

На правах рукописи



КРУГЛОВ СЕРГЕЙ ДМИТРИЕВИЧ

**РОЛЬ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ
ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В
ФОРМИРОВАНИИ КЛЕТОЧНО-ОПОСРЕДОВАННОГО ИММУННОГО
ОТВЕТА**

1.5.5. Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Архангельск –2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаврова» Уральского отделения Российской академии наук в лаборатории экологической иммунологии Института физиологии природных адаптаций

Научный руководитель: **Зубаткина Ольга Владимировна**, доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Костарева Анна Александровна**, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, директор Института молекулярной биологии и генетики

Антонов Виктор Георгиевич, доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Минздрава России, профессор кафедры биологической химии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Петрозаводский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится 18 декабря 2023 г. в 11.00 часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 21.2.080.01 на базе ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 163000, г. Архангельск, проспект Троицкий, д. 51.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 163000, г. Архангельск, проспект Троицкий, д. 51, www.nsmu.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

**Ученый секретарь
совета по защите диссертаций
на соискание ученой степени
кандидата наук, доктора наук
доктор медицинских наук, профессор**



Вилова Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Т-лимфоциты являются важным звеном в реализации механизмов адаптивного иммунного ответа. Их функционирование и выживаемость тесно связаны с активностью метаболизма и обеспеченностью клеток энергией. На данный момент накоплен большой объем данных, демонстрирующих вовлеченность метаболических путей в процессы регуляции развития иммунных реакций (Makowski L.etal., 2020). Известно, что различные субпопуляции иммунокомпетентных клеток в процессе дифференцировки подвергаются перестройкам метаболизма в зависимости от функций, выполняемых клетками с определенным фенотипом. Также клеточный метаболизм играет важную роль при адаптации к постоянно меняющимся условиям микроокружения (Yang K.etal., 2017; Rajendran M.etal., 2016; Almeida L.etal., 2016).

Метаболическая активность наивных Т-клеток находится на уровне, позволяющем им поддерживать свою жизнедеятельность. Субстратами для обеспечения неактивированных лимфоцитов энергией служат преимущественно глюкоза и жирные кислоты, а наработка АТФ осуществляется в основном за счет процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях (Шейбак В.М., 2018). После взаимодействия Т-клеточного рецептора с молекулой главного комплекса гистосовместимости лимфоциты начинают активно пролиферировать, при этом возрастает поглощение глюкозы и ее утилизация за счет повышения скорости работы гликолитического пути (Kornberg M.D.etal., 2020). В процессе дифференцировки лимфоциты в разной степени задействуют окислительное фосфорилирование, гликолиз и глутаминолиз. В подмножествах эффекторных CD4⁺ клеток Th1, Th17 и Th2 основную роль в поддержании функционирования играет гликолиз, а Treg предпочтительно используют β -окисление жирных кислот (Stark M.J.etal., 2019; Johnson O.M.etal., 2018; Qin Y., 2022; Papadopoulou G. etal., 2021; Shi H.etal., 2019). По мере прекращения иммунного ответа большинство эффекторных CD4⁺ Т-клеток подвергаются апоптозу, для которого требуются большие энергетические траты, в связи с чем преимущественную роль в наработке АТФ играет процесс окислительного фосфорилирования в митохондриях, а жирные кислоты становятся основными субстратами окисления, что характерно также и для формирующихся Т-клеток памяти (Szondy Z. etal., 2017; Corrado M., Pearce E.L., 2022).

Эффективность метаболических перестроек во многом зависит от скоординированной работы регуляторных белков (MacPherson S.etal., 2018; Pearce E.L.etal., 2013; Nicole M.etal., 2022). Особое значение имеют сигнальные молекулы регуляции путей наработки АТФ, таких как гликолиз (HIF-1 α) и окислительное фосфорилирование в митохондриях (SIRT3) (Georgina N.etal., 2017; Hao M.etal., 2019).

Определение метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов периферической крови позволит получить более полное представление о механизмах развития иммунных реакций, что представляется актуальным для оценки функционирования иммунокомпетентных клеток диагностики развития иммунных нарушений на более ранних этапах.

Степень разработанности темы исследования. Роль отдельных метаболических путей и факторов регуляции в поддержании функциональной активности лимфоцитов отражена в работах целого ряда как зарубежных, так и отечественных авторов (Елисеев Е.В., 2014; Куртасова Л.М., 2014; Старикова Э.А., 2017; Зубаткина О.В., 2019; Ganeshan K., 2014; Hotamisligil G.S., 2017; Jung J., 2019; Erika M., 2020). В них представлены научные данные, которые преимущественно были получены в исследованиях с использованием клеточных линий, в то время как сведения о влиянии метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов на популяционный состав иммунокомпетентных клеток периферической крови человека практически отсутствуют. К настоящему времени накоплен большой объем данных о физиологических механизмах адаптации организма человека в ответ на действие холода, в том числе и на клеточном уровне (Бочаров М.И., 2015; Добродеева Л.К., 2015-2022; Eccles R., 2015; Shunsuke S., 2016), однако роль энергетической обеспеченности лимфоцитов периферической крови при формировании клеточно-опосредованных иммунных реакций в ответ на действие низких температур малоизучена.

Цель исследования: дать физиологическую оценку активности метаболизма и энергетической обеспеченности лимфоцитов периферической крови и установить их влияние на формирование клеточно-опосредованного иммунного ответа.

Объект исследования: лимфоциты периферической крови человека.

Предмет исследования: опосредованная HIF-1 α и SIRT3 регуляция метаболических путей наработки АТФ в лимфоцитах и влияние активности метаболизма и энергетической обеспеченности лимфоцитов периферической крови на иммунный статус организма.

Задачи исследования:

1. Определить содержание АТФ в лимфоцитах периферической крови и выявить зависимость между уровнем энергообеспеченности лимфоцитов и популяционным составом иммунокомпетентных клеток.

2. Оценить влияние HIF-1 α - и SIRT3-зависимой регуляции внутриклеточного метаболизма на популяционный состав лимфоцитов периферической крови.

3. Установить связь между изменением концентрации АТФ лимфоцитов периферической крови и направленностью иммунного реагирования после холодового воздействия.

Гипотеза исследования. Процессы пролиферации, дифференцировки и функциональная активность лимфоцитов требуют значительных метаболических перестроек для покрытия необходимых энергетических затрат. Предполагается, что изменение внутриклеточного содержания АТФ и регуляторов гликолиза (HIF-1 α) и митохондриального метаболизма (SIRT3) оказывает влияние на формирование популяционного состава лимфоцитов периферической крови и взаимосвязано с механизмом клеточно-опосредованных реакций при развитии иммунного ответа.

Научная новизна исследования. Впервые выявлены изменения абсолютного содержания и популяционного состава пула лимфоцитов периферической крови в зависимости от внутриклеточного содержания АТФ.

Впервые проведена оценка метаболической активности лимфоцитов через измерение внутриклеточного содержания регуляторных белков: HIF-1 α и SIRT3. Определено влияние соотношения HIF-1 α /SIRT3 на популяционный состав лимфоцитов периферической крови.

Впервые выявлены зависящие от уровня энергетической обеспеченности клеток изменения в пуле лимфоцитов периферической крови и цитокиновом профиле в ответ на кратковременное действие холода.

Теоретическая и практическая значимость работы. Определение метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов может послужить в качестве функционального теста, позволяющего оценить работу адаптивного иммунитета и установить варианты реагирования иммунной системы в ответ на действие неблагоприятных факторов.

В физиологии иммунокомпетентных клеток измерение параметров, отражающих метаболическую активность и энергетическую обеспеченность лимфоцитов позволит более детально охарактеризовать механизмы клеточных реакций при развитии иммунного ответа.

В клинко-лабораторной практике оценка метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов может стать информативным критерием для ранней диагностики аутоиммунных нарушений и иммунодефицитных состояний.

Диссертационное исследование выполнено на базе лаборатории экологической иммунологии Института физиологии природных адаптаций ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН в рамках научно-исследовательских работ с регистрационным № НИОКТР 122011900104-1 и № НИОКТР 122011300377-5.

Легитимность исследования подтверждена решением Этического комитета Федерального исследовательского центра комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лавёрова УрО РАН (протокол №2 от 29.01.2020).

Методология и методы исследования. При выполнении исследования проведен анализ научной литературы последних лет, освещающей влияние гликолиза и митохондриального метаболизма на пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность лимфоцитов и роль белков HIF-1 α и SIRT3 в регуляции этих процессов. Использованы общенаучные методы: эксперимент и метод сравнения. Данные обработаны статистическими методами согласно рекомендациям (Glantz S., 2012).

Положения, выносимые на защиту:

1. Уровень внутриклеточного АТФ влияет на количественные показатели и популяционный состав пула лимфоцитов периферической крови.

2. Увеличение соотношения HIF-1 α /SIRT3 способствует повышению содержания субпопуляций лимфоцитов, имеющих высокую метаболическую активность.

3. В ответ на кратковременное действие холода происходит изменение популяционного состава лимфоцитов периферической крови и запускается вариант реагирования, зависящий от внутриклеточной концентрации АТФ.

Достоверность и обоснованность исследования обусловлена выбором оптимальных критериев для прохождения обследования, использованием валидных методов исследования полученного биологического материала, корректным проведением статистической обработки полученных результатов и их анализа.

Апробация результатов исследования. Результаты исследования докладывались и обсуждались на заседаниях ученого совета Института физиологии природных адаптаций УрО РАН (Архангельск, 2020-2022), международной конференции «Биомониторинг в Арктике» (Архангельск, 2020), международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные научные исследования: актуальные вопросы достижения инновации» (Пенза, 2020), международной конференции «Сбережение здоровья человека в Арктике» (Архангельск, 2022).

Область исследования. Диссертационная работа выполнена в соответствии с Паспортом специальности ВАК при Минобрнауки России: 1.5.5. Физиология человека и животных (медицинские науки) по областям исследований: п.1 – «изучение закономерностей и механизмов поддержания постоянства внутренней среды организма человека, механизмов функционирования клеток, принципов их системной организации»; п. 2 - «анализ молекулярных, биохимических процессов, определяющих динамику и взаимодействие физиологических процессов и функций человека»; п. 3 – «исследование закономерностей физиологических процессов и функций отдельных систем (иммунной, обмена веществ и энергии) организма человека; п. 5 – «биохимический и иммунобиологический статус человека и взаимосвязь этих показателей с их функциональной способностью».

Личный вклад автора. Автором самостоятельно выполнен анализ литературных источников по теме диссертационной работы, определены объем, состав изучаемой выборки, методология исследования, осуществлен сбор материала, его первичная и последующая обработка, проведен статистический анализ полученных результатов, сделаны выводы, даны практические рекомендации.

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 5 статей – в журналах, рекомендованных действующим перечнем ВАК при Минобрнауки России индексируемых в международной реферативной базе данных Scopus, для соискателей ученой степени кандидата медицинских наук.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 116 листах машинописного текста, состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований и их обсуждение), заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 4 таблицами и 26 рисунками. Список литературы включает в себя 250 источников, из которых 27 отечественных и 223 зарубежных автора.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обосновывается актуальность исследования; определены объект, предмет, цель, задачи исследования; сформулированы гипотеза и основные

положения, выносимые на защиту; приведены данные о теоретической и практической значимости работы, ее научной новизне и апробации.

В главе 1 «Обзор литературы» представлены результаты поиска и анализа научной литературы по теме диссертационного исследования, описывающие современные представления о роли клеток адаптивной иммунной системы в поддержании гомеостаза организма (п 1.1), влиянии метаболических путей на пролиферацию, дифференцировку и поддержание функциональной активности лимфоцитов, NIF-1 α и SIRT3 регуляции метаболизма (п 1.2),

В главе 2 «Организация, объем и методы исследования» представлены данные об организации и объеме исследования, методологическая основа и методологическое обеспечение, приведены критерии включения, охарактеризован контингент волонтеров, принявших участие в исследовании.

Обследуемый контингент. Было проведено обследование 196 жителей города Архангельска и Архангельской области (123 женщины и 73 мужчины, средний возраст участников 35 (12) лет), от каждого из которых было получено добровольное информированное согласие. Все исследования проводились в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта» (2013). Критериями участия являлись наличие ранее установленной при прохождении диспансеризации первой или второй группы здоровья и отсутствие острых или обострений хронических заболеваний в течение месяца до момента проведения обследования.

Методы исследования. Комплекс обследования включал в себя определение общей концентрации лимфоцитов в образце цельной крови на автоматических гематологических анализаторах SysmexXS 500i (Япония) и MedonicM20 (Швеция). Для получения лимфоцитарной взвеси использовали градиент плотности фиколловорографин. Содержание CD4⁺, CD71⁺, CD95⁺, CD3⁺, HLADR⁺, CD10⁺, CD16⁺, CD23⁺, CD25⁺ клеток определяли с использованием реактивов производства ООО «Сорбент» (Россия). Перед измерением концентрации регуляторных белков SIRT3 и NIF-1 α лимфоциты обрабатывали лизирующим раствором для полного лизиса всех клеточных компонентов, для получения лизатаи последующего определения SIRT3 и NIF-1 α использовали наборы производства компании «CloudClone» (США).Для определения содержания TNF- α , IL6, IL-10,IL-1 β в сыворотке крови использовали наборы реагентов ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ» (Россия). Измерения проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа на автоматическом анализаторе EVOLIS (Bio-Rad, Франция/США).Концентрацию АТФ определяли на люминометре, флюоресценция вызывалась при помощи люциферин-люциферазной реакции, использовали реактивы производства ООО «Люмтек» (Россия).

Статистическая обработка полученных результатов. Статистическая обработка выполнялась с использованием пакетов программ Statistica 11.0 StataSoft (США), MSExcel 2016. При проверке данных на нормальность распределения использовали критерии Колмогорова – Смирнова и Шапиро – Уилка. Вычисление

среднего значения и стандартного отклонения при описании полученных результатов проводили в случае распределения данных близко к нормальному. Для разделения волонтеров на группы, статистически различающиеся по анализируемым показателям, применялся кластерный анализ методом К-средних. Сравнение количественных значений между группами проводили с использованием t-критерия Стьюдента, различия считались статистически значимыми при уровне значимости ниже порогового ($p < 0,05$).

В главе 3 «Результаты собственных исследований и их обсуждение» приведены результаты собственных исследований, показано влияние внутриклеточной концентрации АТФ и основных регуляторов митохондриального метаболизма и гликолиза (SIRT3 и HIF-1 α , соответственно) на популяционный состав лимфоцитов периферической крови. Приведены данные об изменении уровня АТФ и содержания лимфоцитов с исследуемыми фенотипами в ответ на кратковременное действие холода.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

АТФ содержится в значительных концентрациях внутри клетки, при этом происходит его постоянный расход и пополнение за счет работы метаболических путей, таких как гликолиз, окислительное фосфорилирование и глутаминолиз. Внутриклеточное содержание АТФ зависит как от расхода АТФ, определяемого нуждами и функцией клетки, так и от скорости восполнения через продукцию АТФ в метаболических процессах.

Для установления особенностей иммунного статуса в зависимости от уровня энергетической обеспеченности лимфоцитов при помощи кластерного анализа были выделены 2 группы, в которых все показатели имели статистически значимые различия. В группе кластера 1 внутриклеточное содержание АТФ было статистически значимо выше, при этом абсолютное содержание лимфоцитов и всех измеренных фенотипов были статистически значимо ниже. В группе кластера 2 полученные значения показателей были противоположны. Результаты кластерного анализа представлены в таблице 1.

Поскольку измерение внутриклеточного содержания АТФ выполнялось во всем пуле лимфоцитов, полученное значение является усредненным и зависит не только от общего содержания лимфоцитов, но и от соотношения различных субпопуляций в общем пуле клеток, метаболическая активность и энергетическая потребность которых неодинаковы (RangelRivera G.O.etal., 2021).

Было проведено сравнение удельного веса всех измеренных фенотипов в группах, различающихся по уровню АТФ. Результаты анализа представлены на лепестковой диаграмме, где по осям откладывалось значение долей исследуемых фенотипов (CD) относительно абсолютного значения лимфоцитов. (рис. 1).

Из данных, приведенных на рисунке 1, можно увидеть, что в группе первого кластера с более низким содержанием АТФ относительно группы кластера 2 наблюдается более высокий удельный вес лимфоцитов с рецептором к IgE (CD23), меченных к апоптозу (CD95) и HLADR⁺ клеток. В группе второго кластера с более высоким внутриклеточным содержанием АТФ выше удельный вес лимфоцитов,

имеющих на мембране дифференцировочные антигены (CD4, CD8), антигены клеточной активации (CD25, CD71), маркер пролиферации CD10.

Таблица 1

Содержание лимфоцитов и их фенотипов в группах с различным содержанием АТФ

Параметр	Кластер 1 (n=81) M(SD)	Кластер 2 (n=23) M(SD)	Уровень значимости (P)
АТФ мкмоль/ 10 ⁶ кЛ	0,95 (0,487)	3,71 (1,319)	<0,0001
Лимфоциты 10 ⁶ кЛ/мл	2,04 (0,769)	1,21 (0,470)	<0,0001
CD4 10 ⁶ кЛ/мл	0,44 (0,259)	0,28 (0,152)	0,0063
CD3 10 ⁶ кЛ/мл	0,60 (0,308)	0,33 (0,152)	0,0011
CD71 10 ⁶ кЛ/мл	0,43 (0,252)	0,28 (0,157)	0,0005
CD10 10 ⁶ кЛ/мл	0,38 (0,173)	0,23 (0,106)	0,0002
CD16 10 ⁶ кЛ/мл	0,36 (0,169)	0,21 (0,094)	<0,0001
CD23 10 ⁶ кЛ/мл	0,43 (0,230)	0,21 (0,082)	<0,0001
CD25 10 ⁶ кЛ/мл	0,42 (0,230)	0,24 (0,111)	0,0006
CD95 10 ⁶ кЛ/мл	0,32 (0,154)	0,17 (0,084)	<0,0001
HLADR 10 ⁶ кЛ/мл	0,46 (0,250)	0,23 (0,094)	<0,0001

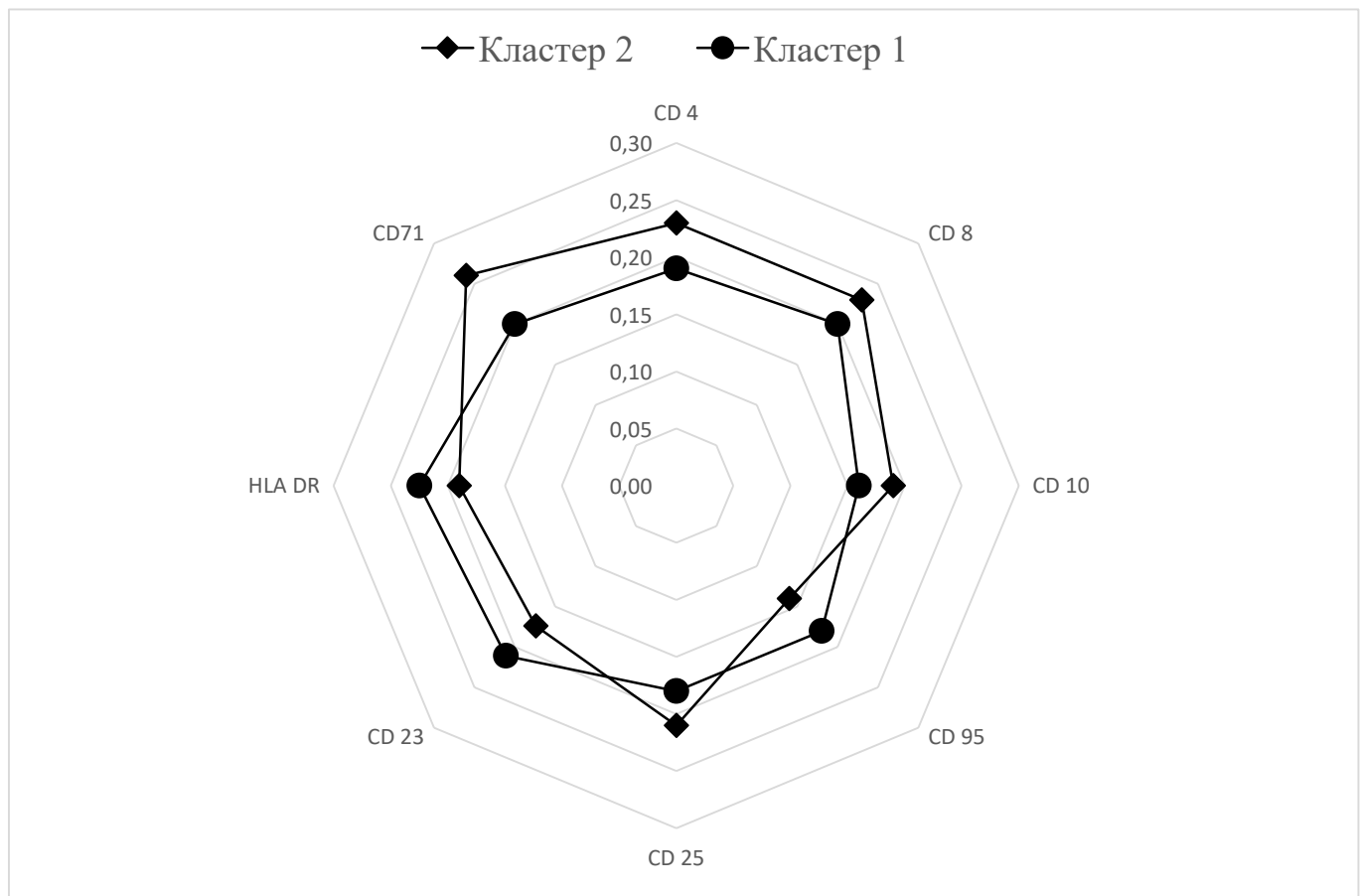


Рис. 1. Распределение фенотипов лимфоцитов в зависимости от уровня АТФ

Для выявления механизмов иммунного реагирования в обоих кластерах были рассчитаны соотношения $CD4^+/CD8^+$, $CD10^+/CD95^+$, $CD4^+/CD23^+$, что соответственно позволяет отразить эффективность работы клеточного иммунитета, баланс между пролиферативной активностью и программируемой клеточной гибелью, направленность реакций в сторону клеточного или гуморального иммунитета. Более низкие соотношения $CD10^+/CD95^+$, $CD4^+/CD23^+$ были характерны для группы кластера 1, по сравнению с группой второго кластера. Они равнялись для $CD10^+/CD95^+$ 1,02 (0,33) и 1,39 (0,41), $p=0,0001$, для $CD4^+/CD23^+$ 1,05 (0,29) и 1,71 (0,47), $p=0,0004$ в группах кластеров 1 и 2 соответственно.

В группе кластера 1, где внутриклеточное содержание АТФ было ниже, а абсолютное содержание лимфоцитов выше относительно группы кластера 2, анализ распределения фенотипов внутри группы выявил преобладание лимфоцитов с фенотипами $HLADR^+$, $CD23^+$, $CD95^+$. Рассчитанные соотношения $CD10^+/CD95^+$ и $CD4^+/CD23^+$ также были ниже по сравнению с их значениями в группе кластера 2.

Полученные результаты позволяют предположить, что низкое содержание АТФ в этих группах обусловлено его увеличенным расходом на повышенную пролиферативную активность клеток, что выражается в увеличении абсолютного содержания лимфоцитов, при этом активируются механизмы сдерживания, не допускающие чрезмерной активации иммунного ответа и ограничивающие клеточную экспансию, что выражается в увеличении доли $CD95^+$ и снижении соотношения $CD10^+/CD95^+$. Также более высокий удельный вес $CD23^+$ клеток и снижение соотношения $CD4^+/CD23^+$ предполагают развитие гуморального иммунного ответа. Дополнительно, повышенный расход АТФ лимфоцитами $HLADR^+$, $CD23^+$, $CD95^+$ подтверждается наличием статистически достоверных отрицательных корреляций между содержанием этих фенотипов и внутриклеточной концентрацией АТФ. Значения коэффициентов корреляции Спирмена составили $r = -0,49$, $r = -0,51$, $r = -0,47$ ($p < 0,01$) для $CD95^+$, $CD23^+$, $HLADR^+$ клеток соответственно. Процессы как пролиферации, так и контроля иммунного ответа сопряжены с большим расходом энергии, что выражается в снижении внутриклеточного уровня АТФ.

В группе кластера 2, где внутриклеточное содержание АТФ было выше, а общее количество лимфоцитов ниже по сравнению с группой кластера 1, анализ распределения удельного веса измеренных фенотипов лимфоцитов показал преобладание $CD4^+$, $CD8^+$, $CD10^+$, $CD25^+$, $CD71^+$ клеток. Соотношения $CD10^+/CD95^+$, $CD4^+/CD23^+$ были смещены в сторону пролиферирующих ($CD10^+$) и Т-хелперных ($CD4^+$) клеток соответственно. Повышенный удельный вес лимфоцитов с перечисленными поверхностными белками отражает более высокую способность лимфоцитов к активации, пролиферации и реализации иммунной защиты преимущественно по клеточно-опосредованному механизму.

Энергетическая обеспеченность зависит от метаболической активности клеток. Для своего функционирования различные субпопуляции лимфоцитов в разной степени задействуют гликолиз и окислительное фосфорилирование, скорость и эффективность которых в отношении продукции АТФ не равнозначны: гликолиз по

сравнению с окислительным фосфорилированием намного быстрее, но менее эффективен в отношении продукции АТФ. Активность этих метаболических путей зависит от действия механизмов их регуляции с участием HIF-1 α и SIRT3.

Было проведено измерение концентраций внутриклеточного содержания HIF-1 α и SIRT3 и последующее разделение полученных данных на 2 группы, статистически значимо различающиеся по внутриклеточной концентрации определяемых регуляторных белков.

Направленность изменений как абсолютного содержания лимфоцитов, так и всех фенотипов имела сходный характер с изменением АТФ в каждой из групп, различающихся преимущественным содержанием одного или другого регулятора. В тоже время между группами с высокой внутриклеточной концентрацией SIRT3 или высокой внутриклеточной концентрацией HIF-1 α не имелось статистически значимых различий в абсолютном содержании лимфоцитов, однако были выявлены статистически значимые различия в содержании всех измеренных фенотипов иммунокомпетентных клеток. Результаты представлены на рисунке 2.

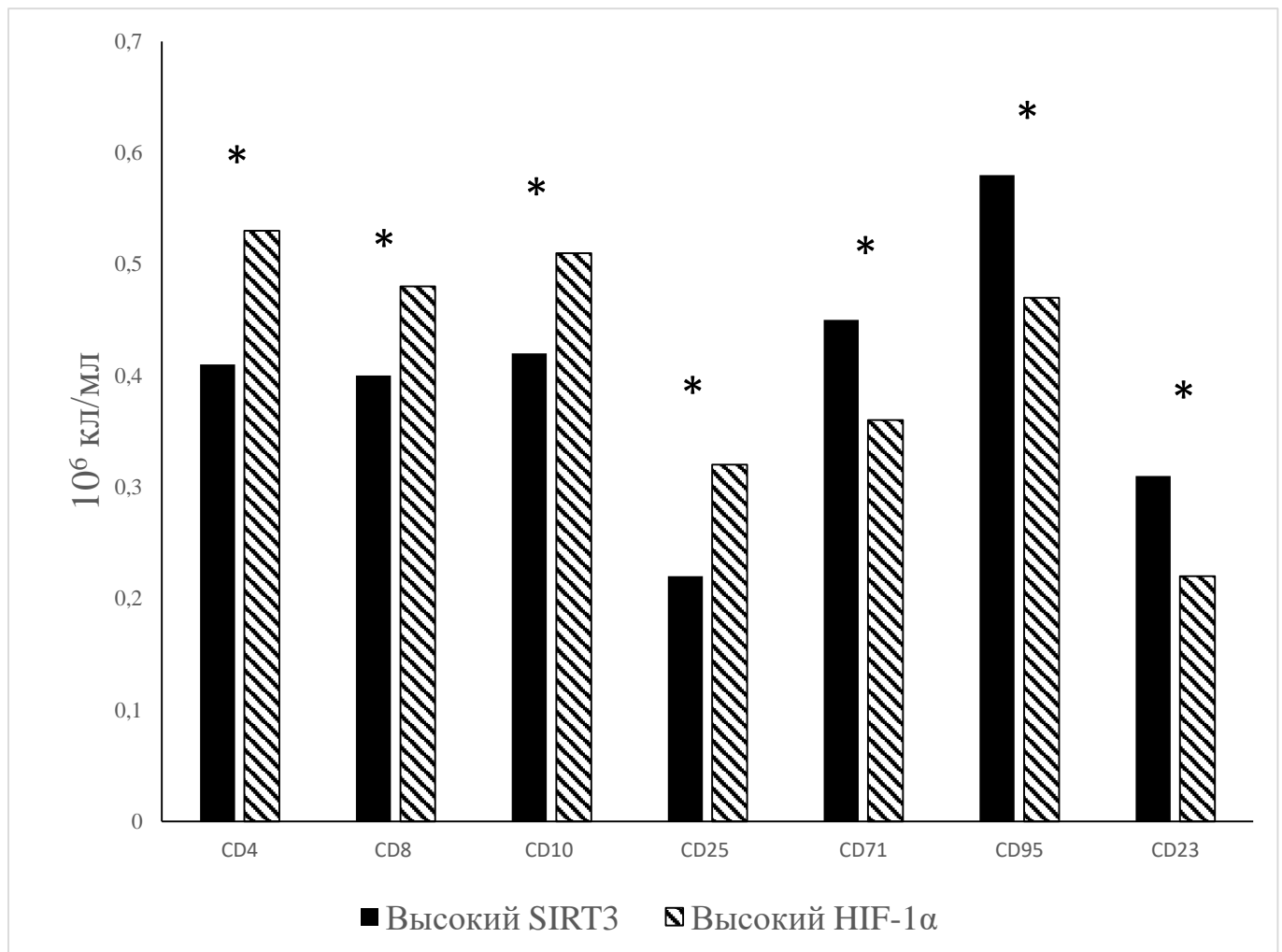


Рис.2. Распределение фенотипов лимфоцитов в группах с высоким содержанием SIRT3 или HIF-1 α

*Примечание: * – различия статистически значимы ($p < 0,01$).*

Из данных, представленных на рисунке 2, можно увидеть, что группа с высоким содержанием SIRT3 отличается более высокой концентрацией лимфоцитов с рецептором к IgE (CD23⁺) и содержанием клеток, меченных к апоптозу (CD95⁺), тогда как в группе с преимущественно высоким содержанием HIF-1 α наблюдаются более высокие концентрации лимфоцитов с дифференцированными антигенами CD4, CD8 и CD10. Также имелись различия в концентрациях лимфоцитов с активационными антигенами CD25 и CD71. В группе с высоким содержанием SIRT3 преобладали клетки с рецептором трансферрина (CD71), а в группе с высоким содержанием HIF-1 α было выше количество клеток с рецептором интерлейкина 2 (CD25).

Выявленные изменения отражают наибольшую активность гликолиза у лимфоцитов CD4⁺, CD8⁺, CD10⁺, CD25⁺, в то время как лимфоциты с фенотипами CD95⁺ и CD23⁺ имеют преимущественную активность пути окислительного фосфорилирования в митохондриях.

При сопоставлении данных о распределении субпопуляции лимфоцитов с уровнем АТФ выявлено, что для групп с более высоким внутриклеточным содержанием как HIF-1 α , так и АТФ имеет место однонаправленность изменений популяционного состава, в обоих случаях преобладают CD4⁺, CD8⁺, CD10⁺, CD25⁺ лимфоциты. Это может говорить, что высокая метаболическая активность этих клеток обусловлена повышенной нагрузкой АТФ, происходящей за счет стимулирования гликолитического пути метаболизма. В то время как для CD95⁺ и CD23⁺ характерна более высокая активность митохондриального метаболизма, контролируемого SIRT3.

Более полная информация была получена при определении в одном образце лимфоцитарной взвеси как HIF-1 α , так и SIRT3 и расчете соотношения HIF-1 α /SIRT3. Полученный массив данных при помощи кластерного анализа методом K-средних был разделен на две группы, которые статистически различались по всем измеряемым показателям за исключением измеренной концентрации SIRT3.

Соотношение HIF-1 α /SIRT3 в группе кластера 2 составило 7,4 (1,78) и было статистически значимо выше, чем в группе кластера 1, в которой оно равнялось 4,0 (0,69), $p=0,0097$. Сравнительный анализ групп с различающимся соотношением HIF-1 α /SIRT3 показал, что в группе, где HIF-1 α /SIRT3 было выше, концентрации лимфоцитов и всех измеренных фенотипов была ниже, относительно группы с более низким соотношением HIF-1 α /SIRT3. Чтобы выявить влияние соотношения HIF-1 α /SIRT3 на метаболическую активность лимфоцитов было проанализировано распределение всех измеренных популяций в пуле лимфоцитов для обеих групп. Выявлено, что в группе с более высоким соотношением HIF-1 α /SIRT3 преобладали лимфоциты с фенотипами CD4⁺, CD8⁺, CD10⁺, CD25⁺. В группе с более низким соотношением HIF-1 α /SIRT3 был выше удельный вес лимфоцитов с фенотипами CD23⁺, CD95⁺. Удельный вес CD71⁺ лимфоцитов статистически значимо не различался. Для более наглядного отображения полученных данных был вычислен обратный натуральный логарифм отношения абсолютной концентрации лимфоцитов к остальным измеренным фенотипам. Результаты представлены на рисунке 3.

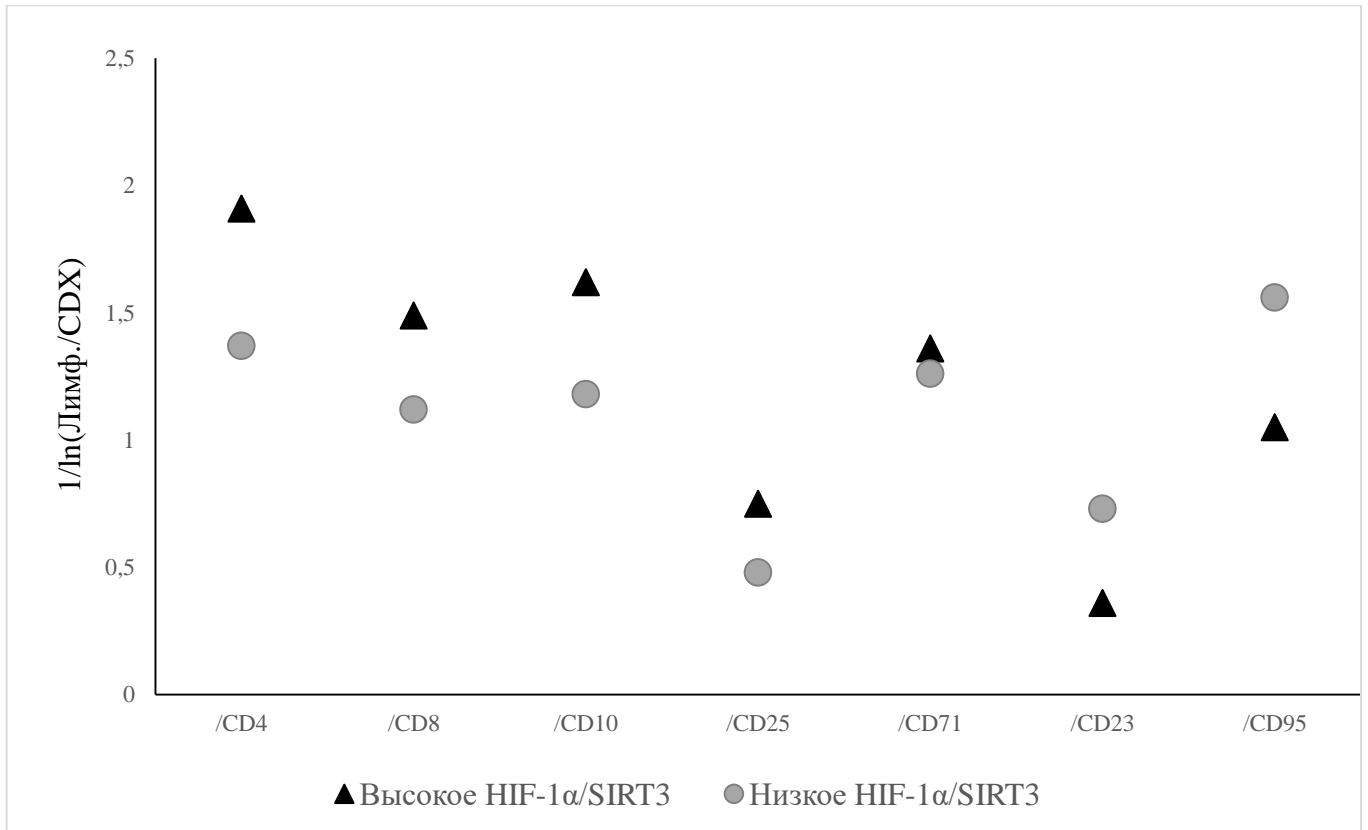


Рис.3. Распределение фенотипов лимфоцитов в группах с различающимся соотношением SIRT3/HIF-1 α

Установлено, что группы, различающиеся по соотношению HIF-1 α /SIRT3, имели статистически значимые различия в обеспеченности лимфоцитов энергией. Так, в группе с более высоким соотношением HIF-1 α /SIRT3 концентрация АТФ также была выше относительно группы с более низким соотношением HIF-1 α /SIRT3. Значения АТФ составили 3,71 (1.07) и 1,25 (0.72) $p = 0,0004$ соответственно для групп первого и второго кластеров. Соотношение HIF-1 α /SIRT3 отражает различие в направленности клеточного метаболизма лимфоцитов, а именно его увеличение указывает на повышение гликолитической активности. Поскольку группы выделенных кластеров не имели статистически значимого различия по содержанию SIRT3 наблюдаемое повышение уровня АТФ связано с его преимущественной продукцией по пути гликолиза.

Таким образом о выраженности гликолитической активности можно судить по увеличению соотношения HIF-1 α /SIRT3, что сопровождается ростом количества АТФ, обеспечивая лимфоцитам необходимый для поддержания функциональной активности уровень энергетической обеспеченности. Это способствует увеличению удельного веса CD4⁺, CD8⁺, CD10⁺, CD25⁺ клеток.

Холодовое воздействие оказывает значительное влияние на работу иммунной системы. Снижение температуры задействует ряд механизмов, направленных на поддержание жизнедеятельности и функциональной активности лимфоцитов. В частности, происходят метаболические перестройки, связанные с

изменением механизмов межмембранного транспорта и работы термочувствительных ионных каналов, а также активацией молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением, что приводит к увеличению энергетических затрат (Bertin S., Raz E., 2016; Roh J.S., Sohn D.H., 2018).

Для изучения особенностей иммунного реагирования в ответ на кратковременное холодное воздействие были дважды измерены показатели иммунного статуса и уровень АТФ лимфоцитов до и после пятиминутного пребывания волонтеров в холодной камере. При помощи кластерного анализа были выделены две группы со статистически различающимися по большинству измеряемых показателей, затем внутри каждой группы был проведен сравнительный анализ показателей, полученных до и после холодной пробы внутри групп кластеров. Результаты, отражающие изменения количественного состава лимфоцитарного пула и концентраций измеренных цитокинов в ответ на действие холода представлены на диаграммах, где горизонтальные линии отражают внутриклеточное содержание АТФ, столбцы концентрации лимфоцитов, измеренных фенотипов и цитокинов (см. рисунки 4 и 5).

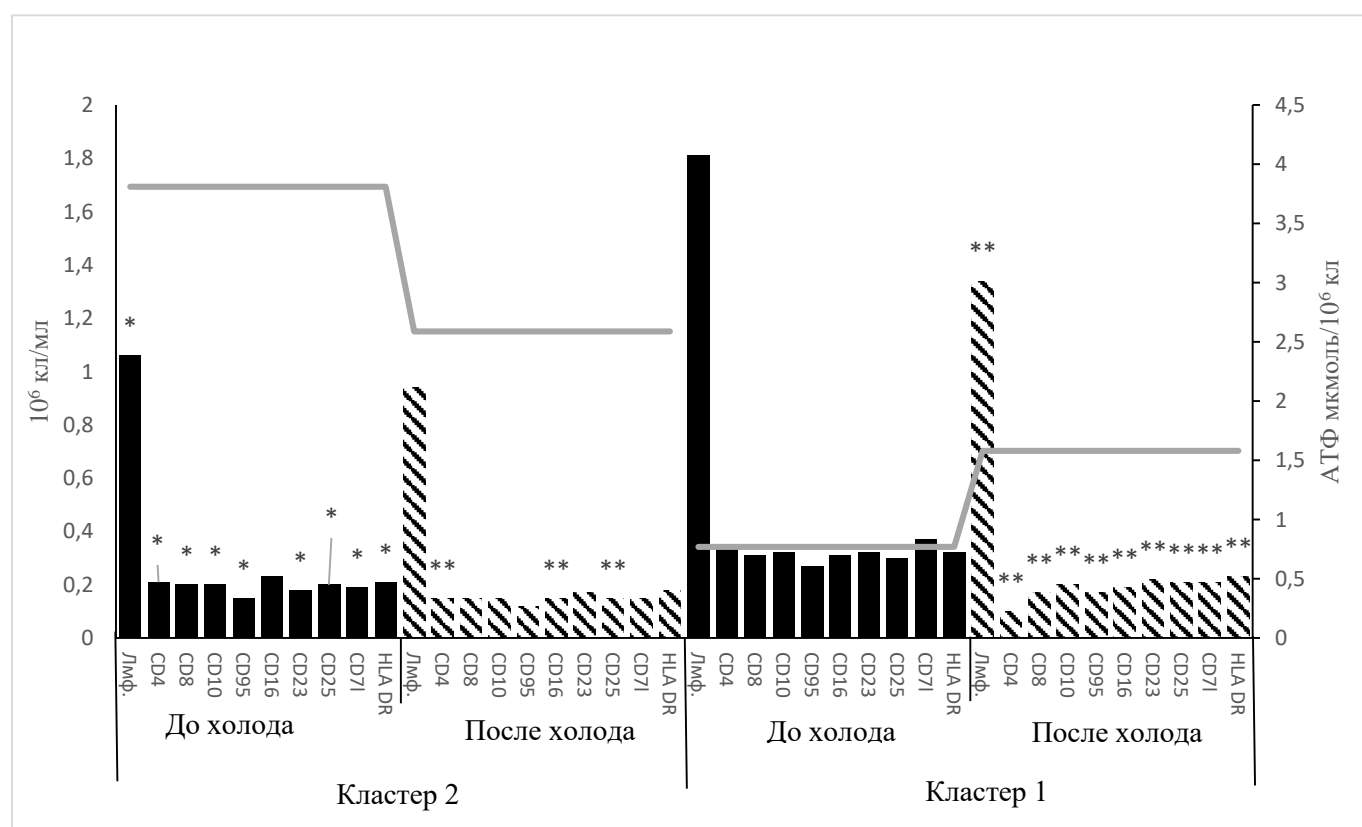


Рис. 4. Изменение количественных показателей пула лимфоцитов периферической крови в ответ на холодное воздействие

*Примечание: * – различия показателей до холодной пробы между кластером 1 и 2 статистически значимы ($p < 0,05$); ** – различия показателей в ответ на действие холода внутри групп кластеров статистически значимы ($p < 0,05$).*

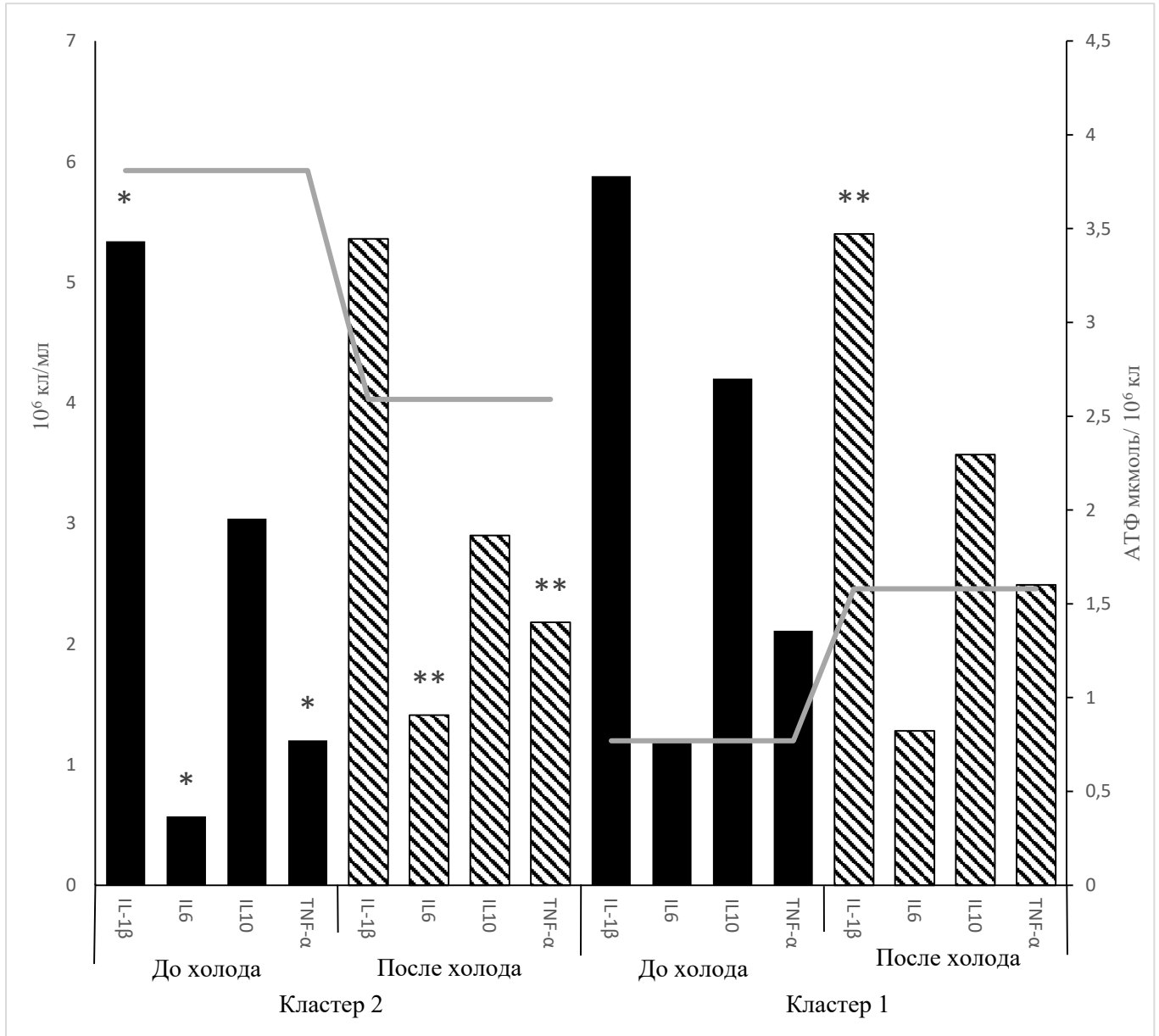


Рис. 5.Изменение концентраций цитокинов в ответ на холодовое воздействие

*Примечание: * – различия показателей до холодной пробы между кластером 1 и 2 статистически значимы ($p < 0,05$); ** - различия показателей в ответ на действие холода внутри групп кластеров статистически значимы ($p < 0,05$).*

Сравнительный анализ значений групп кластеров 1 и 2 полученных до холодной пробы выявил, что в группе кластера 1 относительно группы кластера 2 внутриклеточное содержание АТФ лимфоцитов было ниже, значения составили 0,77 (0,563) и 3,81 (1,389), $p = 0,00002$ для 1 и 2 групп кластеров соответственно. Общее количество лимфоцитов и фенотипов $CD4^+$, $CD8^+$, $CD10^+$, $CD23^+$, $CD25^+$, $CD71^+$, $HLADR^+$ и $CD95^+$ в группе первого кластера было статистически значимо выше относительно группы кластера 2, исключение составило содержание $CD16^+$ клеток, которое статистически значимо не различалось. Цитокиновый профиль характеризуется статистически значимо более высокими концентрациями $IL-1\beta$, $IL-$

6 и TNF- α в группе кластера 1 по сравнению с группой кластера 2. В тоже время статистически значимых различий в концентрации IL-10 между группами кластеров не наблюдалось. IL-1 β , IL-6 и TNF- α являются провоспалительными цитокинами и способствуют активации, дифференцировке и миграции клеток в ткани, а IL-10 являясь противовоспалительным цитокином снижает интенсивность иммунных реакций. Увеличение уровня провоспалительных цитокинов отражает увеличенную фоновую активацию иммунной системы.

В ответ на кратковременное действие холода в группе второго кластера произошло статистически значимое снижение внутриклеточной концентрации АТФ, при этом изменения в пуле лимфоцитов периферической крови характеризовались уменьшением концентраций CD4⁺, CD16⁺, CD25⁺ клеток, которое также было статистически значимым. Внутри популяции упал удельный вес этих клеток, снижение которого было наиболее выражено у CD16⁺ клеток и составило 5,8%. Концентрации остальных измеренных фенотипов, как и абсолютное содержание лимфоцитов статистически значимо не изменились. Сравнительный анализ цитокинового профиля до и после холодовой пробы выявил статистически значимое повышение концентраций провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α . Наблюдаемые изменения могут быть связаны с работой термочувствительных кальциевых каналов, открытие которых стимулирует экспрессию ядерного фактора активированных Т-клеток, что приводит к активации клеток и усилению секреции IL-6 и TNF- α в кровь (Parenti A., et al. 2017). Снижение содержания CD4⁺, CD16⁺, CD25⁺ клеток может быть следствием их миграции в ткани. Уменьшение концентрации АТФ обусловлено увеличением его расхода в ответ на холодовую стимуляцию, поскольку активация дифференцировка синтез и секреция цитокинов повышают энергетические траты клеток.

В группе первого кластера после холодового воздействия произошло статистически значимое повышение уровня АТФ, при этом абсолютное содержание лимфоцитов и концентрации всех измеренных фенотипов статистически значимо снизились. Внутри популяции наиболее всего уменьшился удельный вес CD4⁺ клеток (на 11,2%). В цитокиновом профиле выявлено статистически значимое падение концентрации лимфоцит-активирующего фактора IL-1 β . Важно отметить, что в этой группе изначально до холодового воздействия была выше концентрация провоспалительных цитокинов, что предполагает более высокий фоновый уровень активационных процессов. В связи с чем возможно срабатывание механизмов ингибирования в ответ действие холода. Одним из них является путь, связанный с АМФ-активируемой протеинкиназой, которая способствует увеличению внутриклеточной концентрации АТФ, снижению экспрессии ядерного фактора активированных Т-клеток и ряда других белков, способствующих иммунной активации (Ma E.N. et al., 2017), при этом возрастает активность митохондриального биогенеза, в том числе за счет действия SIRT3. В результате происходит сдвиг дифференцировки в сторону регуляторных клеток и снижение клеточной пролиферации, активации и секреции лимфоцит-активирующего фактора IL-1 β .

Таким образом иммунное реагирование в ответ на действие низких температур проявляется изменениями популяционного состава лимфоцитов, уровня

цитокинов и сопряжено с энергетическим обеспечением иммунокомпетентных клеток.

Полученные результаты показывают, что метаболическая активность и энергетическая обеспеченность лимфоцитов оказывают значительное влияние на функциональную активность клеток и развитие клеточно-опосредованных иммунных реакций. Внутриклеточная концентрация АТФ влияет как на количественные, так и внутриволюляционные изменения пула лимфоцитов периферической крови. Решающую роль в энергетическом обеспечении клеток играет активность гликолитического и митохондриального путей метаболизма, интенсивность работы которых регулируется HIF-1 α и SIRT3.

ВЫВОДЫ

1. Изменение уровня внутриклеточной АТФ проявляется изменением количества и удельного веса субпопуляций лимфоцитов в пуле периферической крови. Увеличение концентрации АТФ наблюдается при низких значениях показателей лимфоцитарного пула с наибольшим удельным весом CD4⁺, CD8⁺, CD10⁺, CD25⁺, CD71⁺ клеток. Снижение уровня АТФ сопровождается повышением общего числа лимфоцитов и их фенотипов и ростом удельного веса CD23⁺, CD95⁺ клеток.

2. Увеличение HIF-1 α /SIRT3 – соотношения концентраций внутриклеточных белков, регулирующих активность гликолиза (HIF-1 α) и митохондриального метаболизма (SIRT3), характеризуется количественными изменениями популяционного состава лимфоцитов с возрастанием удельного веса метаболически активных CD4⁺, CD8⁺, CD10⁺, CD25⁺ клеток.

3. Один из вариантов реагирования на холодное воздействие характеризуется снижением уровня АТФ в лимфоцитах периферической крови, повышением концентраций провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α , изменением удельного веса клеток в пуле лимфоцитов с преимущественным уменьшением CD16⁺ клеток. В другом варианте происходит повышение внутриклеточного уровня АТФ, уменьшение концентрации лимфоцит-активирующего фактора IL-1 β и снижение удельного веса преимущественно CD4⁺ клеток.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов рекомендуется использовать как для анализа изменений популяционного состава иммунокомпетентных клеток, так и для выявления особенностей иммунного реагирования в ответ на какое-либо воздействие.

2. Расчет отношения концентраций регуляторных белков HIF-1 α /SIRT3 позволяет получить информацию об активности гликолитического и митохондриального путей метаболизма, что дает возможность оценить функционирование и жизнеспособность лимфоцитов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ
Публикации в научных изданиях, индексируемых в международных
базах данных Scopus и научных изданиях, включенных ВАК Минобрнауки РФ в
перечень изданий, рекомендованных для опубликования основных научных
результатов диссертаций по медицинским наукам

1. Зубаткина, О.В. Обеспеченность аденозинтрифосфатом лимфоцитов периферической крови у жителей Европейского Севера России / О.В. Зубаткина, Л.К. Добродеева, А.А. Попов [и др.] // Экология человека. – 2020. – Т. 27. – № 8. – С. 20-25. DOI: 10.33396/1728-0869-2020-8-20-25.

2. Зубаткина, О.В. Изменение иммунных показателей и уровня АТФ лимфоцитов периферической крови у северян при кратковременном холодовом воздействии на организм / О.В. Зубаткина, Л.К. Добродеева, С.Д. Круглов // Якутский медицинский журнал. – 2020. – Т. 72. – № 4. – С. 90-93. DOI: 10.25789/ymj.2020.72.22.

3. Зубаткина, О.В. Уровень внутриклеточных регуляторов метаболизма лимфоцитов периферической крови у жителей Европейского Севера России / О.В. Зубаткина, Л.К. Добродеева, А.В. Самодова, С.Д. Круглов // Экология человека. – 2021. – №9. – С. 43-47. DOI: 10.33396/1728-0869-2021-9-43-47.

4. Зубаткина, О.В. Оценка метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов периферической крови / О.В. Зубаткина, Л.К. Добродеева, А.В. Самодова, С.Д. Круглов // Экология человека. – 2022. – Т. 29. – №12. – С. 855-863. DOI: 10.17816/humeco109363.

5. Круглов, С.Д. Влияние внутриклеточной регуляции метаболизма на популяционный состав лимфоцитов периферической крови / С.Д. Круглов, О.В. Зубаткина, А.В. Самодова // Журнал медико-биологических исследований. – 2023. Т. 11. – № 3. – С. 292-301. DOI: 10.37482/2687-1491-Z155.

Статьи, тезисы докладов и статей

6. Круглов, С.Д. Определение содержания SIRT3 и фенотипов лимфоцитов в периферической крови у жителей Архангельска / С.Д. Круглов // Биомониторинг в Арктике: матер II Междунар. конф. (Архангельск, 27-28 октября 2020 г.). – Архангельск: Изд-во Северного (Арктического) федерального университета им. М.В. Ломоносова. – 2020. – С. 27-31.

7. Круглов, С.Д. Определение содержания SIRT3 и фенотипов лимфоцитов у практически здоровых жителей Архангельск и области / С.Д. Круглов // Фундаментальные и прикладные научные исследования: актуальные вопросы, достижения, инновации: материалы XLVII Международной научно-практической конференции (Пенза, 30 июня 2021 г.). – Изд-во МЦНС «Наука и Просвещение». – 2021. – С. 222-225.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМФ	–	аденозинмонофосфат
АТФ	–	аденозинтрифосфат
CD	–	кластер дифференцировки
HIF-1 α	–	индуцируемый гипоксией фактор 1 α
HLADR	–	человеческий лейкоцитарный антиген локус DR
IgE	–	иммуноглобулин класса E
IL	–	интерлейкин
SIRT3	–	сиртуин 3
Th	–	T-хелпер
TNF- α	–	фактор некроза опухоли α
Treg	–	T-регуляторная клетка

Круглов Сергей Дмитриевич

Роль метаболической активности и энергетической обеспеченности лимфоцитов периферической крови в формировании клеточно-опосредованного иммунного ответа

Формат 60×90/16, Усл. печ. л. 1,0

Цифровая печать. Тираж 100 экз.

Подписано в печать 12.10.2023 г. Заказ № 50-0710-1721

ИП Черняева И.Е. ИНН 780420161145

198516, г. Санкт-Петербург,

г. Петергоф, ул. Жарновецкого, д. 6, литера А, кв. 65

Отпечатано в КЦ «Звенигородский»

Россия, г. Санкт-Петербург,

ул. Звенигородская, д. 1, корп. 2, литер А,

пом. 10-Н, ч.п. 411А, 2 этаж

тел: 8 (812) 244-90-90