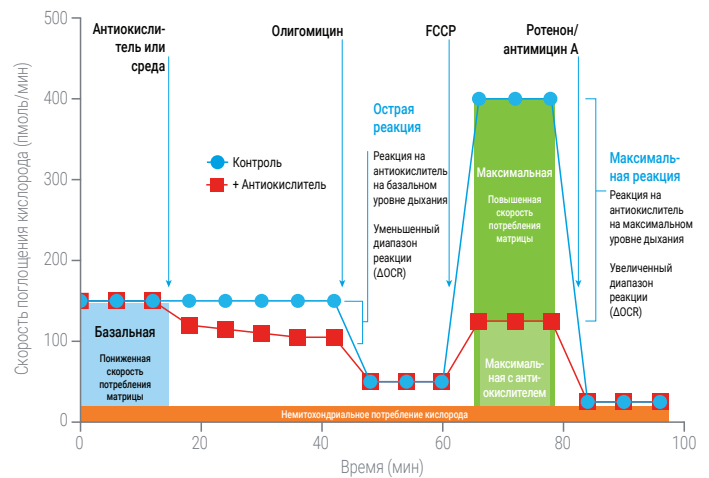


Рис. 2. Профиль теста на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent Seahorse XF, показывающий параметры клеточного дыхания, от которых зависит скорость потребления матрицы. Последовательное введение реагентов позволяет измерить базальную скорость дыхания, острую реакцию на антиокислитель (этомоксир, UK5099 или BPTES), а также максимальную скорость дыхания в присутствии и в отсутствии антиокислителя. Обратите внимание: несмотря на то, что в базальных условиях фиксируются незначительные изменения, т. е. острая реакция, при быстром потреблении матрицы, например под действием FCCP, реакция зачастую намного более выражена и лучше отражает различия в способности клеток окислять соответствующий тип матрицы.

Экспериментальная часть

Все клеточные линии хранились в соответствии с рекомендациями производителя. Для проведения тестов клеточная культура линии A549 высевалась на культивационные микропланшеты Agilent XF96 в количестве $1,5 \times 10^4$ клеток на лунку на матрицу DMEM F12 (Corning 10-090-CV) с добавкой 2 ммоль/л препарата GlutaMax и 10% сыворотки. Клеточная культура линии C2C12 высевалась на культивационные микропланшеты Agilent XF96 в количестве $1,2 \times 10^4$ клеток на лунку на матрицу DMEM с повышенным содержанием глюкозы (Gibco 11960) с добавкой 4 ммоль/л глутамин, 1 ммоль/л пирувата и 10% сыворотки. Клеточная культура линии HepG2 высевалась на культивационные микропланшеты Agilent XF96 в количестве $2,0 \times 10^4$ клеток на лунку и культивировалась на матрице DMEM с пониженным содержанием глюкозы (Gibco 11885) с добавкой 2 ммоль/л препарата GlutaMax и 10% сыворотки. Все культуры инкубировались в течение ночи при температуре 37 °C в атмосфере с 5% CO₂. На следующий день культуры промывались два раза питательной средой для проведения теста на окисление матрицы (Agilent XF DMEM, pH 7,4, с добавкой 10 ммоль/л глюкозы Agilent XF Glucose, 1 ммоль/л пирувата Agilent XF Pyruvate и 2 ммоль/л глутамин Agilent XF Glutamine) и затем инкубировались при 37 °C в атмосфере, не содержащей CO₂, в течение 60 мин. Затем планшеты с культурой переносились в анализаторы Agilent XFe96 для проведения тестов с использованием либо этанооксира (4 ммоль/л), либо UK5099 (2 ммоль/л), либо BPTES (бис-2-(5-фенилацетамидо-1,3,4-тиадиазол-2-ил)этилсульфид, 3 ммоль/л), вводимого через порт A, за которым последовательно вводились олигомицин (1,5 ммоль/л), FCCP (карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразон, 1,5 ммоль/л для всех трех клеточных линий) и смесь ротенона с антимицином А (по 0,5 ммоль/л каждого) (все концентрации выражены в виде финальных после смешивания). После этого для нормировки клетки подсчитывались с помощью прибора Cytation 5.

Все тесты выполнялись в соответствии с инструкциями в руководстве пользователя теста на скорость окисления матрицы Agilent XF, в том числе в части разведения соединений и подготовки патронов датчиков.

Параметры базальной и максимальной скорости дыхания, а также острой реакции рассчитывались по результатам тестов на окисление матрицы в условиях стресса с помощью программы Agilent Seahorse Analytics. Все эти параметры данная программа позволяет вычислять без дополнительной настройки. Падение базальной и максимальной скорости потребления кислорода (OCR) после добавления антиокислителя (рис. 7) для каждой клеточной линии рассчитывалось и наносилось на график с помощью Microsoft Excel по следующим уравнениям:

- **OCR в % от базальной после добавления антиокислителя** = $[(\text{Базальная OCR} + \text{OCR острой реакции}) / \text{Базальная OCR}] \times 100\%$.
- **OCR в % от максимальной в присутствии антиокислителя** = $[(\text{Максимальная OCR контрольного эксперимента} - \text{Максимальная OCR в присутствии антиокислителя}) / \text{Максимальная OCR контрольного эксперимента}] \times 100\%$.

Материалы

Материал	Производитель
Клеточная линия A549	ATCC
Клеточная линия C2C12	ATCC
Клеточная линия HepG2	ATCC
Среда DMEM/F12	Corning
Среда DMEM с повышенным содержанием глюкозы	Gibco
Среда DMEM с пониженным содержанием глюкозы	Gibco
GlutaMax	Gibco
Сыворотка	Hyclone
Культивационные микропланшеты Agilent XF96	Agilent
Патроны датчиков Agilent XFe96	Agilent
Калибровочный стандарт Agilent XF	Agilent
Питательная среда Agilent XF DMEM pH 7,4	Agilent
Глюкоза Agilent XF Glucose	Agilent
Пируват Agilent XF Pyruvate	Agilent
Глутамин Agilent XF Glutamine	Agilent
Набор тестов на скорость окисления длинноцепочечных жирных кислот в условиях стресса Agilent XF	Agilent
Набор тестов на скорость окисления глюкозы/пирувата в условиях стресса Agilent XF	Agilent
Набор тестов на скорость окисления глутамин в условиях стресса Agilent XF	Agilent
Анализатор Seahorse XFe96	Agilent
Сканер Cytation 5	BioTek, подразделение компании Agilent

Тест на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent XF: экспериментальная стратегия и порядок проведения теста

Тест на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent XF объединяет в себе тест на митохондриальное дыхание в условиях стресса Agilent XF (MST) со следующими специфичными антиокислителями отдельных метаболических путей окисления матрицы (рис. 1):

- Этомоксир для ингибирования окисления длинноцепочечных жирных кислот путем ингибирования активности пальмитоилтрансферазы 1а (CPT1a)⁶.
- UK5099 для ингибирования окисления глюкозы и пирувата путем ингибирования митохондриального переносчика пирувата (MPC)⁷.
- BPTES для ингибирования окисления глутамин путем ингибирования активности глутаминазы 1 (GLS-1)⁸. Обратите внимание, что BPTES не ингибирует глутаминазу 2 (GLS2).

В сочетании с этими антиокислителями MST, мощный общепринятый инструмент для исследования функции митохондрий, позволяет исследовать зависимость жизнедеятельности клетки от различных метаболических матриц. Базальная и максимальная скорость дыхания — это основные параметры функции митохондрий, измеряемые тестом MST. В контексте окисления матрицы на базальную и, в частности, на максимальную скорость дыхания сильно влияет способность клетки транспортировать и окислять доступные матрицы⁹. Этот метод идеально подходит для оценки скорости потребления клеточной

матрицы в базальных условиях и в условиях повышенного потребления матрицы (максимальная скорость дыхания). На рис. 2 в общих чертах представлен кинетический профиль стандартного теста на скорость окисления матрицы и значимые для него параметры.

Для проведения теста на скорость окисления матрицы в условиях стресса сначала устанавливается базальная скорость дыхания, после чего в питательную среду вносится антиокислитель соответствующего метаболического пути. Острая реакция на внесение этого антиокислителя регистрируется на протяжении нескольких циклов измерения (как правило, шести), после чего в тест вносятся в стандартной последовательности олигомицин, FCCP и смесь ротенона и антимицина А.

Такие измерения несут большое количество информации, так как описанный порядок проведения эксперимента позволяет получить данные как о базальной скорости дыхания и о влиянии на нее ингибирования определенного метаболического пути, так и о влиянии этого ингибирования на максимальную скорость дыхания, что отражает чувствительность клетки к блокировке специфичного метаболического пути в условиях высокой скорости потребления матрицы.

Каждый тест фокусируется на исследовании одной из матриц с помощью оптимизированной конечной концентрации соответствующего антиокислителя:

- Этомоксир в концентрации 4 ммоль/л ингибирует окисление длинноцепочечных жирных кислот.
- UK5099 в концентрации 2 ммоль/л ингибирует окисление глюкозы и пирувата.
- BPTES в концентрации 3 ммоль/л ингибирует окисление глутамина.

Стандартные тесты на скорость окисления матрицы в условиях стресса предназначены для проведения в условиях насыщения питательной среды теста матрицами — глюкозой (10 ммоль/л), пируватом (1 ммоль/л) и глутамином (2 ммоль/л).

Длинноцепочечные жирные кислоты в тесте берутся из внутриклеточных запасов, и их концентрация, таким образом, зависит от типа клетки. На рис. 3 приведены стандартные методы и условия проведения каждого из тестов на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent XF. Обратите внимание, что, за исключением используемого антиокислителя, все методики абсолютно одинаковы.

Реакция на введение антиокислителя (рис. 2) позволяет предположить, что в данных условиях проведения эксперимента клетка потребляет определенный тип матрицы. Подробнее этот вопрос разбирается в разделе обсуждения ниже, однако, как правило, стандартные тесты на скорость окисления матрицы предназначены для получения ответов на следующие вопросы:

- Нужен ли клетке для жизнедеятельности определенный тип матрицы?
- Насколько сильно клетка зависит от наличия определенного типа матрицы и могут ли другие матрицы удовлетворить ее энергетические потребности?
- Как внешние вмешательства, такие как генная инженерия или применение лекарственных препаратов, влияют на скорость и тип потребляемых митохондриальных матриц?

Как и большинство тестов Agilent XF, тесты на скорость окисления матрицы в условиях стресса, как правило, проводятся после предварительной обработки или вмешательства — в зависимости от плана эксперимента. Это вмешательство может быть как долговременным (например, генная инженерия или долговременное применение лекарственных препаратов), совершенным за несколько часов или даже дней до выполнения теста Agilent XF, так и кратковременным (например, применение лекарственных препаратов), совершенным непосредственно перед выполнением теста (рис. 3). В некоторых случаях долговременное и кратковременное вмешательство могут применяться совместно, например при исследовании



Рис. 3. Использование тестов на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent Seahorse XF для исследования потребности в митохондриальных матрицах или их скорости потребления. Каждый тест позволяет исследовать одну из матриц с помощью соответствующего антиокислителя, этомоксира для ингибирования окисления длинноцепочечных жирных кислот, UK5099 для ингибирования окисления глюкозы или пирувата и BPTES для ингибирования окисления глутамина. Долгосрочные или краткосрочные вмешательства (генная инженерия или воздействие лекарственных препаратов), проведенные до выполнения теста, позволяют оценить эффекты этих вмешательств на скорость окисления определенных митохондриальных матриц. Больше информации см. в тексте статьи.

комплексных методов терапии генных заболеваний. Каждый тестовый набор может использоваться как по отдельности (т. е. для одной определенной матрицы) для изучения того, как серия вмешательств или соединений может влиять на окисление данной конкретной матрицы, так и в сочетании с другими тестами (т. е. для двух или более матриц) для изучения общих эффектов данного вмешательства на окисление матрицы и функцию митохондрий. Руководство пользователя тестов на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent XF предлагает несколько вариантов размещения образцов на планшете, основанных на различных сценариях эксперимента. На рис. 4 представлен простой вариант размещения, который применялся для получения данных, представленных в данной работе.



Рис. 4. Вариант размещения на планшете Agilent XFe96 для исследования скорости окисления матрицы с помощью нескольких тестов или антиокислителей. Размещение на планшете различных групп клеток, в том числе контрольной, для исследования клеток одного типа с помощью трех антиокислителей (питательная среда для проведения теста подается через порт А). Данный вариант размещения был повторен три раза, каждый раз с новым типом клеток (A549, C2C12 или HepG2). Все остальные параметры эксперимента и команды прибора Agilent XF для всех тестов были одинаковыми.

Обратите внимание, что компания Agilent предлагает также отдельный дополнительный протокол и специальный набор реагентов для исследования окисления длинноцепочечных жирных кислот. В этот набор входят дополнительные компоненты, в том числе матрица пальмитата-BCA Agilent XF Palmitate-BSA. Порядок проведения данного теста полностью описан в руководстве пользователя тестов на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent XF.

Результаты и их обсуждение

Применение тестов на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent XF

Три стандартные клеточные линии исследовались с помощью тестовых наборов для исследования окисления каждой из трех матриц (глюкоза/пируват, длинноцепочечные жирные кислоты и глутамин) с использованием стандартных протоколов выполнения тестов и описанных ранее вариантов размещения образцов на планшете (рис. 2–4). Подробная информация о клеточных культурах, их посевах и подготовке к выполнению тестов Agilent XF приведена в экспериментальной части данной работы и в руководстве пользователя тестов на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent XF.

На рис. 5A, 5B и 5C показаны кинетические кривые для клеточных культур линий A549, C2C12 и HepG2 соответственно. На рис. 6 приведены параметры базальной скорости дыхания, острой реакции и максимальной скорости дыхания, полученные в тесте для клеток линии HepG2.

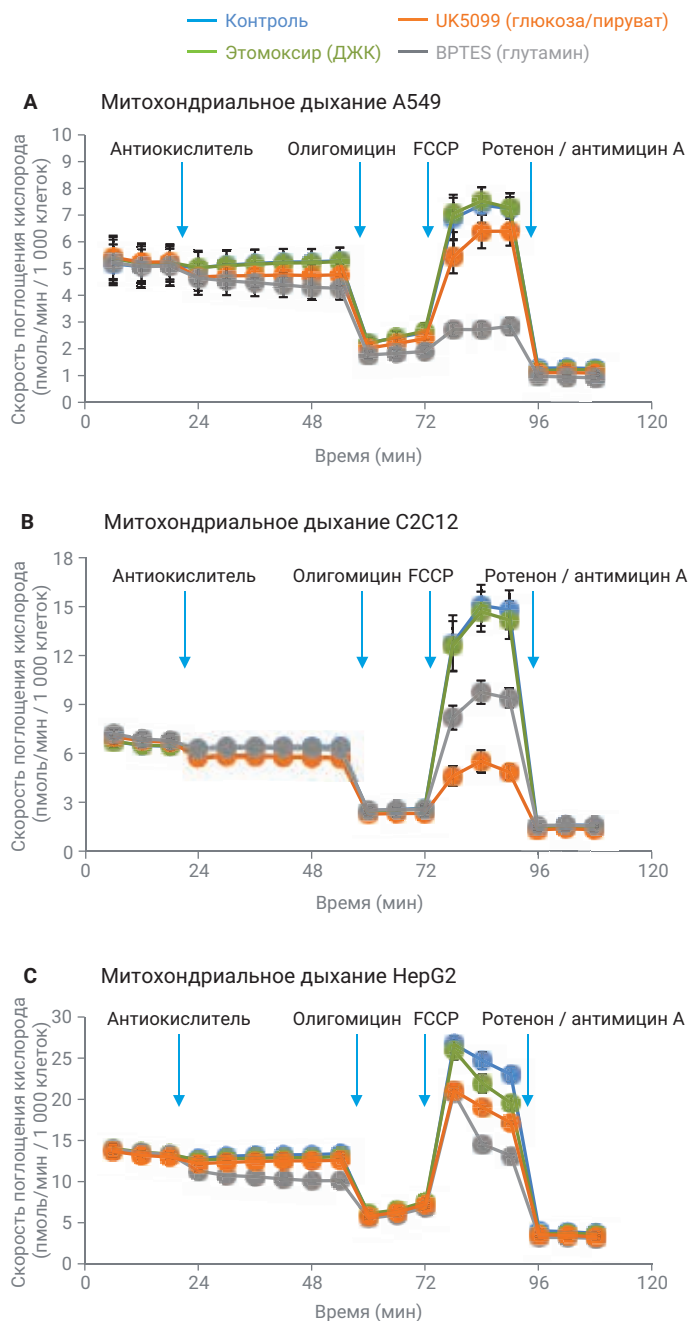


Рис. 5. Сравнение скорости окисления матрицы клетками A549, C2C12 и HepG2 с помощью тестов на скорость окисления глюкозы/пирувата, длинноцепочечных жирных кислот (ДЖК) и глутамин в условиях стресса. Клетки линий A549 (А), C2C12 (В) и HepG2 (С) высевались на культивационные микропланшеты Agilent XF96 и культивировались в течение ночи. Затем на них проводились тесты на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent XF с введением питательной среды для проведения теста (контроль), этомоксира (окисление длинноцепочечных жирных кислот), UK5099 (окисление глюкозы/пирувата) или BPTES (окисление глутамин), за которыми вводились последовательно олигомицин, FCCP и смесь ротенон и антимицина А. Питательная среда для проведения теста – XF DMEM, pH 7,4 + 10 ммоль/л глюкозы, 1 ммоль/л пирувата и 2 ммоль/л глутамин. Каждый тип клеток исследовался три раза на протяжении трех отдельных дней (т. е. n = 3), а полученные данные обрабатывались в программе Agilent Seahorse Analytics. Погрешность выражалась в виде ± стандартной погрешности среднего.

Базальная скорость дыхания для всех типов клеток показывает ожидаемые результаты. Все данные до добавления антиокислителей указывают на идентичные базальные скорости поглощения кислорода. После введения антиокислителей клетки каждого типа демонстрируют заметную, хотя и сравнительно небольшую острую реакцию по сравнению со скоростью дыхания в базальных условиях теста. Однако в условиях максимальной скорости дыхания (т. е. в условиях, когда митохондрии демонстрируют повышенную потребность в матрице) реакция на антиокислители значительно усиливается и делается очевидным отличие реакций на различные антиокислители всех трех исследуемых типов клеток.

Например, клетки линии A549 (рис. 5A) демонстрируют сильную реакцию на BPTES, слабую реакцию на UK5099 и практически полное отсутствие реакции на этомоксир. Это позволяет заключить, что клетки A549 в условиях высокой скорости потребления матрицы для получения энергии полагаются в основном на окисление глутамина. В отличие от них клетки линии C2C12 демонстрируют сильную реакцию на UK5099 и BPTES (рис. 5B). Это указывает на то, что клеткам этого типа в условиях высокой скорости потребления матрицы нужны обе эти матрицы. Клетки же линии HepG2 в условиях максимальной скорости дыхания демонстрируют более сбалансированную зависимость от глюкозы/пирувата, длинноцепочечных жирных кислот и глутамина (рис. 5C), на что указывает значительная реакция на все три антиокислителя — UK5099, этомоксир и BPTES соответственно. На рис. 7 приведены сводные данные о снижении базальной и максимальной скоростей потребления кислорода в присутствии антиокислителя для всех трех клеточных линий. Обратите внимание, что изменения в максимальной скорости дыхания показали себя наиболее информативным параметром для оценки требований к митохондриальной матрице благодаря повышенному потреблению матрицы в этих условиях.

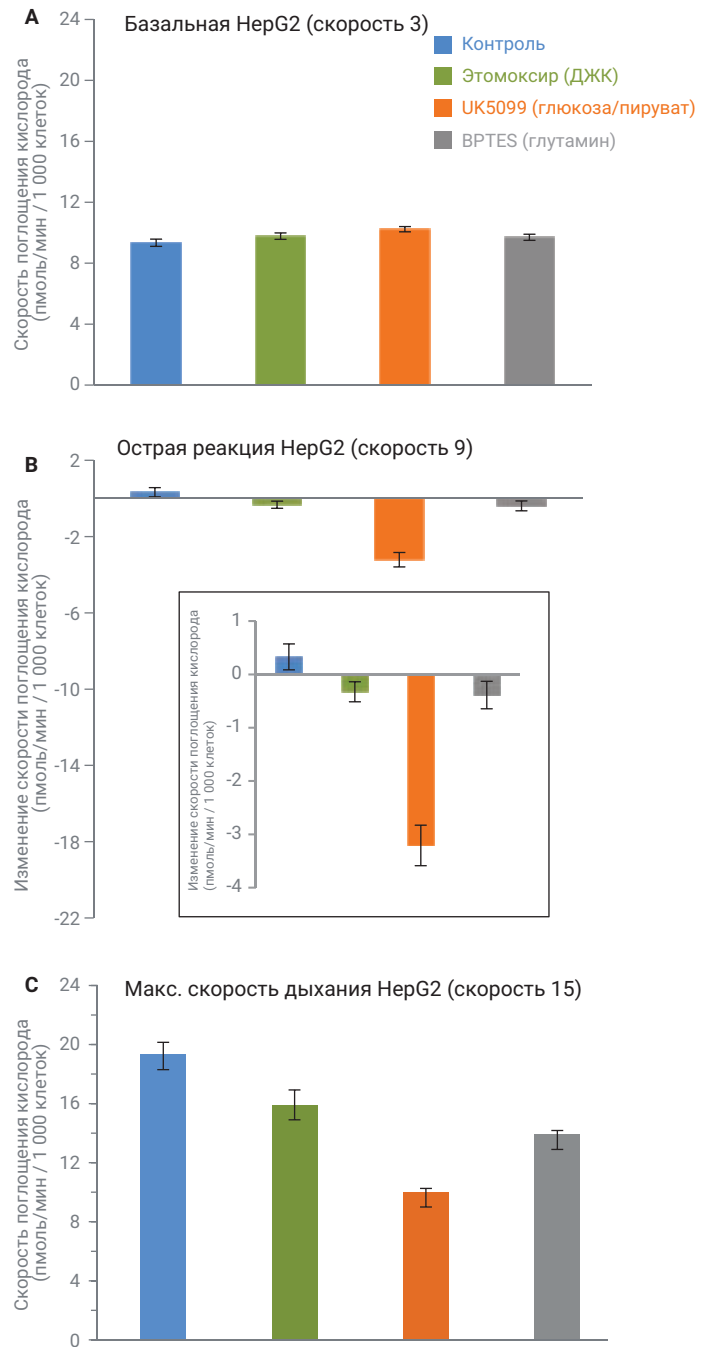
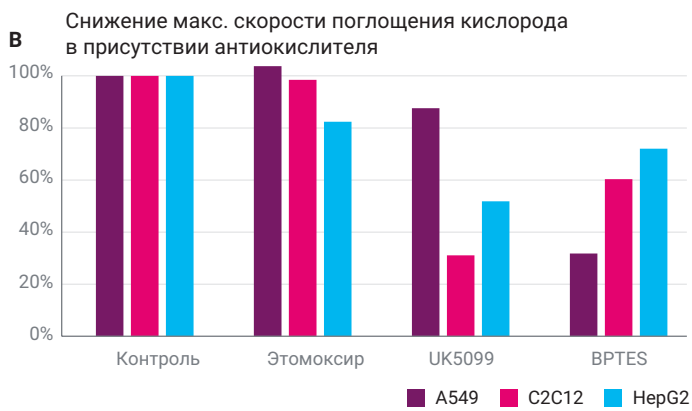
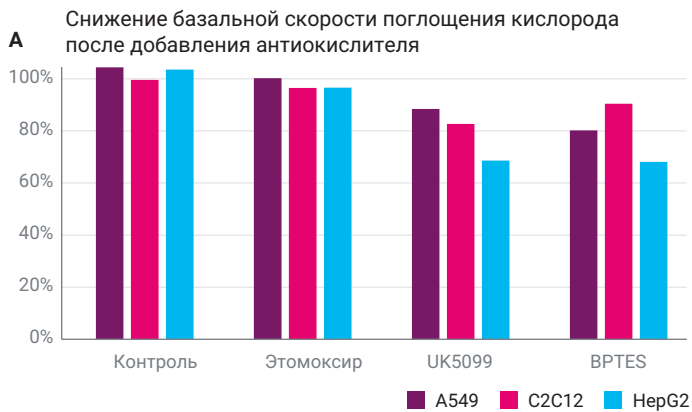


Рис. 6. Пример параметров базальной скорости дыхания, острой реакции и максимальной скорости дыхания, полученные в тесте для клеток линии HepG2. (А) Базальная скорость дыхания. (В) Острая реакция. Обратите внимание, что эта величина выражается в виде изменения (Δ) в скорости потребления кислорода относительно базальной скорости. (С). Максимальная скорость дыхания в присутствии отдельных антиокислителей. Графики и значения получены с помощью программы Agilent Seahorse Analytics из кинетических кривых, показанных на рис. 5. Те же самые параметры рассчитывались для клеток линий A549 и C2C12 (данные не приводятся).



С

% базальной OCR	ДЖК (этомоксир)	Глюкоза/пируват (UK5099)	Глутамин (BPTES)
A549	100%	88%	80%
C2C12	96%	83%	90%
HepG2	97%	69%	68%

Д

% макс. OCR	ДЖК (этомоксир)	Глюкоза/пируват (UK5099)	Глутамин (BPTES)
A549	104%	88%	32%
C2C12	97%	31%	60%
HepG2	82%	52%	72%

Рис. 7. Сравнительная скорость окисления среды для клеток линий A549, C2C12 и HepG2. (А) Снижение базальной скорости потребления кислорода (OCR) после добавления антиокислителя и (В) снижение максимальной скорости потребления кислорода в присутствии антиокислителя. Данные с рис. 5 отдельно для каждого антиокислителя. В таблицах С и D собраны данные с рисунков 7А и 7В соответственно. Уравнения для расчета снижения скорости окисления см. в экспериментальной части. Обратите внимание, что чувствительность к антиокислителям в условиях максимальной скорости дыхания (повышенная скорость потребления матрицы) значительно выше, чем в условиях базального дыхания, а также на то, как сильно отличается реакция на антиокислители для различных типов клеток.

Актуальность информации о скорости окисления матрицы для исследований в области метаболизма опухолевых и иммунных клеток и разработки новых лекарственных препаратов и рекомендуемые области применения

Понимание того, от каких матриц зависит жизнедеятельность клетки, крайне важно для разработки новых способов лечения широкого спектра заболеваний. Это очевидно, так как изучение генов, белков и метаболических путей, связанных с метаболизмом, — это многообещающий путь в разработке новых терапевтических мишеней для широкого диапазона различных заболеваний (рис. 8). Новые свидетельства демонстрируют, что и сами метаболиты, в том числе окисление различных митохондриальных матриц, могут управлять функцией и фенотипом клетки и влиять на ее пролиферацию, дифференцировку и функциональные нарушения⁵.

Пролиферация опухолевых клеток сильно зависит от доступности матрицы. Матрицы не только управляют перерождением и пролиферацией опухолевых клеток. Доступность определенных матриц — это важнейшая характеристика микроокружения опухоли, которая влияет, среди прочего, на эффективность химиотерапии¹⁰. Кроме того, понимание требований опухолевых клеток к матрице является очень важным аспектом в разработке новых противоопухолевых препаратов. Терапевтические мишени

для лечения онкологических заболеваний включают в себя несколько метаболических путей, в том числе гликолиз, цикл Кребса, транспорт электронов и окислительное фосфорилирование, а также окисление пирувата, глутамина и жирных кислот (рис. 1). Например, хотя было показано, что в опухоли легких у мышей p53 KrasG12D скорость окисления глутамина минимальна¹¹, множество исследований *in vitro* указывают на значительную роль окисления глутамина, в том числе в клетках протоковой аденокарциномы поджелудочной железы. Это свидетельствует о том, что в этих клетках дыхание участвует в анаболических процессах и стимулирует биосинтез аспартата в пролиферирующих опухолевых клетках¹².

Также исследования продемонстрировали, что усиленное поглощение пальмитата и окисление жирных кислот — это один из доминирующих биоэнергетических метаболических путей в опухолевых клетках простаты, обеспечивающий им альтернативный способ удовлетворения своих биоэнергетических потребностей. Кроме того, новые исследования показывают, что опухолевые клетки поджелудочной железы в условиях дефицита питательных веществ особенно сильно зависят от митохондриального окислительного фосфорилирования и что митохондриальный метаболизм представляет собой значительную метаболическую уязвимость¹².



Рис. 8. Пример того, как митохондриальное окисление матрицы влияет на фенотип и функцию, а также функциональные нарушения клетки. Тест на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent Seahorse XF помогает исследованию и пониманию того, какие митохондриальные матрицы важны или необходимы для определения фенотипа и функции клетки.

Что касается схемы эксперимента, на рис. 9А показан один из возможных сценариев исследования нескольких генетических вариантов (природных или генно-инженерных), опухолевых клеток, который позволяет понять, с одинаковыми или с разными скоростями эти клетки окисляют различные типы матриц и насколько эти матрицы важны для их пролиферации и перерождения. Эта информация может также указать на метаболические уязвимости, облегчив поиск потенциальных способов лечения.

Также в соответствии с современными представлениями клеточный энергетический метаболизм влияет на многие метаболические пути иммунных клеток управляет функцией иммунных клеток и указывает на нее, определяет направление их дифференцировки. Что интересно, сами метаболиты могут напрямую влиять на дифференцировку и функцию иммунных клеток⁵. Это позволяет через управление метаболизмом и генерацией метаболитов регулировать иммунитет. Например, метаболизм глутамата благодаря своему участию в цикле Кребса играет крайне важную роль в поляризации макрофагов M2 и способствует образованию клеток со стабильным фенотипом, свидетельствующих о развитом иммунитете¹³. В то же время было показано, что положительные центральные Т-лимфоциты памяти поглощают глюкозу и глицерин для синтеза жирных кислот и триглицеридов, которые затем гидролизуются путем липолиза для участия в процессе окисления жирных кислот¹⁴.

В качестве иллюстрации связи функции иммунных клеток и теста на скорость окисления матрицы рис. 9В демонстрирует, как тесты на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent XF могут применяться на различных типах иммунных клеток (наивных, активированных, памяти и т. д.) для исследования

их зависимости от одной или нескольких матриц для правильной дифференцировки и функционирования, а также потенциальных способов управления дифференцировкой иммунных клеток с помощью окисления различных матриц.

В настоящее время метаболическое программирование все чаще рассматривается в качестве одного из важнейших механизмов управления активацией, дифференцировкой и функционированием¹⁵. Различные метаболические потребности различных клеток, участвующих в формировании иммунного ответа, дают уникальную возможность разделить их фенотип и функцию. Один из подходов к иммунотерапии злокачественных опухолей использует культивирование *ex vivo* и генную инженерию аутогенных Т-лимфоцитов, которые затем применяются в протоколах адаптивного переноса. Одним из таких протоколов является и CAR-T (терапия с использованием Т-лимфоцитов, модифицированных химерным антигенным рецептором). В этой терапии Т-лимфоциты генетически изменяются для синтеза химерных белков, которые реагируют на высокоспецифичные пептиды противоопухолевых антител и стимулируют метаболические пути для активации Т-лимфоцитов³. В последнее время проводятся исследования, направленные на программирование регуляторных Т-лимфоцитов, таких как внутриопухолевые регуляторные Т-лимфоциты, регуляторные Т-лимфоциты миелоидного происхождения и макрофаги M2. Все эти типы клеток представляют особый интерес благодаря их уникальным метаболическим профилям, что позволяет рассчитывать на достижение относительно высокой степени специфичности их программирования путем генной инженерии и фармакологического воздействия³.

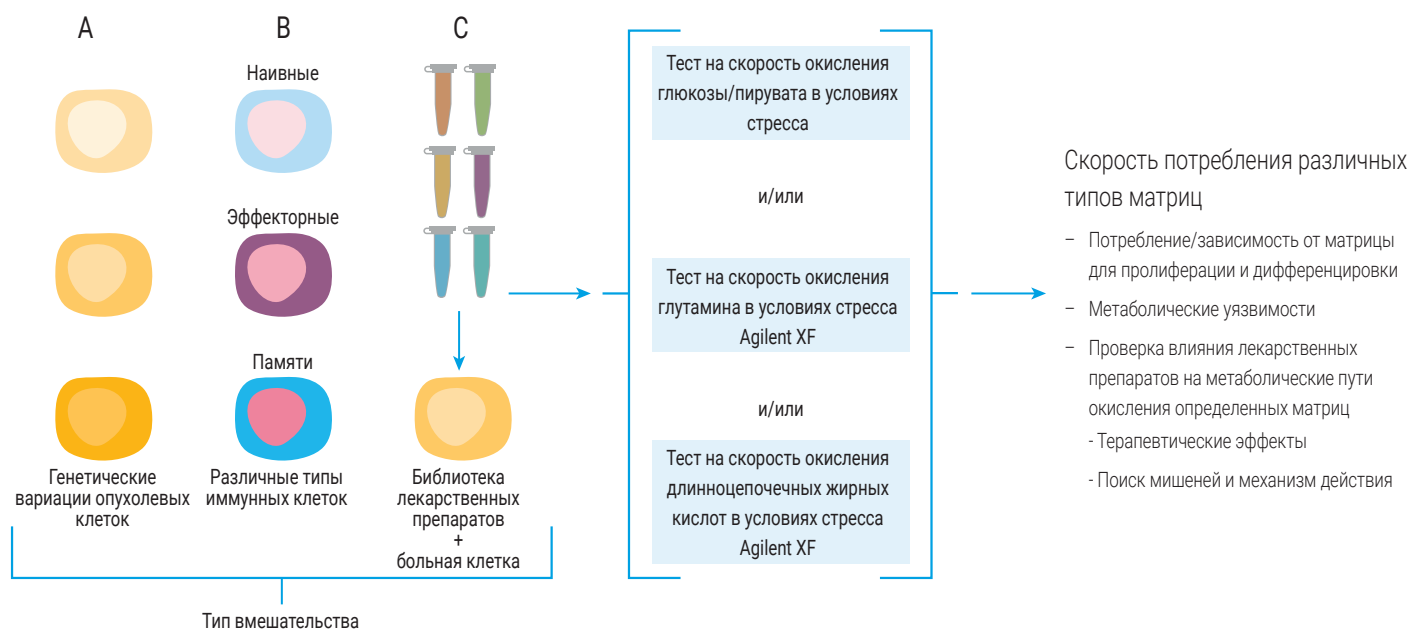


Рис. 9. Примеры схем проведения теста на скорость окисления матрицы в условиях стресса. Потенциальные схемы для проведения теста на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent XF в области (А) биологии опухолевых клеток, (В) исследований функции иммунных клеток и (С) разработки новых лекарственных препаратов. Больше информации можно найти в разделе результатов и их обсуждения.

Выводы

В области разработки и испытания новых лекарственных препаратов эти тесты могут применяться для проверки воздействия препаратов на различные метаболические пути митохондриального окисления матрицы, либо для того чтобы понять потенциальный терапевтический эффект этих препаратов на клетки с функциональными нарушениями, либо для помощи в идентификации мишеней и определении механизма действия лекарственных препаратов. В этой области с помощью этих тестов может исследоваться влияние различных переменных, таких как продолжительность воздействия препарата (долговременное или кратковременное) или его концентрация (рис. 9С).

Данное исследование описывает принципы работы и экспериментальную проверку тестов на скорость окисления матрицы в условиях стресса Agilent XF, которые позволяют понять, какие матрицы важны или нужны для определенной клеточной функции или фенотипа. Эти тесты представляют собой ряд оптимизированных, удобных и быстрых решений для измерения скорости окисления клеточной матрицы путем исследования трех основных матриц, используемых митохондриями: длинноцепочечных жирных кислот, глюкозы/пирувата и глутамина. Они позволяют в режиме реального времени получить большое количество информации о нескольких параметрах, недоступных при использовании традиционных тестов на поглощение или использование матрицы, в которых оценивается только конечное состояние системы. Тесты такого типа рекомендуются для решения вопросов о том, насколько требовательна клетка к наличию определенной матрицы, а также для определения того, как определенное воздействие на клетку влияет на скорость митохондриального окисления определенной матрицы. Такая функциональная информация приближает к пониманию того, как клетка изменяет скорость окисления различных матриц для выполнения своих ключевых функций активации, пролиферации и дифференцировки.

Количественный метаболический и энергетический фенотип

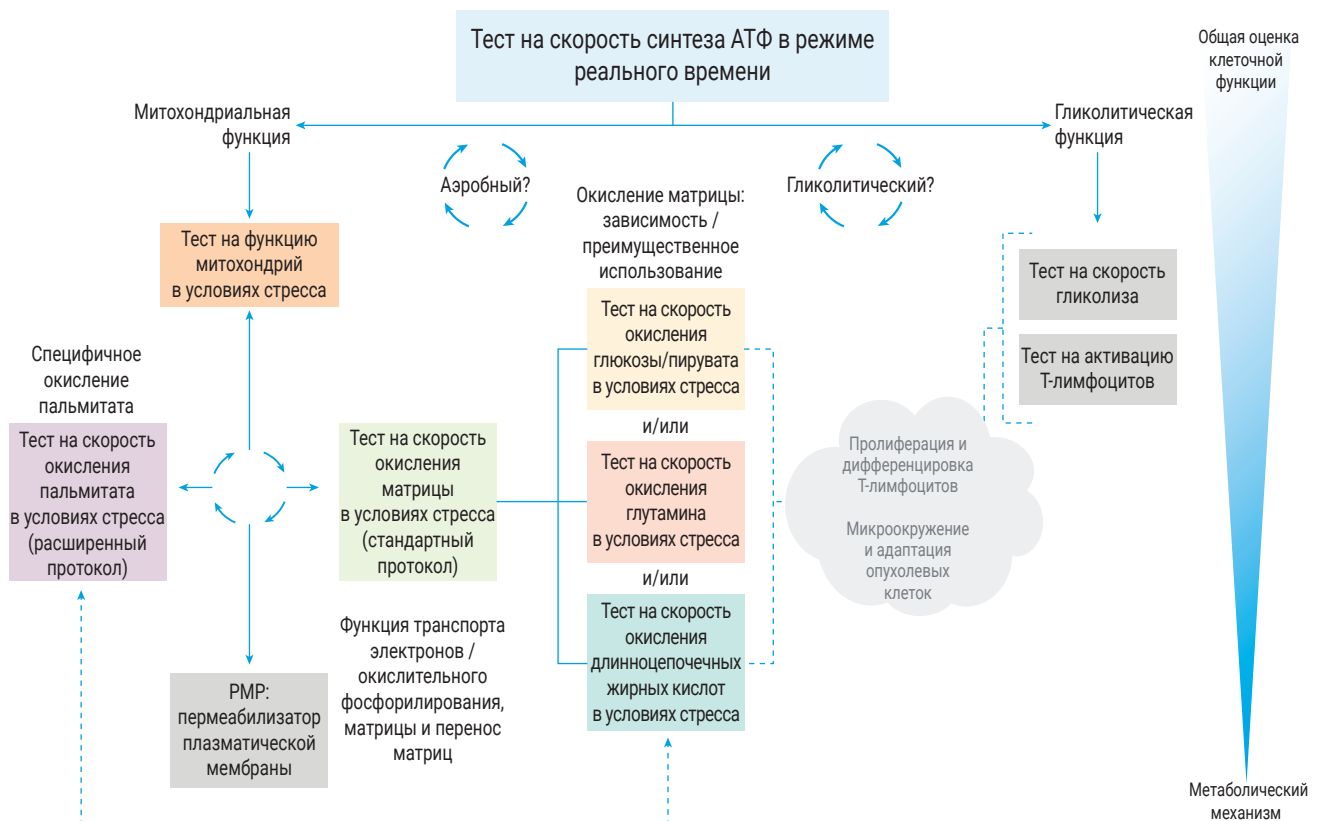


Рис. S1. Компания Agilent предлагает широкий ассортимент наборов тестов Agilent XF, которые позволяют получить полный спектр информации — от общей оценки клеточной функции до специфичных деталей метаболического механизма. После идентификации изменений в функции митохондрий следующим этапом исследования может быть изучение причин этих изменений, в том числе влияния скорости окисления глюкозы/пирувата, глутамина и длинноцепочечных жирных кислот.

Литература

1. Marx, V. How to Follow Metabolic Clues to Find Cancer's Achilles Heel. *Nat. Methods* **2019**, *16*, 221–24.
2. Vander Heiden, M. G.; DeBerardinis, R. J. Understanding the Intersections Between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* **2017**, *168*, 657–69.
3. Beezhold, K.; Byersdorfer, C. A. Targeting Immuno-Metabolism to Improve Anti-Cancer Therapies. *Cancer Letters* **2018**, *414*, 127–35.
4. Corbet, C. Stem Cell Metabolism in Cancer and Healthy Tissues, Pyruvate in the Limelight. *Frontiers in Pharmacology* **2018**, *8*.
5. Patel, C. H. *et al.* Targeting Metabolism to Regulate Immune Responses in Autoimmunity and Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 669–88.
6. Divakaruni, A. S. *et al.* Etomoxir Inhibits Macrophage Polarization by Disrupting CoA Homeostasis. *Cell Metab.* **2018**, *28*, 490–503.e7.
7. Hildyard, J. C. *et al.* Identification and Characterisation of a New Class of Highly Specific and Potent Inhibitors of the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *Biochim Biophys Acta* **2005**, *1707*, 221–30.
8. Robinson, M. M. *et al.* Novel Mechanism of Inhibition of Rat Kidney-Type Glutaminase by Bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES). *Biochemical Journal* **2007**, *406*, 407–14.
9. Divakaruni, A. S. *et al.* Analysis and Interpretation of Microplate-Based Oxygen Consumption and pH Data. *Methods Enzymol.* **2014**, *547*, 309–54.
10. Kalyanaraman, B. *et al.* a review of the Basics of Mitochondrial Bioenergetics, Metabolism, and Related Signaling Pathways in Cancer Cells, Therapeutic Targeting of Tumor Mitochondria with Lipophilic Cationic Compounds. *Redox Biology* **2018**, *14*, 316–27.
11. Kerr, E. M.; Martins, C. P. Metabolic Rewiring in Mutant Kras Lung Cancer. *Febs. J.* **2018**, *285*, 28–41.
12. Kalyanaraman, B. Teaching the Basics of Cancer Metabolism, Developing Antitumor Strategies by Exploiting the Differences Between Normal and Cancer Cell Metabolism. *Redox Biology* **2017**, *12*, 833–42.
13. Viola, A. *et al.* The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Frontiers in Immunology* **2019**, *10*.
14. Raud, B. *et al.* Fatty Acid Metabolism in CD8(+) T Cell Memory: Challenging Current Concepts. *Immunological Reviews* **2018**, *283*, 213–31.
15. Domínguez-Andrés, J.; Joosten, L. A. B.; Netea, M. G. Induction of Innate Immune Memory: The Role of Cellular Metabolism. *Current Opinion in Immunology* **2019**, *56*, 10–16.

www.agilent.com/chem

**Только для научно-исследовательских целей.
Не для использования в диагностических процедурах.**

Информация в этом документе может быть изменена
без уведомления.

© Agilent Technologies, Inc., 2019, 2020.
Напечатано в США 14 февраля 2020 г.
5994-1623RU
DE.5391782407

