Российский иммунологический журнал
2025, Т. 28, № 3, стр. 573-578

Краткие сообщения
Short communications

Russian Journal of Immunology / Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal
2025, Vol. 28, № 3, pp. 573-578

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ОДНОВРЕМЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ГЛИКОЛИЗА И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-НАБОРОВ SEAHORSE XF

Пономарева В.Н., Власова В.В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия
ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Резюме. Метаболизм играет ключевую роль в поддержании пролиферации и функций иммунных клеток. Множество ферментативных реакций, главными из которых являются гликолиз и окислительное фосфорилирование, позволяет клеткам производить энергию, а также необходимые компоненты для синтеза белков, липидов и нуклеотидов. Современным подходом в изучении процессов, связанных с метаболизмом клетки, является использование анализатора Seahorse XF, который в реальном времени измеряет уровень внеклеточного закисления и потребления кислорода. Это позволяет получить точную информацию о динамике гликолиза и окислительного фосфорилирования в исследуемых клетках. Для оценки этих параметров применяются тест-наборы Glycolytic Rate Assay Kit и Cell Mito Stress Test Kit, часть компонентов которых идентична. Тем не менее возможность одновременного использования компонентов этих тестов для исследования нескольких метаболических путей не предусмотрена, что приводит к увеличению трудоемкости и стоимости комплексных исследований, а также к повышенным требованиям к количеству биоматериала и риску ошибок при обработке данных. Цель работы – оценка возможности одновременного исследования гликолиза и окислительного фосфорилирования с использованием тест-наборов Seahorse XF. Были использованы три варианта тестов: 1) Glycolytic Rate Assay; 2) Cell Mito Stress Test; 3) комбинированный тест, подразумевающий последовательное внесение растворов ингибиторов из оригинальных тестов. Показано, что объединение тестов не влияет на фиксируемые на базальном уровне показатели гликолиза и окислительного фосфорилирования. Другие параметры, такие как максимальная скорость гликолиза и окислительного фосфорилирования, компенсаторный гликолиз и резервная дыхательная емкость митохондрий, в совместном исследовании также были сопоставимы со значениями отдельных тестов. Таким образом, совместное применение компонентов тест-наборов Glycolytic Rate Assay Kit и Cell Mito Stress Test Kit дает возможность одновременно изучать широкий диапазон метаболических показателей иммунных клеток, от базальных значений гликолитической и дыхательной активности

Адрес для переписки:
Пономарева Валерия Николаевна
Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (324) 280-75-60.
E-mail: ponomarievaVN@yandex.ru

Address for correspondence:
Valeria N. Ponomareva
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (324) 280-75-60.
E-mail: ponomarievaVN@yandex.ru

Образец цитирования:
В.Н. Пономарева, В.В. Власова «Оценка возможности одновременного исследования гликолиза и окислительного фосфорилирования с использованием тест-наборов Seahorse XF» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 573-578. doi: 10.46235/1028-7221-17152-AFO

© Пономарева В.Н., Власова В.В., 2025
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:
V.N. Ponomareva, V.V. Vlasova “Assessing feasibility of simultaneous evaluation of glycolysis and oxidative phosphorylation using Seahorse XF test kits”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 573-578. doi: 10.46235/1028-7221-17152-AFO

© Ponomareva V.N., Vlasova V.V., 2025
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17152-AFO

до максимальных показателей и резервной емкости гликолиза и окислительного фосфорилирования. Это не приводит к потере качества получаемого результата, однако уменьшает количество необходимого биологического материала и погрешность при его обработке. Использование комбинированного подхода создаст возможность для глубокого изучения метаболических аспектов, связанных с активацией и пролиферацией как иммунных, так и опухолевых клеток.

Ключевые слова: иммунные клетки, метаболизм, гликолиз, окислительное фосфорилирование, митохондрии, анализатор Seahorse XF

ASSESSING FEASIBILITY OF SIMULTANEOUS EVALUATION OF GLYCOLYSIS AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION USING SEAHORSE XF TEST KITS

Ponomareva V.N., Vlasova V.V.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation
Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Abstract. Metabolism is essential for proliferation and function of immune cells. Many enzymatic processes, primarily glycolysis and oxidative phosphorylation (OXPHOS), enable energy production and generate intermediates critical for synthesizing proteins, lipids, and nucleotides. Modern metabolic studies increasingly employ the Seahorse XF analyzer which measures extracellular acidification and oxygen consumption in real time, providing dynamic insights into glycolytic and OXPHOS rates. To assess these parameters, researchers typically use the Glycolytic Rate Assay Kit and Cell Mito Stress Test Kit. While these kits share some components, their simultaneous use for multi-pathway analysis is not standardized, resulting in increased labor, costs and sample requirements, as well as higher risks of data processing errors. The aim of this study was to evaluate the feasibility of combining these kits in order to measure glycolysis and OXPHOS in simultaneous mode using the Seahorse XF assay kits. Three experimental approaches were tested: 1) Glycolytic Rate Assay; 2) Cell Mito Stress Test; 3) combined protocol involving sequential addition of inhibitor solutions from both kits. Our experiments have shown that combining the tests does not affect the baseline measurements of glycolysis and OXPHOS. Other parameters, such as the maximum glycolytic and respiration rates, compensatory glycolysis, and reserved respiratory capacity, were also comparable to individual assay results in combined analyses. When combining the reagent components from Glycolytic Rate Assay Kit and Cell Mito Stress Test Kit, one may perform simultaneous analysis of a wide range of metabolic parameters in immune cells, ranging from baseline glycolysis and OXPHOS values to its peak values, as well as reserve glycolysis and OXPHOS capacities. This approach provides data quality while reducing the required sample material and minimizing processing errors. The use of a combined protocol creates an opportunity for in-depth studies of metabolic aspects of immune cell activation and proliferation as well as tumor cell biology.

Keywords: immune cells, metabolism, glycolysis, oxidative phosphorylation, mitochondria, Seahorse XF analyzer

Работа выполнена в рамках государственного задания № 124021900006-5. В работе использовано оборудование ЦКП «Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН.

Введение

Метаболизм поддерживает функциональную активность и пролиферацию всех клеток организма, в том числе клеток иммунной системы [8]. Он представляет собой комплекс ферментативных реакций, объединенных в различные обменные процессы, такие как гликолиз, цикл трикарбоновых кислот, окислительное фосфорилирование, пентозофосфатный цикл, цикл метионина и многие другие [6]. Эти в основном взаимозависимые метаболические пути позволяют клеткам производить энергию, а также компоненты для синтеза белков, липидов и нуклеотидов, необходимые для эффективного функционирования иммунных клеток. При этом магистральными биоэнергетическими путями иммуноцитов являются гликолиз и окислительное фосфорилирование.

Для анализа показателей гликолиза и окислительного фосфорилирования разработаны различные методы [1, 5, 7]. Среди них новейшим является детекция внеклеточных потоков с использованием анализатора Seahorse XF (Agilent Technologies, США). Данный прибор способен в режиме реального времени оценивать уровень внеклеточного закисления (*англ.* extracellular acidification rate, ECAR) и потребления кислорода (*англ.* oxygen consumption rate, OCR) – показатели, отражающие интенсивность гликолиза и окислительного фосфорилирования соответственно.

Для исследования гликолиза на анализаторе Seahorse XF производителем разработан специальный тест-набор Glycolytic Rate Assay Kit (Agilent Technologies, США) [4]. В его состав входят ротенон (Rot), антимицин A (AA) и 2-дезокси-D-глюкоза (2-DG). В ходе исследования анализатор Seahorse XF фиксирует базальные показатели ECAR, после чего автоматически вносит к клеткам раствор, содержащий смесь Rot/AA – ингибиторов комплексов I и III электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий. Эти вещества подавляют митохондриальное дыхание, что обычно приводит к увеличению скорости гликолиза до максимально возможных для исследуемых клеток значений. Затем к клеткам вносится аналог глюкозы 2-DG, который ограничивает скорость гликолиза до минимальных значений путем конкурентного связывания с гексокиназой. Разница между максимальными и минимальными показателями закисления среды отражает гликолитический потенциал клеток.

Для исследования окислительного фосфорилирования на анализаторе Seahorse XF производителем также разработан тест-набор Cell Mito Stress Test Kit (Agilent Technologies, США) [4]. В его состав входят олигомицин, карбонилцианид-4 (трифторметокси) фенилгидразон (FCCP) и смесь Rot/AA. В процессе исследования анализатор Seahorse XF фиксирует показатель OCR на базальном уровне, после чего автоматически вносит к клеткам ингибитор АТФ-синтазы – олигомицин. В его присутствии интенсивность дыхания, сопряженного с синтезом АТФ, снижается, а скорость потребления кислорода падает. Последующее добавление протонофора FCCP приводит к утечке протонов и снижению трансмембранного потенциала митохондрий, в результате чего потребление кислорода усиливается до максимально возможного для этих клеток значений. На последнем этапе смесь ингибиторов Rot/AA угнетает работу ЭТЦ. Такое исследование позволяет получить информацию не только об активности окислительного фосфорилирования, но и о резервной дыхательной емкости клеток.

Хотя некоторые компоненты двух наборов идентичны друг другу, их комбинирование для единовременного исследования нескольких метаболических путей не предусмотрено, что увеличивает трудоемкость и стоимость разностороннего исследования, повышает требования к количеству биоматериала и вероятность ошибки при его обработке. **Цель работы** – оценить возможность одновременного исследования гликолиза и окислительного фосфорилирования с использованием тест-наборов Seahorse XF.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие здоровые добровольные доноры крови (n = 4) в возрасте 25-32 лет. Были использованы три варианта тестов: 1) Glycolytic Rate Assay; 2) Cell Mito Stress Test; 3) комбинированный тест, подразумевающий последовательное внесение 4 растворов ингибиторов: олигомицина, FCCP, Rot/AA и 2-DG.

Кровь в объеме до 36 мл забирали из локтевой вены в пробирки, обработанные этилендиаминтетрауксусной кислотой (Guangzhou Improve Medical Instruments Co., Ltd, Китай). Мононуклеарные клетки выделяли с использованием стандартного протокола путем центрифугирования периферической крови в градиенте плотности Диаколла (1,077 г/мл, ООО «Диаэм», Россия) и отмывания полученных образцов раствором фосфатно-солевого буфера Дульбекко (DPBS; Gibco, США). Для проведения исследования клетки ресуспендировали в среде XF RPMI Medium (Agilent Technologies, США), содержащей 10 мМ глюкозы (Sigma, США), 2 мМ глутамина (ООО «Диаэм», Россия) и 1 мМ пирувата натрия (Sigma, США). Затем вносили по 40 мкл (200 тыс.) ресуспендированных клеток в лунки микропланшета Seahorse XF (Agilent Technologies, США), предварительно обработанные поли-D-лизином (Sigma, США): в среднем по 8 лунок для каждого донора на один тест. Для образования монослоя клеток планшет центрифугировали в течение 4 мин при 200 g (Ac 4, Dc 1). После этого доводили объем до 150 мкл средой XF RPMI Medium. Планшет инкубировали 60 мин при +37 °C в термостате. Растворы ингибиторов загружали в порты гидратированного сенсорного картриджа согласно схеме (табл. 1).

Технические повторности для каждого донора усредняли. Достоверность различий между группами устанавливали с использованием t-критерия Уэлча. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Проведение статистических расчетов осуществляли при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Данные на графиках представлены в виде средних и стандартных ошибок средних.

ТАБЛИЦА 1. СХЕМА ЗАГРУЗКИ ПОРТОВ КАРТРИДЖА ДЛЯ ТРЕХ ТЕСТОВ

TABLE 1. CARTRIDGE PORT LOADING SCHEME FOR THREE TESTS

Порт картриджа Cartridge port	**Анализ гликолитической скорости** Glycolytic Rate Assay		**Тест на стресс митохондрий** Cell Mito Stress Test		**Комбинированный тест** Combined test	
	Ингибитор Inhibitor	**Конечная концентрация, мкМ** Final concentration, μM	**Ингибитор** Inhibitor	**Конечная концентрация, мкМ** Final concentration, μM	**Ингибитор** Inhibitor	**Конечная концентрация, мкМ** Final concentration, μM
Порт A Port A	Rot/AA	0,5	**Олиго-мицин** Oligomycin	2,0	**Олиго-мицин** Oligomycin	2,0
Порт B Port B	2-DG	50,0	FCCP	2,5	FCCP	2,5
Порт C Port C	–	–	Rot/AA	0,5	Rot/AA	0,5
Порт D Port D	–	–	–	–	2-DG	50,0

Примечание. Rot/AA – ротенон/антимицин A; 2-DG – 2-дезокси-D-глюкоза; FCCP – карбонилцианид-4 (трифторметокси) фенилгидразон.

Note. Rot/AA, rotenone/antimycin A; 2-DG, 2-deoxy-D-glucose; FCCP, carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy)phenylhydrazone.

Результаты и обсуждение

Было установлено, что объединение тестов Glycolytic Rate Assay и Cell Mito Stress Test не оказывает статистически значимого влияния на фиксируемые показатели гликолиза и окислительного фосфорилирования. Так, при оценке базальных значений – до воздействия ингибиторов – как ECAR, так и OCR в оригинальных тестах не отличались от комбинированного варианта ($p < 0,05$) (рис. 1А, Г). Базальные ECAR и OCR позволяют оценить потребность в энергии у клеток в исходных условиях. Отсутствие статистически значимых различий между результатами оригинального и комбинированного тестов подтверждает обоснованность использования данных, полученных после введения ингибиторов, для последующих сравнительных анализов.

Установлено, что максимальная скорость гликолиза, рассчитанная как разница между показателями, полученными после добавления Rot/AA и 2-DG, в комбинированном тесте не отличается от таковой в оригинальном тесте Glycolytic Rate Assay ($p < 0,05$; рис. 1Б). В свою очередь, максимальная скорость окислительного фосфорилирования, определяемая как разница между измерениями после введения FCCP и Rot/AA, в комбинированном тесте также не отличается от значений Cell Mito Stress Test ($p < 0,05$) (рис. 1Д).

Сравнительный анализ выявил отсутствие статистически значимых различий в параметрах компенсаторного гликолиза и резервной дыхательной емкости (*англ.* Spare respiratory capacity, SRC) между оригинальными и комбинированными тестами ($p < 0,05$; рис. 1В, Е). Оба показателя рассчитывались как разница между максимальными и базальными значениями.

Таким образом, с использованием системы Seahorse XF возможно проводить анализ гликолиза и окислительного фосфорилирования одновременно. Отсутствие статистически значимых различий между раздельными и комбинированными тестами подтверждает возможность их мультиплексирования без потери точности. Это приобретает особую значимость в контексте изучения патологических состояний клеток и организма, учитывая, что метаболические нарушения нередко свидетельствуют о клеточной дисфункции [3]. Так, измерение максимальной гликолитической и дыхательной емкости служит инструментом для оценки адаптационного потенциала клеток. В исследовании мутантных клеток PITX2, ассоциированных с мерцательной аритмией, анализ максимальных значений ECAR выявил сохранение гликолитического пути в мутантных кардиомиоцитах предсердий на уровне контроля [2]. Однако при воздействии FCCP или β-адренергической стимуляции эти клетки демонстрировали недостаточную биоэнергетическую эффективность, что указывает на нарушение функции митохондрий. Расчет компенсаторного гликолиза и SRC позволяет анализировать метаболические резервы клеток и их стрессоустойчивость. Например, в модели гиперинсулинемии и гипергликемии у клапанных интерстициальных клеток отмечено синхронное

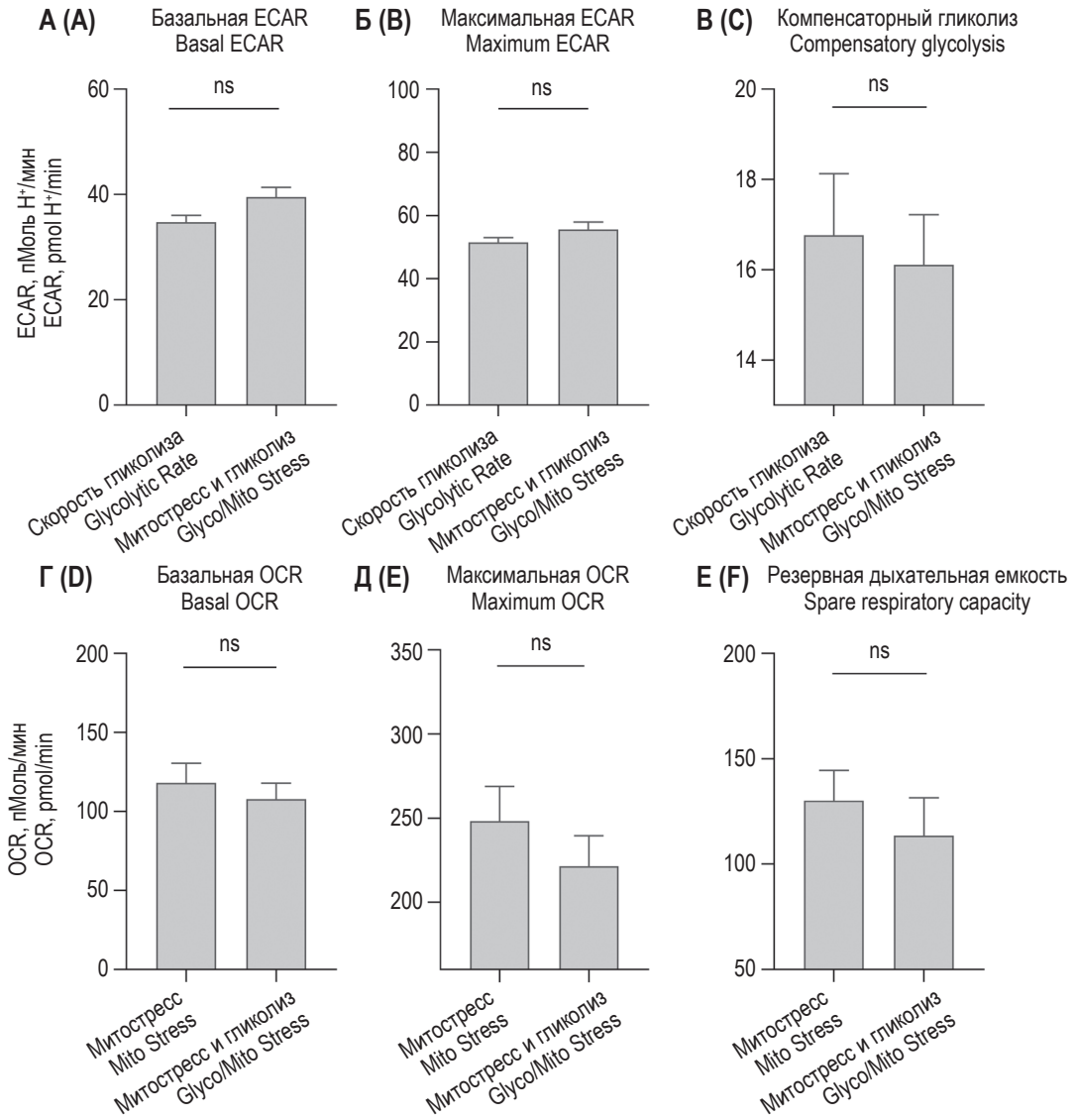

Рисунок 1. Сравнение параметров гликолиза и окислительного фосфорилирования при проведении оригинальных и комбинированных тестов

Примечание. Указаны средние и стандартные ошибки средних. Достоверность различий между группами устанавливали с использованием t-критерия Уэлча.

Figure 1. Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation parameters between original and combined tests

Note. The graph displays mean values with standard error bars. Statistical significance was determined using Welch's t-test to evaluate differences between groups.

увеличение как компенсаторного гликолиза, так и резервной дыхательной емкости при нормальном уровне глюкозы с гиперинсулинемией, а также при изолированной гипергликемии [9]. Эти данные, наряду с базальными и максимальными значениями ECAR и OCR, позволили сделать вывод, что гликолитическая и митохондриальная функции клапанных интерстициальных клеток не нарушается в условиях диабета.

Выводы

Таким образом, одновременное использование компонентов тест-наборов Glycolytic Rate Assay Kit и Cell Mito Stress Test Kit обеспечивает комплексный анализ метаболических параметров иммунных клеток, включая базальные, максимальные и резервные показатели гликолиза и окислительного фосфорилирования. Комбинированный тест демонстрирует сохранение точности результатов при сокращении объема биологического материала и минимизации ошибок, связанных с его обработкой. Это, в свою очередь, может привести к снижению экономических затрат, оптимизации временных ресурсов и повышению эффективности метаболических исследований. Комплексный подход в измерении

гликолиза и окислительного фосфорилирования может найти широкое применение в анализе функциональных различий между клеточными популяциями, а также в оценке влияния фармакологических агентов и других факторов на их метаболическую активность. Кроме того, комбинированный подход позволит эффективно исследовать метаболические аспекты активации и пролиферации иммунных клеток, а также клеток опухолей.

Благодарности

Авторы выражают глубокую благодарность заведующей лабораторией молекулярной иммунологии ИЭГМ УрО РАН Е.В. Сайдаковой.

Список литературы / References

1. Радыгина Т.В., Петричук С.В., Курбатова О.В., Купцова Д.Г., Потапов А.С. Определение ферментов гликолиза и окислительного фосфорилирования в лимфоцитах у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями. Аллергология и иммунология в педиатрии, 2023. № 2. С. 54-56. [Radygina T.V., Petrichuk S.V., Kurbatova O.V., Kuptsova D.G., Potapov A.S. Determination of enzymes of glycolysis and oxidative phosphorylation in lymphocytes in patients with immuno-dependent diseases. *Allergologiya i immunologiya v pediatrii = Allergology and Immunology in Paediatrics, 2023, no. 2, pp. 54-56.* (In Russ.)]
2. Benzoni P., Da Dalt L., Elia N., Popolizio V., Cospito A., Giannetti F., Dell'Era P., Olesen M.S., Bucchi A., Baruscotti M., Norata G.D., Barbuti A. PITX2 gain-of-function mutation associated with atrial fibrillation alters mitochondrial activity in human iPSC atrial-like cardiomyocytes. *Front. Physiol., 2023, Vol. 14, 1250951.* doi: 10.3389/fphys.2023.1250951.
3. Buck M.D., Sowell R.T., Kaech S.M., Pearce E.L. Metabolic instruction of immunity. *Cell, 2017, Vol. 169, no. 4, pp. 570-586.*
4. Childers G., Harry G.J. Mitochondrial stress assay and glycolytic rate assay in microglia using agilent seahorse extracellular flux analyzers. In: Llorens J., Barenys M. (eds.). Experimental Neurotoxicology Methods. Neuromethods, Vol. 172. New York: Humana New York, 2021, pp. 305-324.
5. Lee H.T., Lin C.S., Pan S.C., Wu T.H., Lee C.S., Chang D.M., Tsai C.-Y., Wei Y.-H. Alterations of oxygen consumption and extracellular acidification rates by glutamine in PBMCs of SLE patients. *Mitochondrion, 2019, Vol. 44, pp. 65-74.*
6. Li X., Sun X., Carmeliet P. Hallmarks of endothelial cell metabolism in health and disease. *Cell Metab., 2019, Vol. 30, no. 3, pp. 414-433.*
7. Li Z., Graham B.H. Measurement of mitochondrial oxygen consumption using a Clark electrode. *Methods Mol. Biol., 2012, Vol. 837, pp. 63-72.*
8. Makowski L., Chaib M., Rathmell J.C. Immunometabolism: From basic mechanisms to translation. *Immunol. Rev., 2020, Vol. 295, no. 1, pp. 5-14.*
9. Selig J.I., Ouwens D.M., Raschke S., Thoresen G.H., Fischer J.W., Lichtenberg A., Akhyari P., Barth M. Impact of hyperinsulinemia and hyperglycemia on valvular interstitial cells – A link between aortic heart valve degeneration and type 2 diabetes. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis., 2019, Vol. 1865, no. 9, pp. 2526-2537.*

Авторы:

Пономарева В.Н. *— младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; лаборант кафедры микробиологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия*

Власова В.В. *— младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; инженер кафедры микробиологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия*

Authors:

Ponomareva V.N., *Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Laboratory Assistant, Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation*

Vlasova V.V., *Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Engineer, Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation*

Поступила 28.03.2025
Отправлена на доработку 09.04.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 28.03.2025
Revision received 09.04.2025
Accepted 25.05.2025