

УДК 577.121.7

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА МЕТАБОЛИЗМ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ

© 2025 г. В. Н. Пономарева<sup>1, 2, \*</sup>, В. В. Власова<sup>1</sup>, Е. В. Сайдакова<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН — филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, 614081, Россия

<sup>2</sup> Пермский государственный национальный исследовательский университет, кафедра микробиологии и иммунологии, Пермь, 614068, Россия

\* E-mail: PonomarievaVN@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.11.2024

После доработки 15.01.2025

Принята к публикации 16.01.2025

Изучение метаболической активности моноклеарных клеток является актуальной задачей биологии и медицины. Проведение длительных исследований часто предполагает хранение образцов в криоконсервированной форме, что позволяет свести к минимуму возможные ошибки и погрешности. Однако эффект низких температур на метаболизм моноклеарных клеток мало изучен. Цель работы — исследовать влияние криоконсервации на показатели гликолиза и окислительного фосфорилирования моноклеарных лейкоцитов. Оценка метаболических параметров с использованием метода фиксации внеклеточных потоков на анализаторе Seahorse XFe96 показала, что в моноклеарных лейкоцитах, прошедших криоконсервацию, происходит значительное изменение скорости окислительного фосфорилирования, что не связано с изменением их субпопуляционного состава. Вместе с тем замораживание и хранение при отрицательных температурах не оказало влияния на скорость протекающего в лейкоцитах гликолиза. Важно, что в размороженных клетках снижалась способность реагировать на митогенную стимуляцию увеличением скорости метаболических процессов. Таким образом, криоконсервация изменяет метаболический профиль моноклеарных лейкоцитов. Для получения достоверных сведений об их метаболической активности предпочтительно использовать свежeweделенные клетки.

**Ключевые слова:** моноклеарные лейкоциты, криоконсервация, метаболизм, гликолиз, окислительное фосфорилирование

**Принятые сокращения:** АФК — активные формы кислорода; ЛПС — липополисахарид; МНК — моноклеарные клетки; ФГА — фитогемагглютинин; AUC (area under the curve) — площадь под кривой; ECAR (extracellular acidification rate) — скорость внеклеточного закисления; OCR (oxygen consumption rate) — скорость потребления кислорода.

DOI: 10.31857/S0041377125010046, EDN: DEXFBF

Функционирование моноклеарных клеток (МНК), в том числе их дифференцировка и сигнализация, неразрывно связаны с метаболизмом (Gaber et al., 2019; Patel et al., 2019; Patil et al., 2019). Метаболические процессы позволяют клетке своевременно удовлетворить свои потребности в энергии и молекулярном биосинтезе. Метаболизм адаптируется к нуждам клетки в зависимости от условий окружающей среды и собственного состояния, например, покоя или активации (Chakraborty et al., 2022). Магистральными биоэнергетическими путями клетки являются гликолиз и окислительное фосфорилирование (Makowski et al., 2020). Эти процессы обеспечивают лейкоциты энергией, кофакторами для ферментативных реакций, а также

разнообразными молекулами-предшественниками для синтеза нуклеотидов, аминокислот и липидов (Нельсон и др., 2014; Gaber et al., 2019). Исследование взаимосвязи между функциональной активностью МНК и их метаболизмом необходимо для разработки новых терапевтических стратегий для лечения широкого спектра заболеваний, включая онкологические и аутоиммунные (Makowski et al., 2020). Поэтому изучение метаболической активности моноклеарных лейкоцитов является актуальной задачей биологии и медицины.

Современным методом оценки клеточного метаболизма является регистрация внеклеточных потоков с использованием анализатора Seahorse XF. Этот метод позволяет провести одновременное

измерение скорости внеклеточного закисления (показателя гликолиза ECAR — extracellular acidification rate) и потребления кислорода (показателя окислительного фосфорилирования OCR — oxygen consumption rate) (Mas-Bargues et al., 2022). Стоит отметить, что достоверность результатов такого исследования повышается при одновременном изучении образцов из нескольких групп сравнения. Это становится возможным благодаря накоплению биоматериала в криоконсервированной форме (Anderson et al., 2019; Haider et al., 2022). Криоконсервация большой партии клеток в определенный момент времени позволяет свести к минимуму погрешности в исследовании (Martikainen, Roponen, 2020). Однако влияние криоконсервации и хранения при отрицательных температурах на метаболизм МНК мало изучено.

Цель нашей работы заключалась в изучении влияния криоконсервации на показатели гликолиза и окислительного фосфорилирования мононуклеарных лейкоцитов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Участники исследования.** Обследована группа относительно здоровых доноров периферической крови ( $n = 3$ ). Средний возраст обследованных составлял  $30 \pm 2.6$  лет.

**Выделение мононуклеарных лейкоцитов.** Кровь в объеме 36 мл забирали из локтевой вены в пробирки, обработанные этилендиаминтетрауксусной кислотой. Мононуклеарные клетки выделяли стандартным методом путем центрифугирования периферической крови в градиенте плотности диаколлы (1.077 г/мл; «Диа-М», Россия). Полученные образцы отмывали раствором фосфатно-солевого буфера Дульбекко (DPBS; Gibco, США) и помещали в среду, содержащую 90 % инактивированной теплом эмбриональной телячьей сыворотки (Biowest, Колумбия) и 10 % диметилсульфоксида (AppliChem, Германия). Выделенные клетки разделяли на аликвоты и подвергали программируемому замораживанию в коммерческих штативах CoolCell (Corning, США) с регулируемой скоростью снижения температуры (на  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ ) в морозильной камере при  $-80^\circ\text{C}$ . Через неделю образцы переносили в жидкий азот ( $-196^\circ\text{C}$ ). Для проведения исследования клетки размораживали при  $37^\circ\text{C}$  и ресуспендировали в среде XF RPMI Medium (Agilent Technologies, США), содержащей 10 мМ глюкозы (Sigma, США), 2 мМ глутамина

(«Диа-М», Россия) и 1 мМ пирувата натрия (Sigma, США). Затем вносили по 40 мкл ресуспендированных клеток, среднее содержание которых было равно 200 тыс., в лунки микропланшета Seahorse XF (Agilent Technologies, США), предварительно обработанные поли-D-лизином (Sigma, США), по 16 лунок для каждого донора. Для образования монослоя клеток планшет центрифугировали в течение 4 мин при 200 g (режим разгона (ACCEL) — 4, режим торможения (DECEL) — 1). После этого доводили объем до 175 мкл средой XF RPMI Medium и помещали планшет на 60 мин в термостат при  $37^\circ\text{C}$ .

**Анализ внеклеточных потоков.** Для определения показателей ECAR и OCR планшеты с клетками помещали в анализатор Seahorse XFe96 (Agilent Technologies, США). Измерения проводили каждые 8 мин в течение 1.5 ч. Первые 20—25 мин регистрировали показатели на базальном уровне, затем при помощи заряженного сенсорного картриджа проводили инъекцию фитогемагглютинина (ФГА в конечной концентрации 15 мкг/мл; Serva, Германия) в 8 лунок для клеток каждого донора (технические повторности). В контрольные 8 лунок вместо стимулятора вносили соответствующий объем питательной среды. Данные технических повторностей усредняли. Величину OCR в стимулированных и нестимулированных МНК рассчитывали как суммарную в течение всего времени измерения, т. е. представляли полученные данные в виде площади под кривой (AUC — area under the curve, усл. ед.). Скорость закисления среды рассчитывали аналогичным образом.

Исследование проводили в течение года в шести временных точках: свежевыделенные клетки (до заморозки), через неделю после программируемого замораживания до  $-80^\circ\text{C}$  и через 1, 5, 9 и 12 месяцев хранения в жидком азоте ( $-196^\circ\text{C}$ ).

**Определение субпопуляционного состава лейкоцитов.** Перед замораживанием и после разморозки численность всех мононуклеарных лейкоцитов периферической крови и их субпопуляционный состав определяли на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Субпопуляционный состав лейкоцитов устанавливали при помощи коммерческого набора BD Simultest™ IMK-Lymphocyte (BD Biosciences, США) согласно инструкции производителя. Антитела, специфичные к молекулам CD45, CD14, CD3, CD4, CD8, CD19, CD16 и CD56, позволили определить следующие МНК: В-лимфоциты ( $\text{CD}19^+$ ), Т-лимфоциты

(CD3<sup>+</sup>), Т-хелперы (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), цитотоксические Т-клетки (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) и естественные киллерные клетки (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> и/или CD56<sup>+</sup>).

**Статистическая обработка результатов.** Данные на гистограммах представлены в виде средних и стандартных ошибок средних. Достоверность различий между группами устанавливали с использованием однофакторного дисперсионного анализа; множественные сравнения между группами проводили с помощью критерия Тьюки. Различия считали статистически значимыми при  $P < 0.05$ . Проведение статистических расчетов осуществляли при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе установлено, что субпопуляционный состав МНК не изменяется при криоконсервировании или хранении при отрицательных температурах (табл. 1). Статистически незначимые ( $P > 0.05$ ) флуктуации относительного количества МНК отмечены среди моноцитов и субпопуляций лимфоцитов, в т. ч. В- и Т-клеток, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллерных клеток.

Выявлено, что базальная величина OCR у МНК зависит от продолжительности их хранения при отрицательных температурах (рис. 1а). По сравнению со свежесыведенными клетками в лейкоцитах,

хранившихся неделю в низкотемпературной морозильной камере при  $-80^{\circ}\text{C}$ , базальная OCR возросла в 1.6 раз ( $P < 0.01$ ). Еще более значительный прирост отмечен в клетках, хранившихся в течение 1 мес в жидком азоте: различие со свежесыведенными МНК составило 2.5 раза ( $P < 0.001$ ). Однако более длительное хранение клеток при отрицательных температурах сопровождается снижением скорости поглощения кислорода, а следовательно, и окислительного фосфорилирования. По сравнению с клетками, содержащимися в течение 1 мес в жидком азоте, в лейкоцитах, хранившихся в течение 5 мес при тех же условиях, базальная OCR уменьшилась в 1.8 раза ( $P < 0.01$ ). В клетках, подвергавшихся криоконсервации в жидком азоте в течение одного года, это различие составило 2.15 раза ( $P < 0.001$ ). Примечательно, что различие последних со свежесыведенными клетками было статистически незначимым ( $P > 0.05$ ).

Базальная скорость закисления среды МНК не изменялась при замораживании (размораживании) образцов в течение первого месяца (рис. 1б). На пятый месяц хранения образцов скорость закисления среды возросла в 1.3 раза по сравнению со свежесыведенными клетками и далее оставалась на одном уровне. Однако все различия между временными точками не достигали уровня статистической значимости ( $P > 0.05$ ).

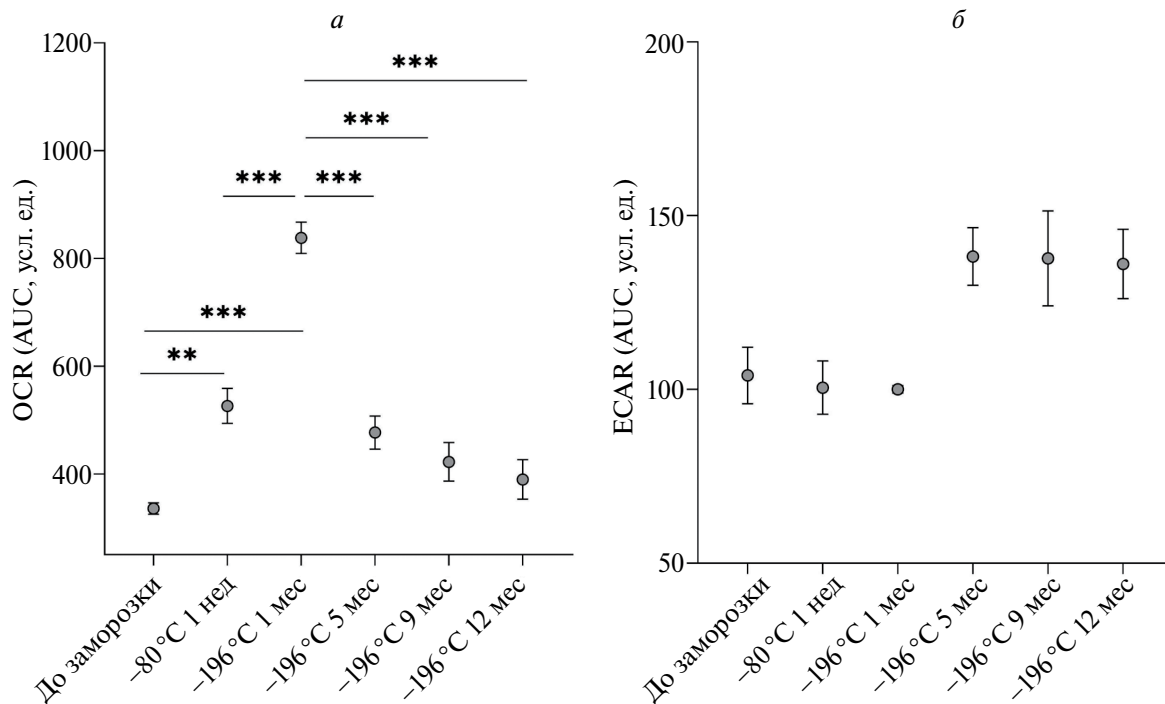
Известно, что стимуляция МНК митогенами запускает их пролиферацию, что реализуется

**Таблица 1.** Субпопуляционный состав мононуклеарных лейкоцитов при криоконсервировании и хранении при отрицательных температурах

| Популяция                                  | Доля популяции, % |                                 |                                 |                                 |                                 |
|--------------------------------------------|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                                            | До заморозки      | Криоконсервированные клетки     |                                 |                                 |                                 |
|                                            |                   | $-80^{\circ}\text{C}$<br>1 нед. | $-196^{\circ}\text{C}$<br>1 мес | $-196^{\circ}\text{C}$<br>5 мес | $-196^{\circ}\text{C}$<br>9 мес |
|                                            | (1)               | (2)                             | (3)                             | (4)                             | (5)                             |
| Моноциты в пуле лейкоцитов                 | $9.71 \pm 0.52$   | $18.00 \pm 1.56$                | $18.96 \pm 2.05$                | $21.63 \pm 1.31$                | $17.46 \pm 2.14$                |
| Лимфоциты в пуле лейкоцитов                | $90.11 \pm 0.61$  | $57.89 \pm 2.62$                | $67.54 \pm 0.88$                | $66.72 \pm 0.84$                | $74.41 \pm 3.22$                |
| В-клетки в пуле лимфоцитов                 | $7.58 \pm 1.22$   | $0.51 \pm 0.27$                 | $4.20 \pm 1.17$                 | $3.49 \pm 1.18$                 | $5.38 \pm 0.92$                 |
| Т-клетки в пуле лимфоцитов                 | $75.59 \pm 1.99$  | $81.27 \pm 1.76$                | $70.35 \pm 6.41$                | $80.42 \pm 1.09$                | $82.03 \pm 1.40$                |
| Т-хелперы в пуле лимфоцитов                | $45.54 \pm 2.31$  | $45.24 \pm 9.89$                | $51.49 \pm 3.87$                | $51.75 \pm 4.14$                | $52.83 \pm 3.66$                |
| Цитотоксические Т-клетки в пуле лимфоцитов | $30.60 \pm 3.58$  | $26.38 \pm 5.19$                | $29.82 \pm 2.51$                | $30.64 \pm 2.00$                | $29.77 \pm 2.69$                |
| ЕКК в пуле лимфоцитов                      | $11.06 \pm 1.29$  | $10.07 \pm 2.10$                | $11.74 \pm 0.30$                | $12.37 \pm 0.75$                | $11.38 \pm 0.65$                |

Указаны средние значения и их стандартные ошибки. ЕКК — естественные киллерные клетки.

Статистически значимых различий между группами сравнения (1–5) не обнаружено (однофакторный дисперсионный анализ с критерием Тьюки).



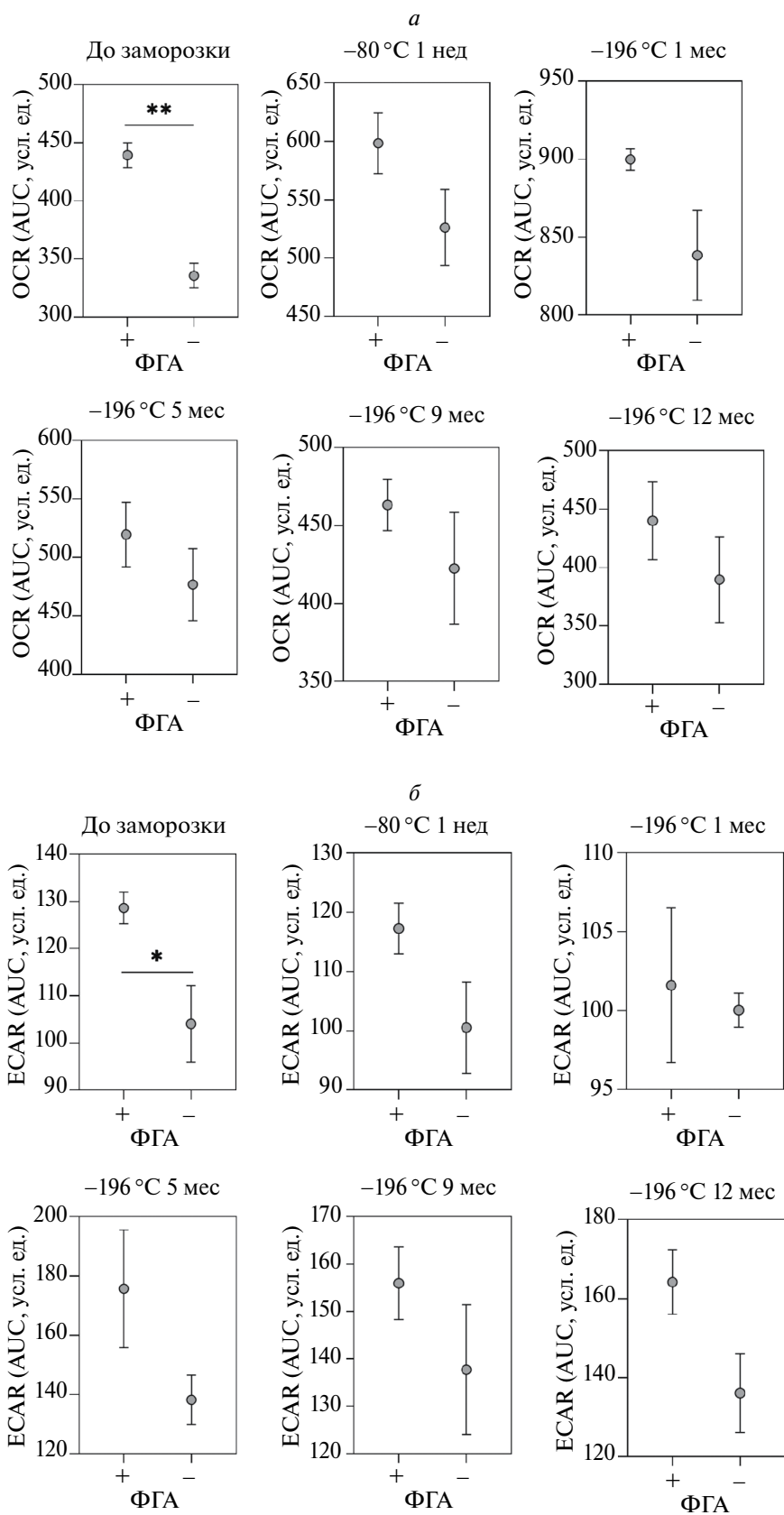
**Рис. 1.** Изменение базальных скоростей потребления кислорода (OCR, *а*) и закисления среды (ECAR, *б*) лейкоцитами до заморозки и после криоконсервации. Данные представлены в виде площади под кривой (AUC, усл. ед.). Указаны средние и стандартные ошибки средних. Для сравнения групп использовали однофакторный дисперсионный анализ; множественные сравнения между группами проводили с помощью критерия Тьюки. *а*: (\*\*) —  $P < 0.01$ ; (\*\*\*) —  $P < 0.001$ ; *б* — достоверных различий не обнаружено.

благодаря увеличению интенсивности метаболических процессов (Lomsadze et al., 2011; Савилова и др., 2013; Desdin-Mico et al., 2018). Действительно, в нашей работе показано, что кратковременная стимуляция клеток ФГА увеличивает скорость окислительного фосфорилирования (рис. 2*а*) и гликолиза (рис. 2*б*) вне зависимости от продолжительности хранения клеток при отрицательных температурах. Важно, что статистически значимые различия скоростей метаболических процессов между стимулированными и покоящимися лейкоцитами были отмечены нами только при исследовании свежевыделенных клеток.

Следует отметить, что в литературе отсутствуют сведения о том, как изменяются показатели гликолиза и окислительного фосфорилирования в мононуклеарных лейкоцитах после криоконсервации. Вместе с тем ряд проведенных исследователями функциональных тестов косвенно подтверждает полученные нами результаты. Было показано (Martikainen et al., 2020), что по сравнению со свежевыделенными клетками размороженные после криоконсервации МНК продуцируют меньше цитокинов в ответ на стимуляцию полиинозиновой:

полицитидиловой кислотой [POLY(I: C)] и липополисахаридом (ЛПС). Авторы предполагают, что это свидетельствует о снижении чувствительности размороженных клеток к митогенным стимулам. В свою очередь другие авторы (Haider et al., 2022) установили, что по сравнению со свежевыделенными клетками мононуклеарные лейкоциты, прошедшие процедуру заморозки, вырабатывают меньше интерлейкина-1 $\alpha$  и интерлейкина-6 в ответ на стимуляцию ЛПС. Примечательно, что в этих же условиях размороженные клетки экспрессируют больше интерферона- $\gamma$ , но столько же фактора некроза опухоли  $\alpha$ , сколько свежевыделенные лейкоциты. Так как способность клеток продуцировать цитокины зависит от их метаболической пластичности (Patil et al., 2019), можно предположить, что особенности секреции цитокинов связаны с изменениями в обменных процессах клеток при их криоконсервации и разморозке.

Основными органеллами, участвующими в клеточном метаболизме, являются митохондрии. Они также играют ключевую роль в производстве энергии, вырабатывают большую часть активных форм кислорода (АФК) и отвечают за гомеостаз кальция



**Рис. 2.** Скорости окислительного фосфорилирования (OCR, *a*) и гликолиза (ECAR, *б*) в нестимулированных (–) и стимулированных (+) фитогемагглютинином (ФГА) мононуклеарных лейкоцитах. Данные представлены в виде площади под кривой (AUC). Указаны средние и стандартные ошибки средних. Для сравнения двух групп использовали *t*-тест Стьюдента. (\*) —  $P < 0.05$ ; (\*\*) —  $P < 0.01$ .

(Gualtieri et al., 2021). Дисфункция митохондрий, опосредованная окислительным стрессом в результате повышения уровня АФК при криоконсервации и разморозке, может привести к метаболическим изменениям (Starkov, 2008; Gualtieri et al., 2021). Примером таких изменений является снижение эффективности окислительного фосфорилирования из-за дисфункции комплексов электрон-транспортной цепи при окислительном стрессе (Gualtieri et al., 2021). На примере криоконсервированных репродуктивных клеток (Gualtieri et al., 2021) было установлено, что митохондриальная дисфункция может быть обусловлена увеличением концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , которое вызывает рост проницаемости мембраны органеллы и ведет к потере ее трансмембранного потенциала, снижению продукции АТФ, повышению уровня АФК и, как следствие, снижению целостности плазматической мембраны. Исследование клеток костного мозга (Ващенко и др., 2015) подтвердило, что вследствие замораживания—оттаивания в клетках значительно уменьшается содержание АТФ. Помимо этого, криоконсервация приводит к образованию больших количеств пировиноградной кислоты — продукта реакции гликолиза, и изменению изоферментного состава лактатдегидрогеназы. Представленные данные свидетельствуют о снижении активности метаболических процессов, в частности окислительного фосфорилирования и гликолиза, хранившихся при отрицательных температурах клеток.

Следует отметить, что замораживание и размораживание биологических образцов может запустить процессы клеточной смерти. Гибель клеток (их апоптоз или некроз) может быть опосредована образованием не только большого количества АФК, но и кристаллов льда, физически разрушающих клеточную мембрану (Len et al., 2019; Fu et al., 2022). Криопротектирующие агенты, такие как диметилсульфоксид, препятствуют формированию кристаллов, но вызывают образование пор в мембране клеток, изменяют характер распределения фосфолипидов (Бабийчук и др., 2013; Кит и др., 2023) и перепрограммируют метаболизм в сторону восстановления мембран. Таким образом, не только эффекты криоконсервации на иммунные клетки, но и влияние на них криопротектирующих агентов требует дальнейшего тщательного изучения.

Полученные нами данные о метаболической активности МНК свидетельствуют о том, что при проведении исследований и анализе результатов необходимо учитывать последствия хранения об-

разцов при отрицательной температуре и длительность этого хранения. Игнорирование влияния криоконсервации может привести к ошибочным выводам при подведении итогов исследования. Однако важно отметить, что мы учитывали влияние криоконсервации на метаболизм общего пула мононуклеарных лейкоцитов без учета показателей отдельных популяций лимфоцитов и моноцитов. Мы также оценивали метаболические показатели клеток лишь в течение одного года после получения биологического материала. Возможность использования МНК, хранившихся при отрицательной температуре более продолжительное время, требует дальнейшего изучения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в нашей работе показано, что процесс замораживания—оттаивания оказывает значительное влияние на метаболические показатели мононуклеарных клеток периферической крови. В частности, базальная величина OCR у МНК варьирует в зависимости от продолжительности их хранения при отрицательных температурах. Отмечено также негативное влияние криоконсервации на метаболическую пластичность: выявлено снижение способности размороженных клеток отвечать на митогенную стимуляцию увеличением интенсивности гликолиза и окислительного фосфорилирования. Вследствие этого можно заключить, что для получения достоверных сведений о метаболической активности мононуклеарных лейкоцитов необходимо, по возможности, использовать свежeweделенные клетки. В противном случае следует принимать во внимание эффект криоконсервации.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания «Исследование функциональной активности лейкоцитов и клеток опухолевых линий в условиях хронических инфекций и под влиянием соединений химического и биологического происхождения», номер государственной регистрации темы: 124021900006-5.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все стадии исследования соответствуют законодательству Российской Федерации, международным этическим нормам и нормативным документам

исследовательских организаций. План исследования одобрен локальным этическим комитетом Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (протокол № 24/1 от 04.07.2023). От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бабичук Л. А., Михайлова О. А., Zubov P. M., Ryazantsev V. V.* 2013. Оценка стадий апоптоза и распределения фосфатидилсерина в мембране ядросодержащих клеток пуповинной и периферической крови при различных технологиях криоконсервации. *Гены и клетки*. Т. 8. № 4. С. 50. (*Babichuk L. A., Mykhailova O. O., Zubov P. M., Ryazantsev V. V.* 2013. Evaluation of apoptosis stages and posphatidylserine distribution in membrane of cord and peripheral blood nucleated cells at various cryopreservation protocols. *Genes and Cells*. V. 8. P. 50.) <https://doi.org/10.23868/gc121610>
- Ващенко В. И., Чухловин А. Б., Петренко Г. И., Вильянинов В. Н., Багаутдинов Ш. М.* 2015. Действие факторов замораживания на изменения внутриклеточного метаболизма при криоконсервации костного мозга человека. *Вестник МАХ*. Т. 4. С. 91. (*Vashchenko V. I., Chuklovin A. B., Petrenko G. I., Vilyaninov V. N., Bagautdinov Sh. M.* 2015. Impact of preserving agents upon on intracellular metabolic changes during cryoconservation of human bone marrow. *J. IAR*. V. 4. P. 91.)
- Кит О. И., Гненная Н. В., Филиппова С. Ю., Чембарова Т. В., Лысенко И. Б., Новикова И. А., Розенко Л. Я., Димитриади С. Н., Шалашная Е. В., Ишонина О. Г.* 2023. Криоконсервация гемопоэтических стволовых клеток периферической крови в трансплантологии: современное состояние и перспективы. *Кардиоваск. терапия и профилактика*. Т. 22. № 11. С. 124. (*Kit O. I., Gnennaya N. V., Filippova S. Yu., Chembarova T. V., Lysenko I. B., Novikova I. A., Rozenko L. Ya., Dimitriadi S. N., Shalashnaya E. V., Ishonina O. G.* 2023. Cryostorage of peripheral blood hematopoietic stem cells in transplantology: current status and prospects. *Cardiovascular Ther. Prevention*. V. 22. P. 124.) <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2023-3691>
- Нельсон Д., Кокс М.* 2014. Основы биохимии Ленинджера. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 636 с. (*Nelson D. L., Cox M. M.* 2014. *Lehninger principles of biochemistry*. М.: BINOM. Laboratory of knowledge. 636 p.)
- Савилова А. М., Чулкина М. М., Алексеев Л. П.* 2013. Сравнительное исследование экспрессии мРНК интерлейкина-2 и рецептора интерлейкина-2α в лимфоцитах, активированных ФГА и КонА. *Иммунология*. Т. 34. № 2. С. 76. (*Savilova A. M., Chulкина M. M., Alexeev L. P.* 2013. Comparative investigation of interleukin-2 and interleukin-2 receptor alpha mRNA expression in lymphocytes activated by PHA or ConA. *Immunol*. V. 34. P. 76.)
- Anderson J., Toh Z. Q., Reitsma A., Do L. A. H., Nathanielsz J., Licciardi P. V.* 2019. Effect of peripheral blood mononuclear cell cryopreservation on innate and adaptive immune responses. *J. Immunol. Methods*. V. 465. P. 61. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.11.006>
- Chakraborty S., Khamaru P., Bhattacharyya A.* 2022. Regulation of immune cell metabolism in health and disease: Special focus on T and B cell subsets. *Cell Biol. Int.* V. 46. P. 1729. <https://doi.org/10.1002/cbin.11867>
- Desdin-Mico G., Soto-Herederо G., Mittelbrunn M.* 2018. Mitochondrial activity in T cells. *Mitochondrion*. V. 41. P. 51. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.10.006>
- Fu Y., Dang W., He X., Xu F., Huang H.* 2022. Biomolecular pathways of cryoinjuries in low-temperature storage for mammalian specimens. *Bioengineering (Basel)*. V. 9. P. 545. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9100545>
- Gaber T., Chen Y., Krauss P. L., Buttgerit F.* 2019. Metabolism of T Lymphocytes in health and disease. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* V. 342. P. 95. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.06.002>
- Gualtieri R., Kalthur G., Barbato V., Di Nardo M., Adiga S. K., Talevi R.* 2021. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress caused by cryopreservation in reproductive cells. *Antioxidants (Basel)*. V. 10. Art. ID: 337. <https://doi.org/10.3390/antiox10030337>
- Haider P., Hoberstorfer T., Salzmann M., Fischer M. B., Speidl W. S., Wojta J., Hohensinner P. J.* 2022. Quantitative and functional assessment of the influence of routinely used cryopreservation media on mononuclear leukocytes for medical research. *Int. J. Mol. Sci.* V. 23. Art. ID: 1881. <https://doi.org/10.3390/ijms23031881>
- Len J. S., Koh W. S. D., Tan S. X.* 2019. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. *Biosci. Rep.* V. 39. Art. ID: BSR20191601. <https://doi.org/10.1042/BSR20191601>
- Lomsadze G., Gogebashvili N., Erukidze M., Machavariani M., Intskirveli N., Sanikidze T.* 2011. Alteration in viability and proliferation activity of mitogen stimulated Jurkat cells. *Georgian Med. News*. V. 9. P. 50.

- Makowski L., Chaib M., Rathmell J. C.* 2020. Immunometabolism: from basic mechanisms to translation. *Immunol. Rev.* V. 295. P. 5.  
<https://doi.org/10.1111/imr.12858>
- Martikainen M. V., Roponen M.* 2020. Cryopreservation affected the levels of immune responses of PBMCs and antigen-presenting cells. *Toxicol. In Vitro.* V. 67. Art. ID: 104918.  
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104918>
- Mas-Bargues C., Garcia-Dominguez E., Borras C.* 2022. Recent approaches to determine static and dynamic redox state-related parameters. *Antioxidants (Basel).* V. 11. Art. ID: 864.  
<https://doi.org/10.3390/antiox11050864>
- Patel C. H., Leone R. D., Horton M. R., Powell J. D.* 2019. Targeting metabolism to regulate immune responses in autoimmunity and cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* V. 18. P. 669.  
<https://doi.org/10.1038/s41573-019-0032-5>
- Patil N. K., Bohannon J. K., Hernandez A., Patil T. K., Sherwood E. R.* 2019. Regulation of leukocyte function by citric acid cycle intermediates. *J. Leukoc. Biol.* V. 106. P. 105.  
<https://doi.org/10.1002/JLB.3MIR1118-415R>
- Starkov A. A.* 2008. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* V. 1147. P. 37.  
<https://doi.org/10.1196/annals.1427.015>

## ANALYSIS OF CRYOPRESERVATION IMPACT ON MONONUCLEAR LEUKOCYTE METABOLISM

V. N. Ponomareva<sup>a, b, \*</sup>, V. V. Vlasova<sup>a</sup>, E. V. Saidakova<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS — Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (Goleva str. 13, Perm, 614081, Russia)*

<sup>b</sup> *Perm State University, Department of Microbiology and Immunology, Perm, 614006, Russia*

\*e-mail: PonomarevaVN@yandex.ru

Studying the metabolic activity of mononuclear cells (MNCs) is crucial in biology and medicine. Cryopreservation is commonly used to store samples for long-term research, which helps minimize errors. However, the impact of low temperatures on MNCs metabolism remains understudied. The aim of this study was to investigate the effects of cryopreservation on glycolysis and oxidative phosphorylation in MNCs. Using the Seahorse XFe96 analyzer, we measured the metabolic parameters of cryopreserved MNCs via extracellular flux analysis. The results showed a significant decrease in the rate of oxidative phosphorylation in cryopreserved MNCs, without changes in MNC subset composition. Importantly, cryopreservation did not impact the rate of glycolysis. However, thawed cells exhibited reduced ability to increase metabolic rates in response to mitogenic stimulation. In conclusion, cryopreservation alters the metabolic profile of MNCs. To obtain reliable data on metabolic activity, the use of freshly isolated cells is preferable.

**Keywords:** mononuclear leukocytes, cryopreservation, metabolism, glycolysis, oxidative phosphorylation