

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Кафедра медицинской биологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
подпись инициалы, фамилия
«_____» _____ 20 __ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА
06.03.01 – Биология

Метаболические механизмы пролиферативной активности лимфоцитов крови

Руководитель _____ профессор, д.м.н. Савченко А.А.
подпись, дата должность, ученая степень

Выпускник _____ Рыбкина А.В.
подпись, дата

Красноярск 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1 Лимфоциты: свойства и функции	5
1.1.1 Характеристика В-лимфоцитов.....	7
1.1.2 Характеристика Т-лимфоцитов	8
1.2 Пролиферация лимфоцитов в рамках иммунного ответа	11
1.2.1 Пролиферативная активность лимфоцитов	12
1.2.2 Способы оценивания пролиферации лимфоцитов в культуре <i>in vitro</i> .	13
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	21
2.1 Постановка реакции бласттрансформации	21
2.2 Проточная цитометрия	22
2.3 Биолюминисцентное определение активности дегидрогеназ	23
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	26
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	27
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	28

ВВЕДЕНИЕ

Иммунная система обеспечивает способность организма поддерживать свой гомеостаз, индивидуальность и целостность. В общих чертах иммунную систему можно охарактеризовать как систему контроля, действие которой заключается в отличии своего от генетически чужого и уничтожение последнего. Свою функцию данная система выполняет с помощью запуска механизмов иммунного ответа после того, как обнаруживается генетически чужеродные для организма хозяина структуры.

Иммунные процессы осуществляются клетками, относящимися к двум кроветворным линиям – миелоидной и лимфоидной. Миелоидные клетки осуществляют первую реакцию организма против проникшего антигена, выполняя функцию врожденного иммунитета, а лимфоидные - отвечают преимущественно за реакции адаптивного иммунитета. Клетками лимфоидного происхождения являются лимфоциты, которые реагируют на проникнувшие в организм инфекции, распознают чужеродные антигены и запускают ряд реакций иммунного ответа.

В ходе иммунного ответа наивные лимфоциты распознают чужеродный антиген и при надлежащей костимуляции активируются, быстро пролиферируют и производят различные эффекторные молекулы, которые приводят к контролю патогена. Активация этих клеток, клональная экспансия и приобретение эффекторных функций являются энергетически требовательными процессами, которые сопровождаются и зависят от выраженных изменений в усвоении питательных веществ и клеточном метаболизме.

Активация лимфоцитов приводит к резким сдвигам в клеточном метаболизме для защиты от патогенов и организации действия других иммунных клеток. Наивные лимфоциты требуют преимущественно АТФ-генерирующих процессов, тогда как пролиферирующие эффекторные клетки

требуют высокого метаболического потока через стимулирующие рост пути. Пути, которые контролируют функцию иммунных клеток и метаболизм, тесно связаны, и установлено, что изменения в метаболизме клеток, как на клеточном, так и на системном уровнях, усиливают или подавляют специфические функции лимфоцитов. В результате этих открытых клеточный метаболизм теперь ценится как ключевой регулятор спецификации и функциональной активности лимфоцитов.

Целью моей работы является исследование метаболических механизмов активности лимфоцитов в ходе пролиферативного ответа.

На основании поставленной цели были определены следующие задачи:

- Изучить современную научную литературу по данной теме.
- Отработать методику постановки реакции бласттрансформации с оценкой эффективности методом проточной цитометрии.
- Оценить активность ферментов лимфоцитов в ходе реакции бласттрансформации, методом биолюминисценции.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1Лимфоциты: свойства и функции

Как известно, иммунная система представляет собой комплекс гуморальных и клеточных компонентов, которые являются движущей силой организма в борьбе с внешними патогенными агентами. В состав иммунной системы входят центральные и периферические органы, которые играют важную роль в образовании и правильном функционировании всей системы в целом, а также несколько типов клеток, из которых только лимфоциты являются истинными иммунными клетками. Они являются ключевыми клетками адаптивного иммунитета, представляющими из себя разновидность лейкоцитов группы агранулоцитов.

Среди лимфоцитов можно выделить 3 группы, такие как Т- и В-клетки, которые являются истинными лимфоидными клетками, и естественные киллеры (NK-клетки), которые относятся к лимфоидным клеткам, но по механизму своего действия больше напоминают клетки врожденного иммунитета. Одним из различий данных клеток является их процентное содержание в крови, так Т-клеток в крови больше всего, а именно 65-80% от общего количества лимфоцитов, В-клеток уже значительнее меньше, порядком 8-20%, ну, а NK-клетки – это самая малочисленная популяция, которая достигает 5-20%.

Немного подробнее стоит остановиться на естественных киллерах. NK-клетки относятся к большим гранулярным лимфоцитам, но от Т- и В-клеток они отличаются тем, что на их поверхности отсутствует специальный антигенраспознающий рецептор. Эти клетки получили свое название вероятнее всего от того, что они являются эффекторными клетками, которые способны утилизировать непосредственно инфицированные или трансформированные клетки быстро и без дополнительной иммунизации. Здоровая клетка в норме синтезирует на себе огромное количество молекул

MHC, а вот при отсутствии или нехватке данного количества молекул NK-клетки распознают эту клетку как «не свою» и уничтожают ее [3].

Подробнее остановимся на Т- и В-лимфоцитах. Обе эти группы происходят из стволовых клеток в костном мозге. Оттуда еще незрелые лимфоциты выходят в кровоток. А затем устремляются в разных направлениях, одна часть попадает в центральный орган иммунной системы, который называется тимус, где дифференцируется в Т-клетки, эти лимфоциты утрачивают способность развиваться в другие иммунные клетки. Другая часть незрелых клеток попадает в лимфоидную ткань организма и развивается в В-лимфоциты. Этот факт был установлен с помощью эксперимента на цыплятах, в котором незрелые лимфоциты созревали в сумке Фабрициуса от латинского «*bursa*» – сумка, откуда и произошло их название [1].

На поверхности Т- и В- лимфоцитов имеется специальный антигенраспознающий рецептор. Согласно клональной теории, при проникновении антигена в организм лимфоциты пролиферируют, образуя клоны, каждый из которых несет на себе специфический рецептор «материнской» клетки.

Основная функцией лимфоцитов является распознавание антигенов, но данный процесс для Т- и В-клеток различается. Так В-лимфоциты могут распознавать антиген, представленный на поверхности антигенпрезентирующих клеток, а также сталкиваясь с ним в барьерных тканях организма. Когда антиген сталкивается с В-лимфоцитом, он начинает стимулировать его к запуску гуморального иммунного обмена, который осуществляется за счет выработки антител.

Распознавание антигенов Т-лимфоцитами несколько отличается, их рецептор распознает не сам антиген, а его часть, связанную с MHC. За счет Т-клеток осуществляется клеточный иммунный ответ, который запускает

механизмы образования эффекторных клеток, таких как цитотоксические лимфоциты, которые разрушают инфицированные вирусом клетки и опухолевые клетки, тем самым способствуя организации правильного клеточно-опосредованного иммунного ответа [22].

Антиген может активировать, как клеточный, так и гуморальный тип иммунного ответа. Известно также, что между лимфоцитами также существует взаимодействие, причем Т-клетки могут в некоторых случаях доминировать над В-клетками, например, подавляют действие В-клеток на безвредные для организма вещества или, наоборот, активировать их иммунный ответ на антигены. Если данная система не работает по какой-либо причине, то это может вызывать в организме аллергические реакции на вещества, которые не представляют угрозы для организма.

1.1.1 Характеристика В-лимфоцитов

Как я уже говорила ранее, на В-лимфоцитах располагается специализированный иммуноглобулиновый рецептор (BCR), который способствует распознаванию данными клетками антигенов в связанных с мембранами формах антигенпрезентирующих клеток (АПК), реже, встречается вариант распознания непосредственно нативного антигена барьерными В-клетками. В-клетки и их антитела являются центральными элементами гуморального иммунитета, а в качестве части адаптивной иммунной системы, они способны противостоять огромному разнообразию патогенов.

У людей, как и у всех млекопитающих, В-лимфоциты развиваются в костном мозге из гемопоэтических клеток-предшественников. Эти клетки становятся незрелыми В-клетками. Затем они покидают костный мозг и мигрируют в селезенку, где завершают свое раннее развитие, дифференцируясь в различные субпопуляции.

В-лимфоциты подразделяются на три основных субпопуляции. Наиболее малочисленной популяцией В-клеток являются, В1-лимфоциты ($CD45^+CD19^+CD5^+CD27^-$), которые несут на своей поверхности рецептор с низкой специфичностью к антигену, спонтанно вырабатывают низкоаффинные антитела преимущественно IgM-изотипа. Данные клетки локализованы в серозных полостях и барьерных тканях организма, что позволяет им наиболее быстро реагировать на возникающую угрозу.

Среди В1-лимфоцитов существует такая группа клеток ($CD45^+CD19^+CD5^-CD27^+$), которая локализована в маргинальной зоне селезенки, что послужило для выделения их в отдельную популяцию В-клеток, но по своим функциям и свойствам они схожи с клетками, описанными ранее.

Третьей и самой крупной популяцией В-лимфоцитов являются В2-клетки ($CD45^+CD19^+CD5^-CD27^-$), у которых отсутствует специализированное место локализации, потому что они распределены по всему организму. Они отвечают за выработывание антител. Эти клетки отвечают за образование высокоспецифичных и высокоаффинных антител разных изотипов. В2-лимфоциты отвечают на различные белковые и патрикулированные антигены, распознаваемые ими через специфические поверхностные иммуноглобулиновые рецепторы. А также в процессе В-клеточного ответа активное участие принимают Т-хелперы, которые распознают чужеродные пептиды в составе МНС II класса.

1.1.2 Характеристика Т-лимфоцитов

Т-клетки являются крупной популяцией лимфоцитов, развитие которых происходит в тимусе, что и определило их название. Т-лимфоциты происходят от предшественников костного мозга, которые мигрируют в тимус для созревания, отбора и последующего экспорта на периферию. Периферические Т-клетки состоят из различных групп клеток, которые

отличаются по степени дифференцировки [25]. Самой распространенной группой являются наивные Т-клетки, способные реагировать на новые антигены, также имеются Т-клетки памяти, которые получают от предыдущей активации антигена и поддерживают долгосрочный иммунитет, и регуляторные Т-клетки (Treg), которые отвечают за торможение аутоиммунного ответа за счет принципов обратной селекции. Иммунные реакции начинаются, когда наивные Т-клетки сталкиваются с антигеном и костимулирующими лигандами, представленными дендритными клетками, что приводит к продукции интерлейкина 2 (IL-2), пролиферации и дифференцировке в эффекторные клетки, которые мигрируют в различные участки для денатурации и избавления от патогена. Активированные эффекторные клетки недолговечны, хотя часть из них дифференцируется в виде Т-клеток памяти, которые сохраняются в виде гетерогенных подмножеств, основанных на миграции, локализации ткани и способности к самообновлению. Каждое подмножество памяти может участвовать в поддержании долгосрочного иммунитета и вспоминать защитные реакции, хотя их происхождение и родословная связь остаются нерешенными [22].

Т-лимфоциты распознают антиген через TCR. В отличие от В-лимфоцитов, Т-лимфоциты могут распознавать только те антигены, которые отображаются на поверхности клеток. Эти антигены могут быть получены из патогенов, которые реплицируются внутри клетки, таких как вирусы или внутриклеточные бактерии. Т-лимфоциты распознают внутриклеточные патогены, поскольку инфицированные клетки отображают на своей поверхности фрагменты или пептиды, полученные из белков патогенов. Молекулы, ответственные за удержание этих пептидов на поверхности клетки, являются молекулы МНС. Распознаются два класса молекул МНС: класс I и II. Молекулы МНС класса I присутствуют на всех клетках организма, тогда как МНС класса II присутствуют на

антигенпрезентирующих клетках и других специализированных клетках

[1]Ошибка! Источник ссылки не найден..

Субпопуляции Т-клеток различаются по некоторым параметрам, и прежде всего из них можно выделить - $\gamma\delta$ Т и $\alpha\beta$ Т-клетки. Функция $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов плохо изучена, и считается, что они представляют собой более примитивную форму адаптивного иммунного ответа. Среди $\alpha\beta$ Т-клеток наиболее значимой популяцией являются NKT-лимфоциты, которые экспрессируют на своей поверхности CD3, что свидетельствует об их принадлежности к Т-лимфоцитам, и типичные для NK-клеток молекулы, поэтому принято считать, что данные клетки совмещают в себе функцию как Т-лимфоцитов, так и натуральных киллеров. Их главным отличием от остальных Т-клеток является то, что они не способны распознавать пептидные эпитопы, но при этом участвуют в распознавании липидных [4]. Также среди $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов обычно выделяют две значимые популяции – это Т-хелперы ($CD4^+$) и цитотоксические Т-клетки ($CD8^+$). Данные клетки распознают антигенные пептиды в составе разных МНС. В то время как две субпопуляции Т-лимфоцитов экспрессируют сходные Т-клеточные рецепторы (TCR), они используют различные механизмы для распознавания чужеродного антигена. Большинство $CD8^+$ лимфоцитов функционируют как цитотоксические клетки. TCR, экспрессируемые этими клетками, связывают антиген, представленный МНС I, несущим антигенпрезентирующие клетки; TCR, экспрессируемые Т-хелперами ($CD4^+$), связывают антиген, представленный МНС II, после чего они выполняют несколько функций, в том числе: активация В-лимфоцитов для эффективного синтеза антител; стимуляция $CD8^+$ Т-лимфоцитов; секреция цитокинов, которые инициируют воспалительные реакции; регуляция потенциально патогенных адаптивных иммунных реакций. Также данные популяции клеток отличаются тем, что цитотоксические клетки функционируют как единая клеточная субпопуляция, а среди Т-хелперов выделяют еще несколько субпопуляций. Одной, из

которых является популяция регуляторных Т-клеток ($CD45^+ CD3^+ CD4^+ CD25^{\text{bright}} CD127^{\text{low}}$). Функция этих клеток состоит в контроле активности аутоспецифических клонов Т-лимфоцитов [20].

1.2 Пролиферация лимфоцитов в рамках иммунного ответа

Важным аспектом жизнедеятельности лимфоцитов, обеспечивающий выполнения их ключевых функций, являются процесс пролиферативного ответа на антигенную стимуляцию, благодаря которому осуществляется наработка специфического клона клеток. Ключевую роль в этом процессе играет митотическое деление. Биологический смысл, которого состоит в том, что оно является главным событием в клеточном делении и способствует передачи дочерней клетке такого же набора хромосом, как был у материнской за счет точного копирования хромосом, которое наступает в интерфазе клеточного цикла [20].

Во время прогрессирования клеточного цикла пролиферирующие клетки последовательно претерпевают переход фаз $G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M$ для синтеза ДНК, подготовки клеточного деления и последующего процесса митоза. Однако при определенных обстоятельствах клетки могут войти в фазу $G0$, где они не делятся и не готовятся к пролиферации. Эти покоящиеся клетки характеризуются наличием минимального механизма клеточного цикла и поддержанием специализированных клеточных функций, а не продолжением клеточной пролиферации [20].

Как я уже упоминала выше, лимфоциты не могут завершить свое развитие без вмешательства внешних факторов, это во многом отличает данные клетки от остальных клеток организма. В роли таких факторов зачастую выступают антигены, а реакция лимфоцитов на их стимуляцию составляет основную часть адаптивного иммунного ответа [18].

1.2.1 Пролиферативная активность лимфоцитов

Особую значимость в оценке пролиферации в процессе прохождения лимфоцитами своего жизненного цикла я вижу в том, что лимфоциты являются единственными в своем роде клетками, развитие которых не может завершиться без их пролиферации [2]. Помимо полезности реакции на митогены в качестве модельной системы для изучения клеточной активации и дифференцировки, она также предлагает инструмент для оценки общей пролиферативной и функциональной способности лимфоцитов человека при различных клинических состояниях, например при иммунодефицитных заболеваниях и у пациентов, получающих иммуносупрессивную терапию [20].

Как известно на лимфоциты могут воздействовать различные внешние стимулы, одним из которых могут являться митогены. По своей химической природе митогены – это лектины, которые способны узнавать определенные углеводные фрагменты на гликопroteинах мембранных клеток хозяина. Связываясь с этими фрагментами, митогены часто агглютинируют несколько клеток вместе. В случае Т-лимфоцитов связывание определенных лектинов с углеводами цепей TCR или CD3 является достаточным для запуска внутриклеточной сигнализации, приводящей к активации и пролиферации Т-клеток. Поскольку углеводные элементы обычно одинаковы независимо от антигенной специфичности TCR, лектин активирует многие клонсы Т-клеток различной специфичности и, таким образом, функционирует как поликлональный активатор. Определенные анти-CD3 антитела также могут считаться митогенами, поскольку они запускают внутриклеточный сигнальный путь, который приводит к активации Т-клеток независимо от антигенной специфичности. Различные митогены стимулируют различные типы клеток.

В 1960 г. П. Новелл впервые выделил лектин фитогемагглютинин (ФГА) из фасоли *Phaseolus vulgaris*, который ранее случайно обнаружили в процессе работ в банке крови. С тех пор выделено немалое количество различных митогенов. Например, агглютинин зародышей пшеницы (WGA), конканавалин а (Con A), выделенный из растения семейства бобовых и митоген трески (PWM) способствуют пролиферации Т-клеток человека. ЛПС является нелектиновым митогеном для мышиных и человеческих В-клеток. Препараты липополисахаридов (ЛПС) эндотоксинов из грамотрицательных бактерий также являются митогенами, биологическое действие которых *in vitro* может проявляться преимущественно на функции В-лимфоцитов или Т-лимфоцитов в зависимости от используемых условий. В отсутствие антигена ЛПС, по-видимому, действует главным образом на В-лимфоциты. Однако в присутствии антигена ЛПС значительно влияет на специфическую хелперную функцию Т-клеток, и именно это является главным образом ответственным за адьювантные эффекты ЛПС на антигенспецифические реакции антител. ЛПС связывается не с BCR, а с CD14 и TLR4, присутствующими в мембране В-клеток [37].

О воздействии митогенов на лимфоциты также проводилось большое количество исследований, в основном все сводится к тому, что Т-лимфоциты реагируют на фитогемагглютинин (ФГА), митоген тыквы. А В-клетки хорошо реагируют на митоген тыквы и липополисахариды, но совсем не на ФГА. Но также доказано, что В-лимфоциты реагируют на ФГА в присутствии активированных Т-клеток [40].

1.2.2 Способы оценивания пролиферации лимфоцитов в культуре *in vitro*

Так как оценивание пролиферации лимфоцитов клеток является актуальным вопросом современной иммунологии, то на сегодняшний день разработаны различные методики для осуществления данной цели. Все эти

методы, безусловно рассчитаны на подсчет количества ДНК в клетке в определенные фазы митотического деления [12].

Исторически первый метод – микроскопический, который основан на морфологической характеристике изучаемых клеток. Ведь в процессе интерфазы клеточного цикла клетки накапливают в себе двойной набор ДНК, что позволяет им в дальнейшем поделиться на две идентичные материнской клетки. А на препарате они будут выглядеть крупнее, чем те, что их окружают. Недостатки данного метода, такие как высокая степень субъективности, большие трудозатраты исследователя и достаточно долгое время проведения анализа, на лицо, и в настоящее время с появлением современных технологий данный метод отходит в сторону, но иногда его по-прежнему используют для демонстрации морфологических характеристик бластных клеток или других лимфоцитов [3].

Следующий за микроскопическим по времени возникновения, но не по значимости – это колорометрический метод. Этот метод основан на окрашивании клеточных линий в процессе реакции бласттрансформации прижизненными внутриклеточными красителями, которые способны проникать в ядро клетки и встраиваться в последовательность ДНК, что делает данный метод значительно точным. Хорошим примером данных красителей является МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолиум бромид. Только митохондриальные ферменты живых клеток способны восстановить тетразолиевую соль МТТ до МТТ-формазана и изменить окраску раствора из желтой в темно-синюю. Мертвые клетки и среда для культивирования такой способностью не обладают. Затем с помощью спектрофотометра можно определить количество восстановленного формазана, которое будет прямо пропорционально количеству клеток. Данный метод, как я уже говорила, является весьма точным и позволяет за менее короткое время проанализировать большое количество образцов. Также метод считается экономичным, что позволяет

его использовать в современной иммунологической лабораторной диагностике [13].

Также существует радиоизотопный метод для оценки пролиферации лимфоцитов. Данный метод сопряжен с использованием в процессе исследования нуклеотидов, которые заранее метятся радиоактивными изотопами. Данные нуклеотиды встраиваются в цепь ДНК, в частности тимицина ($^{3}\text{H-Td}$) - β -излучатель, уридина $^{14}\text{C-Td}$ - γ -излучатель или ^{13}H -дезоксиуридина - γ -излучатель. По сравнению с остальными вышеперечисленными методами, радиоизотопный метод является очень точным, к тому же позволяет определить не только те клетки, которые накопили двойной набор ДНК, но и уже поделившиеся дочерние клетки, из-за этого его даже принято называть «золотым стандартом». Не смотря на все преимущества данного метода, он также постепенно отходит в сторону из-за того, что для проведения исследований требуются помещения для работы с радиоактивными частицами, а также дорогостоящее оборудование и специализированное хранение и утилизации радиоактивных отходов. Также методика представляет для исследователя опасность, особенно в том случае, если техника безопасности нарушается. С помощью этого метода определяется скорость синтеза ДНК, а не истинное количество клеток в образце. Кроме того, в последнее время доказано, что при этом исследовании наблюдается значительный спонтанный выход изотопов из меченых клеток, что может искажать результаты измерений [5].

Более двадцати лет назад появился еще один способ исследования активности лимфоцитов – это проточная лазерная цитометрия. Развитие проточной цитометрии, которая измеряет интенсивность флуоресцентных пятен ДНК или антител, произвело революцию в области клеточного цикла. Одним из многочисленных преимуществ по сравнению с более ранними методами является рутинная и быстрая количественная оценка тысяч клеток в образце и относительно объективные сравнения между различными

образцами [2]. Кроме того, одновременно могут оцениваться несколько молекулярных параметров, и число отдельных измерений ограничено только спектральными свойствами реагентов и флуоресцентных детекторов. Поскольку одновременно с проточной цитометрией анализируется большое количество клеток, исследователи имеют возможность получать скорости фазовых переходов клеточного цикла и выявлять незначительные субпопуляции клеток. Возможности для мультиплексных измерений значительно расширились с недавним развитием массовой цитометрии. В общем, можно заключить, что данный метод имеет множество преимуществ по сравнению с остальными, такие как: высокая скорость и точность анализа (в среднем процедура измерения клеточного цикла на проточном анализаторе занимает не более 10 минут), объективность, простота постановки реакции, быстрое получение результата, безопасность. Цитофлуорометрический метод основан на том, что мононуклеары выделяются из крови и помечаются специальным ДНК связывающим красителем. Данная реакция оценивается с помощью проточной лазерной цитометрии. [20].

1.3 Метаболизм лимфоцитов в процессе их пролиферации

Отдельное значение имеет оценка клеточного метаболизма в процессе реализации иммунных реакций. Доступ к питательным веществам и удовлетворение метаболических потребностей необходимы для выживания клеток, их пролиферации и надлежащего выполнения намеченных функций. Во время иммунного ответа лимфоциты претерпевают значительные изменения в росте и функционировании, которые тесно связаны с динамическими сдвигами в обменных процессах, т.е. метаболические процессы в лимфоцитах лежат в основе их функций [23].

Активация Т-клеток приводит к резким сдвигам в клеточном метаболизме для защиты от патогенов и организации действия других иммунных клеток. Наивные Т-клетки требуют преимущественно АТФ-

генерирующих процессов, тогда как пролиферирующие эффекторные Т-клетки требуют высокого метаболического потока через стимулирующие рост пути. Кроме того, функционально различные субпопуляции Т-клеток требуют различных энергетических и биосинтетических путей для поддержания их специфических функциональных потребностей [29]. Рост лимфоцитов и биосинтез органелл в основном зависит от метаболизма жирных кислот [26]. Пути, которые контролируют функцию иммунных клеток и метаболизм, тесно связаны, и было показано, что изменения в метаболизме клеток, как на клеточном, так и на системном уровнях, усиливают или подавляют специфические функции Т-клеток. В результате этих открытий клеточный метаболизм теперь ценится как ключевой регулятор спецификации и функции Т-клеток [7].

Изучение клеточного метаболизма и способа изменения метаболизма в пролиферативных тканях и клетках имеет богатую историю. Почти столетие назад Отто Варбург впервые обнаружил, что вместо того, чтобы полагаться на митохондриальные окислительные пути для получения максимальной энергии, раковые клетки используют менее эффективный процесс гликолиза, производя молочную кислоту даже в присутствии достаточного количества кислорода [26]. Позднее тем же ученым было обнаружено, что для метаболизма активированных лейкоцитов также данное утверждение является верным. Так клетки, находящиеся в покое используют аэробный окислительный метаболизм, а их стимуляция заставляет клетки использовать гликолиз в качестве основы для метаболизма клетки [26]. Эти результаты противоречили классической биохимии того времени для клеток млекопитающих, поскольку считалось, что клетки будут полагаться на превращение пирувата в лактат только тогда, когда митохондрии были повреждены или если кислород отсутствовал [29]. Сходство метаболизма раковых клеток и активированных лимфоцитов не случайно и начинает объяснять, почему клетки могут предпочесть аэробный гликолиз более

энергоэффективным митохондриальным окислительным путем. В конце концов, метаболизм должен соответствовать функциональным требованиям клеток, и как раковые клетки, так и стимулированные лимфоциты сигнализируют о том, что они растут и быстро размножаются. Таким образом, они разделяют метаболическую потребность в приоритете эффективного и быстрого биосинтеза над эффективным производством энергии/АТФ. Переход от окислительного метаболизма к гликолизу идеально подходит для того, чтобы соответствовать этому сдвигу в метаболическом спросе, поскольку окислительный метаболизм направляет глюкозный пируват в митохондрии для окисления потенциально до углекислого газа, а гликолиз производит много промежуточных продуктов, которые могут быть использованы для биосинтеза. В дополнение к повышенному гликолизу, некоторые молекулы глюкозы проходят через митохондрии и часть цикла трикарбоновой кислоты (ЦТК) для получения цитрата для синтеза липидов. Таким образом, хотя аэробный гликолиз лучше всего характеризуется повышенными скоростями гликолиза, необходимо скоординированное действие гликолиза и митохондриального метаболизма [29].

Хотя аэробный гликолиз менее эффективен, чем окислительное фосфорилирование, при получении обилия АТФ на молекулу глюкозы, аэробный гликолиз может генерировать метаболические промежуточные продукты, важные для роста и пролиферации клеток, и обеспечивает способ поддержания окислительно-восстановительного баланса (NAD^+/NADH) в клетке. Например, глюкозо-6-фосфат и 3-фосфоглицерат, образующиеся в процессе гликолиза, могут метаболизироваться в путях биосинтеза пентозофосфата и серина соответственно, обеспечивая важные предшественники для синтеза нуклеотидов и аминокислот. Глюкоза также может поступать в митохондрии в виде пирувата, где она преобразуется в ацетил-КоА и присоединяется к ЦТК путем конденсации с оксалоацетатом с образованием цитрата [37].

Во время активации Т-клеток выработка АТФ в основном происходит за счет катаболизма глюкозы и жирных кислот. При попадании в клетку глюкоза быстро фосфорилируется гексокиназой, образуя глюкозо-6-фосфат и потребляя молекулу АТФ. Процесс гликолиза может генерировать высокоэнергетические молекулы, такие как НАДН и АТФ, и образовывать две молекулы пирувата. Промежуточные продукты, образующиеся в процессе гликолиза, переносятся на путь пентозофосфата, путь биосинтеза серина, путь β -окисления или путь гликогенеза, что приводит к образованию нуклеотидов, жирных кислот и гликогена, необходимых для метаболизма Т-клеток. После того как пируват синтезируется, он поступает в митохондрии и подвергается дальнейшему расщеплению через цикл трикарбоновой кислоты (ЦТК). Внутри митохондриального матрикса пируват карбоксилируется с образованием оксалоацетата или декарбоксилируется и соединяется с коферментом А (КоА) с образованием ацетил-КоА. Затем, под действием синтазы лимонной кислоты, оксалоацетат соединяется с ацетил-КоА для получения цитрата. Во время ЦТК оксалоацетат регенерируется и рекомбинируется с новой молекулой ацетил-КоА. Этот цикл производит два восстановителя, а именно НАДН и ФАДН₂, которые жертвуют электроны цитохрому электронной транспортной цепи, в результате чего образуется большое количество АТФ с помощью окислительного фосфорилирования, участвующим в регуляции метаболизма Т-клеток. Напротив, без участия митохондрий пируват может катализироваться лактатдегидрогеназой для получения лактата. Выработка лактата участвует в энергетическом обмене веществ [14].

Лимфоциты являются аэробными клетками, но даже в присутствии обильного кислорода они могут предпочтительно использовать гликолиз для производства АТФ. Энергия и метаболиты, производимые аэробным гликолизом, могут поддерживать активацию Т-клеток и быструю

пролиферацию [21,22]. В этом состоянии большая часть пирувата быстро превращается в лактат и выводится из организма.

После лигирования TCR и активации костимулирующего фактора Т-клетки демонстрируют быструю пролиферацию и перепрограммирование, что приводит к высокой экспрессии цитотоксинов, молекул клеточной поверхности и цитокинов. Рост, пролиферация и дифференцировка лимфоцитов, а также связанный с ними синтез белка сопровождаются поглощением метаболитов, которые обеспечивают энергию, необходимую для клеточного метаболизма [34,35]. Активация Т-клеток зависит от поглощения питательных веществ; таким образом, глюкоза и аминокислоты имеют решающее значение для роста и активации Т-клеток [36].

У млекопитающих поглощение глюкозы зависит от экспрессии семейства переносчиков глюкозы клеточной поверхности (Glut1-14) [37-39]. Транспортеры глюкозы избирательно экспрессируются на поверхности Т-клеток. В процессе активации лимфоциты должны поглощать питательные вещества, способствующие их пролиферации и дифференцировке, а также удовлетворять метаболические потребности эффекторных молекул. Активация лимфоцитов также зависит от поглощения аминокислот, и высокая экспрессия белков-переносчиков аминокислот увеличивает активацию клеток. Во время процесса активации глутамин является самой важной аминокислотой. Метabolизм глутамина необходим для его поглощения и расщепления, а его производные могут подаваться в цикл Кребса для синтеза de novo липидов и NADPH, что способствует активации лимфоцитов [39]. Метаболиты используются для обеспечения энергией во время активации Т-клеток, а гликолиз и окисление жирных кислот являются важными клеточными метаболическими путями, участвующими в этом процессе. Промежуточные продукты, производимые клеточным метаболизмом и потреблением глюкозы и аминокислот, способствуют активации лимфоцитов [39].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основным материалом нашего исследования являлась периферическая венозная кровь из локтевой вены. Забор биоматериала производился на базе центра крови №1, города Красноярска. Обследовано 19 относительно здоровых пациентов в возрасте 30-55 лет (средний возраст – 45 лет). Из исследования были исключены все пациенты с признаками респираторных заболеваний. Забор крови производили с утра, натощак. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования» с поправками 2013 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 1.04.2016 г. № 266.

2.1 Постановка реакции бласттрансформации

Работа по выделению клеток и постановки РБТЛ проводилась в стерильных условиях бокса. С помощью градиентного центрифугирования на фиколе ($d=1,077\text{г}/\text{см}$) в соотношении 3 мл лейкоцитарной взвеси на 1 мл фикола, выделили мононуклеары. Затем центрифугировали с использование центрифуги с охлаждением, в течении 40 минут при 1500 оборотах и температуре 4°C. После центрифугирования собрали сконцентрированные на фиколе лимфоциты и отмыли избыточным количеством физиологического раствора. Отмытые клетки посчитали, сконцентрировали и поделили на две равные части, которые поместили в инкубационные матрасы.

В оба матраса добавили 5 мл полной питательной среды (среда RPMI 1640 с глутамином, 10% (от общего объема) аутологичной сыворотки, нетоксичная концентрация антибиотиков (гентамицин)), в первый матрас дополнительно 25мкл фитогемаглютенина (ФГА (в соотношении 5мкл/1мл среды) конечные концентрации ФГА в питательной среде – 6-12 мкг/мл). Оба

матраса помещаем в СО₂ инкубатор при температуре 37°С. В процессе инкубации производился забор материала из матрасов обеих линий на 48 часов и 72 часа, после которого, при помощи центрифугирования, клетки концентрировались в объеме 1 мл. Затем произвели подсчет и определение процента выживших клеток. 1 млн/мл клеток отбираются для проведения биолюминесцентного анализа.

2.2 Проточная цитометрия

Для определения клеточного цикла и выживаемости культуры использовали метод проточной цитометрии. Принцип которой заключается в том, что клетка, меченная флуоресцентными моноклональными антителами, проходит в потоке жидкости по капилляру, который пересекает лазерный луч, и прибор регистрирует сигнал, отраженный от поверхности клетки по принципу да/нет (есть клетка или нет). Наличие на клетке моноклональных антител, меченых флуорохромом, ассоциированных с его дифференцировочными антигенами, указывает на принадлежность клетки к определенной субпопуляции.

Таким образом, полученный материал поместили в предварительно охлажденный до температуры – 20С°, 75% этиловый спирт, в пропорции 1:10 (100 мкл биоматериала на 900 мкл спирта) плотно закрыли и заморозили. Это необходимо, так как пропидий не способен спонтанно диффундировать через плазматическую мембрану, поэтому клетки permeabilizируют перед окраской с помощью фиксирующих растворов на основе спиртов или ацетона. Заспиртованные клетки после инкубации отмыли от спирта избытком физраствора в пропорции 1:10. После чего добавили 10 мкл РНКазы и инкубировали 15 минут, после клетки окрасили 10 мкл йодистым пропидием (PI) и инкубировали еще 15 минут. Измерение клеточного цикла проводили по заранее запрограммированному протоколу на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter) методом прямой 8-цветной флуорисценции.

Следует отметить, что количество красителя в клетке строго пропорционально количеству ДНК. Именно этот принцип позволяет выделить основные области, соответствующие стадиям клеточного цикла. Клетки, которые находятся в состоянии покоя (G0) и клетки, находящиеся в фазе G1 клеточного цикла, содержат двойной набор хромосом, соответственно они будут находиться в составе одного пика, который носит название «диплоидного» (G0/ G1). Как известно, при активации клетки начинают пролиферировать, что является следствием синтеза ДНК, и его количество постепенно увеличивается с 2N до 4N. Этот процесс, конечно, способствует увеличению связывания пропидия с ДНК, и как следствие, флуоресцентное свечение клеток усиливается. Так в G2 фазе клеточного цикла и в процессе митоза количество ДНК в клетке возрастает до 4N. А это в свою очередь приводит к тому, что интенсивность свечения клеток на данных этапах клеточного цикла будет в два раза превосходить [20]. Эти данные мы обработали и представили в виде конечных цифровых значений.

2.3 Биолюминисцентное определение активности дегидрогеназ

Методика, которая использовалась нами для определения биолюминисцентной активности НАД(Ф) – зависимых дегидрогеназ состоит из нескольких последовательных этапов. Сначала необходимо разрушить клетки, чтобы получить доступ к их содержимому. Это осуществлялось с помощью заморозки-разморозки суспензии лимфоцитов и осмотического лизиса с добавлением дистиллированной воды в соотношении 1:5 и 1,0-2,0 mM дитиотреитола.

Данным методом определили активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ, КФ 1.1.1.8), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), малик-фермента (НАДФ-МДГ, КФ 1.1.1.40), НАД- и НАДН-зависимых реакций малатдегидрогеназы (МДГ и НАДН-МДГ, КФ 1.1.1.37), НАДФ- и

НАДФН-зависимых глутаматдегидрогеназ (НАДФ-ГДГ и НАДФН-ГДГ, КФ 1.4.1.4), НАД- и НАДН-зависимых глутаматдегидрогеназ (НАД-ГДГ и НАДН-ГДГ, КФ 1.4.1.2), НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (НАД-ИЦДГ, КФ 1.1.1.41 и НАДФ-ИЦДГ, КФ 1.1.1.42), глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2).

Таблица 1 - Концентрация субстратов, кофакторов и показатели рН среды для определения активности НАД(Ф)- зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах биолюминесцентным методом

Фермент	Субстрат – мМ	Кофактор – мМ	pH буфера
Г6ФДГ	Г6Ф – 1,5	НАДФ – 0,025	9,8
Г3ФДГ	Г3Ф – 0,5	НАД – 0,35	9,8
ЛДГ	Лактат – 2,0	НАД – 0,50	9,0
МДГ	Малат – 2,0	НАД – 2,50	9,8
НАДФМДГ	Малат – 7,5	НАДФ – 0,375	9,8
НАДФГДГ	Глутамат – 0,5	НАДФ – 1,65	9,8
НАДГДГ	Глутамат – 8,7	НАД – 8,10	9,8
НАДИЦДГ	Изоцитрат – 5,0	НАД – 5,0	7,8
НАДФИЦДГ	Изоцитрат – 1,375	НАДФ – 0,075	7,4
НАДНЛДГ	Пируват – 0,25	НАДН – 0,005	7,0
НАДНМДГ	Оксалоацетат – 0,5	НАДН – 0,005	7,0
ГР	GSH – 0,5	НАДФН – 0,0025	7,4
НАДФНГДГ	Оксоглутарат – 100	НАДФН – 0,0025	7,4
НАДНГДГ	Оксоглутарат – 100	НАДН – 0,0025	7,0

Примечание: среды с pH 9,0 и 9,8 готовили на Трис-HCl буфере; с pH 7,0, 7,4 и 7,8 – на K⁺, Na⁺-fosфатном буфере.

Методика, по которой проводилось биолюминисцентное определение активности дегидрогеназ, разработана в нашей лаборатории. В приведенной таблице 1 можно посмотреть концентрации субстратов, кофакторов и

показатель рН буфера, которыми мы руководствовались для определения активности дегидрогеназ. К инкубационной смеси объемом 150 мкл, которая содержит определенный субстрат и кофактор, добавили 50 мкл суспензии разрушенных лимфоцитов.

Также стоит отметить, что для определения активности некоторых НАД(Ф)Н-зависимых дегидрогеназ к инкубационной смеси добавляли определенные реагенты. Так АДФ в концентрациях 2,15 и 1,3 мМ добавляли к НАДФИЦДГ и НАДИЦДГ соответственно, NH₄Cl в концентрации 5,0 мМ вносили в пробу с НАДНГДГ и НАДФНГДГ, а ЭДТА в концентрации 0,5 мМ добавили в пробу с ГР. После приготовления исследуемых растворов образцы инкубировали в термостате, температура в котором поддерживается на уровне 37°C. Для ферментативных реакций с восстановлением НАД(Ф) время инкубирования составляет 30 минут, а для реакций с окислением НАД(Ф)Н – 5 минут. Затем к инкубационной смеси добавляли биолюминисцентные реагенты, такие как флавиномононуклеотид (ФМН), концентрация которого равна $1,5 \times 10^{-5}$ М – 50 мкл, 0,0005% миристиновый альдегид – 50 мкл и ферментативная система НАД(Ф)Н: ФМН оксидоредуктаза-люцифераза – 10 мкл. После того, как все реагенты смешали, определение активности ферментов производили с помощью биолюминометра CL3606М (СКТБ “Наука”, Красноярск).

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на 10^4 клеток, где 1 Е=1 мкмоль/мин.

Выборку описывали с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 процентилей (C_{25} и C_{75}). Достоверность различий в динамике РБТЛ определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были получены данные об изменении активности внутриклеточных ферментов в ходе развития пролиферативного ответа лимфоцитов и сделано заключение, о том, что между этими процессами существует взаимосвязь. Изучение клеточного цикла и характеристика его метаболической основы имеет большое значение для понимания функционирования механизма распознавания чужеродных молекул антигена и реакции иммунного ответа.

Нельзя забывать, что активация лимфоцитов приводит к резким сдвигам в клеточном метаболизме для защиты от патогенов и организации действия других иммунных клеток. Установлено, что изменения в метаболизме клеток, усиливают или подавляют специфические функции лимфоцитов.

Таким образом, можно говорить, что оценка клеточного метаболизма лимфоцитов в ходе моделируемых реакций иммунного ответа *in vitro*, может не только расширить наше представление о протекании процессов иммунного ответа, но и служить важным диагностическим критерием, при оценке пролиферативного потенциала исследуемых клеток.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Courtney, A. H. TCR signaling: mechanisms of initiation and propagation / A. H. Courtney, Wan-Lin Lo, A. Weiss // Trends Biochem Sci. – 2018. - №43. – Р. 108–123.
2. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека / Б. В. Пинегин [и др.]. - Москва - 2001. – 176с.
3. Абакушина, Е. В. Метод проточной цитометрии для оценки НК-клеток и их активности / Е. В. Абакушина // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. - №60. – С. 37–44.
4. Бахус, Г. О. Новые подходы к оценке функциональной активности с помощью проточной лазерной цитометрии: дис. канд. биол. наук : 14.00.36 / Бахус Галина Олеговна. – Москва, 2002. – 100 с.
5. Бердюгина, О. В. Функционально-метаболические изменения иммунокомпетентных клеток при туберкулезе легких / О. В. Бердюгина, С. Н. Скорняков, И. Д. Медвинский, А. В. Ершова, В. А. Павлов, К. А. Бердюгин // Уральский медицинский журнал. - 2015. - № 2. - С. 121-127.
6. Куртасова, Л. М. Изучение корреляционных связей иммунофенотипа и показателей активности метаболических ферментов в лимфоцитах крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины / Л. М. Куртасова, Н. А. Шакина, Т. В. Лубнина // Медицинская иммунология. - 2020. - Т. 22, № 1. - С. 165-170.
7. Булыгин, Г. В. Метаболические основы регуляции иммунного ответа / Г. В. Булыгин, Н. И. Камзалакова, А. В. Андрейчиков // СО РАМН. - 1999. — 346 с.
8. Земсков, А. М. Метаболический иммунитет / А. М. Земсков, В. М. Земсков, В. А. Земскова, М. А. Луцкий, В. И. Золоедов // Вестн. ВГУ, Сер. 2. Химия. Биология. Фармация. – 2016. -№ 2. – С. 10-19.

9. Савченко, А. А. Высокочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови человека биолюминесцентным методом / А. А. Савченко, Л. Н. Сунцова // Лабораторное дело. — 1989. — № 11. — С. 23-25.
10. Adam, T., Waickman A.T., Powell J.D. mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function // Immunol. Rev. 2015. V. 249. №1. P. 43-58.
11. Савченко, А. А. Метаболические особенности лимфоцитов крови у больных истинной аллергией и псевдоаллергией / А. А. Савченко, С. В. Смирнова, В. И. Пыцкий // Аллергология и иммунология. – 2002. – Т.3, № 1. – С.180–187.
12. Новицкий, В. В. Показатели апоптоза и пролиферативной активности лимфоцитов у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью к M. Tuberculosis / В. В. Новицкий, О. И. Уразова, О. В. Филиньюк и др. // Мед. иммунология. – 2015. – Т. 14, № 1–2. – С. 119–126.
13. Савченко, А. А. Особенности состояния клеточного и гуморального иммунитета у больных с распространенным гнойным перитонитом / А. А. Савченко, Д. Э. Здзитовецкий, А. Г. Борисов, Н. А. Лузан // Бюл. СО РАМН. - 2012. - № 3. - С. 159-163.
14. Савченко, А. А. Содержание АТФ и активность НАД(Ф)- зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах при иммунодефицит-ассоциированных заболеваниях у пришлых жителей Эвенкии / А. А. Савченко, С. В. Смирнова, А. Г. Борисов // Бюл. СО РАМН. – 2010. – Т. 30, № 3. – С. 33–38.
15. Куртасова, Л. М. Особенности энзиматической активности лимфоцитов крови у детей с инфекцией, вызываемой вирусом эпштейна-барр/ Л. М. Куртасова, А. Р. Шмидт, А. А. Савченко // Журн. мед.-биол. исследований. - 2017. - Т. 5, № 2. - С. 67–73.

16. Sutherland, D. R. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms / D. R. Sutherland, F. Ortiz, G. Quest, A. Illingworth, M. Benko, R. Nayyar, I. Marinov // Cytometry B Clin Cytom. – 2018. - №94. - Р. 1–15.
17. Кудрявцев, И. В. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шести-цветного цитофлуоримерического анализа / И. В. Кудрявцев, А. И. Субботовская // Медицинская иммунология. – 2015. - №17. - С. 19–26.
18. Землякова, З. М. Бласттрансформация лимфоцитов как метод изучения иммунологической реактивности детей, больных ревматизмом / З. М. Землякова, Г. П. Филиппов // Издательство: «Педиатрия» Москва. – 2016. – Т. 56, №4. – С. 12-14.
19. Куртасова, Л. М. Ферментный спектр лимфоцитов периферической крови у больных почечно-клеточным раком до и после хирургического лечения / Л. М. Куртасова, А. А. Савченко, Р. А. Зуков, Т. В. Толмачева // Медицинская иммунология. - 2018. – Т. 20. №3. - С. 391-400.
20. Проточная цитометрия в медицине и биологии. 2-е издание дополненное и расширенное / А. В. Зуруочка, С. В. Хайдуков, И. В. Кудрявцев, В. А. Черешнев. – Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2014. – 576 с.
21. Савченко, А. А. Особенности фенотипа Т-лимфоцитов в динамике послеоперационного периода у больных перитонитом в зависимости от исхода заболевания / А. А. Савченко, А. Г. Борисов, Д. В. Черданцев, О. В. Первова, И. В. Кудрявцев, В. Д. Беленюк // Инфекция и иммунитет. - 2019. - Т. 9, № 1. - С. 115–127.
22. Bektas, A. Human T cell immunosenescence and inflammation in aging. J. Leukoc. / A. Bektas, S.H. Schurman, R. Sen, L. Ferrucci // Biol. – 2017. V. 102. № 4, P. 977–988.
23. Chang, C. H. Emerging concepts in immunotherapy – T cell metabolism as a therapeutic target / C. H. Chang, E. L. Pearce // Nat Immunol. – 2016. - №17. - Р. 364-368.

24. Kim, K. H. Assaying cell cycle status using flow cytometry / K. H. Kim // Curr Protoc Mol Biol. – 2015. – №2. – P. 37-40.
25. Сохоневич, Н. А Фенотипическая характеристика и функциональные особенности Т- и В-клеток иммунной памяти / Н. А. Сохоневич, О. Г. Хазиахматова, К. А. Юрова, В. В. Шуплецова, Л. С. Литвинова // Цитология. – 2015. – Т. 57, № 5. – С. 311-318.
26. Koppenol, W. H. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism / Nat. Rev. Cancer. – 2011. №11. – С. 325–337.
27. Warburg, O. Metabolism of leukocytes / O. Warburg // Z Naturforsch B. -1958. №13. – С. 515–516.
28. Pepple, K. L. Comparison of aqueous and vitreous lymphocyte populations from two rat models of experimental uveitis / K. L. Pepple, L. Wilson, R. N. Van Gelder // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2018. - №59. – С. 2504-2511.
29. Marelli-Berg, F. M. Molecular mechanisms of metabolic reprogramming in proliferating cells: implications for T-cell-mediated immunity / F. M. Marelli-Berg, H. Fu, C. Mauro // Immunology. – 2015. - №136. – С. 363–369.
30. Куртасова, Л. М. Ферментный спектр лимфоцитов периферической крови у больных почечноклеточным раком до и после хирургического лечения / Л. М. Куртасова, А. А. Савченко, Р. А. Зуков, Т.В. Толмачева // Медицинская иммунология. – 2018. - Т. 20, № 3. - С. 391-400.
31. Киселев, О. И. Структурно-метаболические характеристики клеток и их функциональные возможности / О.И. Киселев, И. В. Сергеева, Т. В. Сологуб, Е. П. Тихонова, Г. В. Булыгин / Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2015. - № 20. – С. 52-56.
32. Crowley, L. C., Measuring the DNA Content of Cells in Apoptosis and at Different Cell-Cycle Stages by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry / L. C. Crowley, G. Chojnowski, N. J. Waterhouse // Cold Spring Harb Protoc. – 2016. - №10. – P. 20-25.

33. Obst, R. The Timing of T Cell Priming and Cycling / R. Obst // Front Immunol. – 2015. - №5. – P. 563-564.
34. Кудрявцев, И. В. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии / И. В. Кудрявцев, А. Г. Борисов, И. И. Кробинец, А. А. Савченко, М. К. Серебрякова // Медицинская иммунология. - 2015. - Т. 17, № 6. - С. 525-538.
35. Коваленко, Е. И. Адаптивные свойства натуральных киллеров – лимфоцитов врожденного иммунитета / Е. И. Коваленко, М. А. Стрельцова // Биоорганическая химия. – 2016. – Т. 42, № 6. - С. 649–667.
36. Schmitt, N. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines / N. Schmitt, H. Ueno // Curr. Opin. Immunol. - 2015. - V. 34. - P. 130–136.
37. Соколова, А. С. Оценка кинетики пролиферации фаг-стимулированных *in vitro* лимфоцитов у хронически облученных людей / А.С. Соколова, Ю.Р. Ахмадуллина // Вестн. Совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. – Челябинск, 2016. - Т. 5, №4. – С. 46-49.
38. Donnelly, R. P. Glucose, glycolysis and lymphocyte responses / R. P. Donnelly, D. K. Finlay // Mol. Immunol. – 2015. №8. - P. 513-9.
39. Hu Z. Regulation of T cell immunity by cellular metabolism / Z. Hu, Q. Zou, B. Su // Front Med. – 2018. - №12. P. 463-472.
40. Vignali, P. D. Metabolic Regulation of T Cell Immunity / P. D. Vignali, J. Barbi, F. Pan // Med Biol. – 2017. - №1. – P. 87-130.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Кафедра медицинской биологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
 Е.И. Шишацкая
подпись инициалы, фамилия
«3» 07 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА
06.03.01 – Биология

Тема: «Метаболические механизмы пролиферативной активности
лимфоцитов крови»

Руководитель


подпись, дата

профессор, д.м.н.
должность, ученая степень

Савченко А.А.

Выпускник


Рыбкина 3.07.20
подпись, дата

Рыбкина А.В.

Красноярск 2020