

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ПРИРОДНЫХ АДАПТАЦИЙ
ФИЦКИА ИМЕНИ АКАДЕМИКА Н.П. ЛАВЕРОВА

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Зубаткина Ольга Владимировна –
доктор биологических наук, профессор

Архангельск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Система иммунитета. Роль различных субпопуляций лимфоцитов в реализации иммунного ответа	9
1.2 Влияние метаболизма на дифференцировку, пролиферацию и функциональную активность лимфоцитов.....	14
1.2.1 Основные метаболические пути, обеспечивающие клетки энергией, их роль в функционировании и судьбе Т-лимфоцитов. Метаболическое перепрограммирование Т-клеток после их активации	15
1.2.2 SIRT3 и NIF-1 α – основные регуляторы Т-клеточного метаболизма и функциональной активности	23
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, ОРГАНИЗАЦИЯ, ОБЪЕМ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	30
2.1 Организация и объем исследования.....	30
2.2 Методы исследования.....	31
2.3 Статистическая обработка результатов	38
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	39
3.1 Влияние обеспеченности АТФ на популяционный состав лимфоцитов периферической крови	39
3.2 Анализ активности путей метаболизма, участвующих в продукции АТФ, по уровню метаболических регуляторов SIRT3 и NIF-1 α в лимфоцитах периферической крови	49
3.3 Влияние изменения внутриклеточной концентрации АТФ на популяционный состав лимфоцитов периферической крови.....	64
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	74
ВЫВОДЫ	83
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	84
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	85
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	114

ВВЕДЕНИЕ

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 [52, 55, 136, 223]. 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 [14, 28, 206].

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 [51, 178, 238]. 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 [35, 50, 119, 185, 205]. 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 предпочитают использовать β -окисление жирных кислот [26, 132, 182, 240]. 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 [178].

Эффективность метаболических перестроек во многом зависит от скоординированной работы регуляторных белков [119, 206]. Особое значение имеют сигнальные молекулы регуляции путей наработки АТФ, таких как гликолиз (HIF-1 α) и окислительное фосфорилирование в митохондриях (SIRT3) [144, 248].

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 и 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 [1, 2, 12, 14, 16, 20, 23, 51, 52, 55, 223]. 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 [4, 5, 7, 8, 10, 11, 15, 241, 243], 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 возросших 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.

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 NIF-1 α и SIRT3 в регуляции этих процессов. Используются общенаучные методы: эксперимент и метод сравнения. Данные обработаны статистическими методами согласно рекомендациям [19].

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.

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).

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 и 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Система иммунитета. Роль различных субпопуляций лимфоцитов в реализации иммунного ответа

Основными функциями иммунной системы являются распознавание, последующая элиминация чужеродных агентов и формирование иммунологической памяти. За реализацию механизмов иммунного ответа отвечают различные популяции лимфоцитов. Т-лимфоциты реализуют механизмы клеточного иммунитета и отвечают за регуляцию развития иммунного ответа, В - лимфоциты отвечают за гуморальный иммунитет [22, 24, 27, 48, 160, 197].

Т-лимфоциты составляют большую часть лимфоцитарного пула периферической крови. В ходе процессов пролиферации и дифференцировки наивные Т – клетки дифференцируются в различные субпопуляции CD4⁺ или CD8⁺ клеток, которые выполняют определенные функции. Дифференциация различных линий зависит от работы сложной сети специфических цитокиновых, сигнальных и транскрипционных факторов, за которыми следуют эпигенетические модификации [1, 53, 77, 114].

Основной функцией клеток Th1 является участие в элиминации внутриклеточных патогенов. В основном они секретируют IFN γ , лимфотоксин α и IL2.

За счет секреции IFN γ происходит активация мононуклеарных фагоцитов, включая клетки микроглии и макрофаги, что ведет к увеличению фагоцитарной активности. Одним из механизмов является стимуляция экспрессии гена, кодирующего IFN γ – индуцируемый ГТФ-связывающий белок, увеличение его концентрации ведет к активации фагоцитоза [46].

Под действием IL-2 происходит пролиферация CD8⁺ лимфоцитов с преобладанием цитотоксического фенотипа. Помимо этого, IL-2 способствует

появлению CD8+ клеток памяти, что необходимо для обеспечения стойкого вторичного иммунитета, необходим он и для дифференцировки Treg [69, 93, 220].

Th2 отвечают за развитие иммунного ответа на внеклеточных паразитов, включая гельминтов и играют важную роль в развитии хронического течения бронхиальной астмы и других аллергических заболеваний. Ключевыми цитокинами, вырабатываемыми этими клетками, являются IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-10, IL-25 и амфирегулин [108, 118, 156, 224].

IL4 является основным цитокином, участвующим в развитии аллергических реакций, поскольку за счет него происходит переключение В-клеток на синтез IgE. IL4 способствует увеличению экспрессии рецепторов к IgE на мононуклеарных фагоцитах и тучных клетках, что способствует усилению дегрануляции последних и выбросу гистамина и серотонина. Также IL-4 может увеличивать секрецию ряда других провоспалительных медиаторов, включая IL6, GM-CSF и молекулы адгезии VCAM-I [85, 106, 111].

IL-5 в основном регулирует работу эозинофилов. поскольку на их мембранах рецептор к IL-5 экспрессируется в значительных количествах. Активация IL5R приводит к увеличению экспрессии CD11b и ингибированию апоптоза [66, 83].

IL9 активно участвует в иммунопатогенезе астмы. Он активировать функцию различных типов клеток, включая тучные клетки, В-клетки, эозинофилы, нейтрофилы, а также эпителиальные клетки дыхательных путей. Было обнаружено, что наряду с гиперсекрецией слизи IL9 высвобождает хемоаттрактантные факторы, что приводит к аллергическому воспалению дыхательных путей [103, 225].

Одной из основных ролей IL-13 является борьба с гельминтами. IL-13, посредством активации клеточно-опосредованного иммунитета, помогает в устранении внутриклеточных патогенов, таких как лейшмания. Он также играет важную роль в индукции аллергической астмы путем активации эозинофилов, усиления секреции слизи и гиперчувствительности дыхательных путей. Мощную стимуляцию фиброза тканей в местах воспаления также связывают с повышенной секрецией IL13 [54, 86].

IL-10 является мощным ингибирующим цитокином, обладающим способностью подавлять провоспалительный ответ и, таким образом, ограничивает повреждение тканей воспалительным процессом [164, 184]. После устранения патогена в ходе иммунного ответа IL-10 помогает снизить интенсивность иммунных реакций за счет ингибирования клеток Th1, а также других иммунных клеток врожденной иммунной системы [129, 184]. IL-10 и TGF- β подавляют выработку IgE, тем самым ослабляя аллергические реакции [18].

IL-25, ранее известный как IL-17E, является членом семейства цитокинов IL-17. IL-25 имеет структуру сходную с IL-17, но функционально отличается. Он способствует развитию иммунного ответа через дифференцировку CD4⁺ в Th2. IL-25 индуцирует повышенную выработку слизи, эозинофилию, переключение В-лимфоцитов на синтез IgE и усиливает секрецию Ig за счет регуляции секреции IL-4, IL-5 и IL-13 [125].

Было обнаружено, что IL-25, из-за усиленной экспрессии IL-13, индуцирует патологические процессы в легком и пищеварительном тракте [116, 125]. Еще одна важная функция IL-25 заключается в подавлении ответа Th17. IL-25 подавляет ответ Th17 путем увеличения экспрессии IL-13, который непосредственно ингибирует выработку цитокинов, необходимых для развития Th17, включая IL-23, IL-1 β и IL-6 активированными дендритными клетками [139].

Амфирегулин является членом семейства эпидермальных факторов роста. Он непосредственно индуцирует пролиферацию эпителиальных клеток [37].

Клетки Th9 относятся к числу недавно описанных подмножеств CD4⁺ Т-хелперных клеток. Они характеризуются устойчивым производством цитокина IL-9, а также IL-10 и IL-21. Подобно клеткам Th2, клетки Th9 полагаются на экспрессию IL-4, STAT6 и GATA-3 для своей дифференцировки, но по мере развития приобретают различные паттерны экспрессии цитокинов [62, 84].

С момента их открытия функция клеток Th9 оценивалась в первую очередь в контексте аллергического воспаления и аутоиммунитета, где было обнаружено, что они обладают провоспалительными функциями, которые усугубляют заболевание [103]. Однако, было показано, что у Th9 также проявляются полезные

противоопухолевые свойства. Обнаружено, что адаптивный перенос дифференцированных клеток Th9 значительно подавлял рост опухоли посредством механизмов, зависящих от продукции IL-9 [31]. Взаимодействие Th9 с другими иммунными клетками, а именно с тучными клетками, являлось основным механизмом, с помощью которого клетки Th9 проявляли противоопухолевое действие [90].

Th17 отвечает за иммунный ответ против внеклеточных бактерий и грибов. Они также участвуют в развитии аутоиммунных заболеваний. Ключевые эффекторный цитокины включают IL-17A, IL-17F, IL-21 и IL-22. Передача сигналов IL-17A и IL-17F происходит через общий рецептор IL-17RA, тем самым предполагая аналогичные функции. Поскольку рецептор IL-17RA экспрессируется в нескольких тканях, например, в кровеносной ткани, коже, легких, кишечнике и суставах, эффект IL-17 выходит за рамки воспалительной реакции, опосредованной T-клетками. IL-17 приводит к индукции провоспалительных цитокинов, в том числе IL-1, IL-6, TNF α , а также провоспалительных хемокинов, обеспечивающих хемотаксис клеток к очагам воспаления [49].

IL-21, будучи цитокином, индуцирующим развитие Th17, обладает pleiotropic функциями, включая активацию T-клеток, индуцирование дифференцировки B-клеток в плазматические клетки и клетки памяти, а также активацию NK-клеток [131].

Известно, что IL-22 опосредует как воспалительную реакцию, так и проявляет защитные свойства в отношении тканей. IL-22 активно участвует в защите слизистой оболочки от бактериальных патогенов, за счет выработки факторов антимикробной защиты и увеличения пролиферации клеток [32].

Treg существует как естественное подмножество, происходящее из тимуса, с экспрессированным FOXP3, и как периферически-индуцированные Treg-клетки, которые дифференцируются из наивных CD4+, CD25+ лимфоцитов после прайминга антигена в соответствующей цитокиновой среде [45]. Они играют важную роль в поддержании иммунологической толерантности к собственным и чужеродным антигенам. После элиминации возбудителей они подавляют

иммунный ответ, тем самым защищая организм от иммунопатологии. Их основные эффекторный цитокины включают IL-10, TGF- β и IL-35 [29].

Клетки CXCR5+, CD4+ T (Tfh) играют значительную роль в регуляции гуморального иммунитета посредством взаимодействия с В-лимфоцитами. После потери CCR7 дифференцированные специфические Tfh клетки попадают в герминативный центр и способствуют дифференцировке В-клеток в Ig-продуцирующие плазматические клетки. В зародышевой области они участвуют в дифференцировке долгоживущих В-клеток памяти. В соответствии с преобладающим секретируемым цитокином, клетки Tfh были классифицированы на Tfh1, Tfh2 и Tfh10 [105].

Tfh1 путем секреции IFN γ способствует производству IgG2. Tfh2 выделяет IL-4, что способствует секреции IgG1 и IgE. Tfh10 через секрецию IL-10, способствует выработке IgA [57].

CD8+ Т-клетки дифференцируются в эффекторные клетки или клетки памяти, которые выполняют специфические роли, опосредующие адаптивный иммунный ответ [176].

Эффекторные CD8+ клетки могут дифференцироваться либо в Tc1 лимфоциты, которые отвечают непосредственно за цитотоксическую функцию, также могут секретировать IFN γ или TNF- α , либо в Tc2, которые в основном продуцируют цитокины IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13, цитотоксическая функция у этой популяции выражена значительно меньше [117].

CD8+ Т-клетки памяти появляются из популяции эффекторных клеток после элиминации антигена. После снижения числа цитотоксических эффекторных клеток часть из них остается и дифференцируется в клетки памяти.

Подмножество CD8+ клеток памяти можно разделить на несколько популяций: центральные, эффекторные и резидентные клетки памяти. Преимущественно их дифференцировка происходит из клеток Tc1 и они имеют ряд различий в выполняемых функциях, расположению и способности к пролиферации.

Центральные клетки памяти (T_{cm}) представляют собой популяцию лимфоцитов, находящихся в лимфатических узлах. Обычно они участвуют в развитии иммунологического ответа при вторичном инфицировании. При попадании патологического агента отвечают быстрой пролиферацией. У человека клетки T_{cm} фенотипически характеризуются совместной экспрессией поверхностных маркеров CD127, CD27 и CD28 [220].

Эффекторные клетки памяти (T_{em}) циркулируют по всему телу, готовые искать и элиминировать клетки-мишени, совпадающие с ранее распознанным антигеном. В отличие от своих аналогов T_{cm}, эти эффекторные клетки памяти не обладают сильной способностью к пролиферации или самообновлению в ответ на инфекцию. Наконец, резидентные в тканях клетки памяти (T_{rm}) представляют собой зрелые цитотоксические лимфоциты, которые «готовы» для вторичных инфекций в исходном месте повреждения или инвазии [249].

1.2 Влияние метаболизма на дифференцировку, пролиферацию и функциональную активность лимфоцитов

Метаболизм является важнейшей физиологической активностью клеток. В иммунных клетках существует шесть основных метаболических путей: гликолиз, цикл трикарбоновых кислот, пентозофосфатный путь, окисление жирных кислот, синтез жирных кислот и метаболизм аминокислот [39, 219]. Их взаимодействие обеспечивает синтез питательных веществ и обеспечение энергией, что необходимо для поддержания жизнедеятельности клеток. Метаболизм клеток - это больше, чем просто процесс биосинтеза и катаболизма АТФ. Метаболиты и метаболические потоки могут регулировать клеточные сигнальные пути и посттрансляционные модификации, что приводит к изменениям в экспрессии генов [149]. Например, на посттрансляционную модификацию гистонов может влиять изменение локальных концентраций ключевых метаболитов, тем самым регулируя транскрипцию и другие функции транскрибируемой ДНК [234, 245]. Метаболическая активность может регулировать клеточный апоптоз и аутофагию [78, 150], а

ферменты могут также действовать как клеточные РНК-связывающие белки, участвуя в посттранскрипционном контроле специфических мРНК [74, 107, 191]. Наконец, метаболиты могут быть непосредственно использованы в качестве сигнальных молекул [130, 183, 209].

Различные состояния, в которых могут находиться лимфоциты, такие как состояния покоя или активации, требуют перестроек метаболизма, совместимых с их функциональными потребностями. Переход между состояниями сопровождается активным перепрограммированием клеточного метаболизма [71, 232]. Наивные Т-клетки быстро перестраивают метаболические сети после активации, чтобы удовлетворить возросшие энергетические потребности. Увеличение энергетических потребностей связано с процессами пролиферации и эпигенетическим ремоделированием. Активированные эффекторные Т-клетки реализуют одну из множества функциональных программ, каждая из которых требует определенных биохимических перестроек. Т-клетки памяти демонстрируют программу схожую с наивными Т-клетками, но сохраняют более высокий уровень метаболической активности. По сравнению с наивными Т-клетками клетки памяти быстрее поглощают глюкозу, участвуют в гликолизе и более эффективно используют глюкозу для синтеза жирных кислот. Каждый переход требует скоординированных адаптаций, управляемых серией сетей передачи сигналов и факторов транскрипции [79, 151, 199, 193].

1.2.1 Основные метаболические пути, обеспечивающие клетки энергией, их роль в функционировании и судьбе Т-лимфоцитов. Метаболическое перепрограммирование Т-клеток после их активации

Метаболическое перепрограммирование иммунных клеток - это общий термин для обозначения реакции иммунных клеток на критические изменения в окружающей среде. Переключение метаболизма происходит за счет изменений в активности ферментов, участвующих в работе метаболических путей, и концентрациях метаболитов [162].

Гликолиз играет важную роль в поддержании жизнедеятельности и функционировании Т-лимфоцитов, поскольку не только является источником АТФ, но также и промежуточных метаболитов, необходимых для поддержания пролиферации, функциональной активности клеток, синтеза и секреции провоспалительных цитокинов, однако помимо этой роли ферменты и неторные метаболиты этого пути могут непосредственно регулировать жизнедеятельность лимфоцитов [228].

Гексокиназа — первый фермент, участвующий в гликолизе, катализирующий фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфата. Индукция гексокиназы-II, тесно связана с активацией в иммунных клетках процессов опосредующих развитие провоспалительных реакций [101, 233]. Фосфорилированная АКТ стабилизирует гексокиназу-II на внешней митохондриальной мембране, где доступ к митохондриальной АТФ значительно облегчается, что затем может быть использовано для фосфорилирования глюкозы до глюкозо-6-фосфата [58, 94]. MitoHK-II также играет антиапоптотическую роль, предотвращая образование переходной поры проницаемость мембраны митохондрий белками семейства Bcl-2, в частности Bax [112, 187]. Механизм этого процесса включает PI3K-АКТ-опосредованное фосфорилирование гексокиназы-II, что предотвращает глюкозо-6-фосфат-опосредованную диссоциацию гексокиназы-II от мембраны митохондрии [58]. Таким образом, посттрансляционные модификации гексокиназы-II одновременно способствуют ее активности как гликолитического фермента, так и антиапоптотическим функциям.

При активации иммунные клетки усиливают регуляцию гексокиназы-II [146], а также других членов семейства гексокиназ [218]. Вмешательства, направленные на изменение активности этих ферментов, блокируют гликолиз, что ведет к нарушению эффекторной функции и снижению выживаемости клеток [223].

GAPDH представляет собой фермент, который катализирует превращение глицеральдегид-3-фосфата в 1,3-бисфосфоглицерат в процессе гликолиза. GAPDH хорошо известен своими многочисленными неметаболическими функциями [113]. В исследованиях на Т-клетках было показано, что GAPDH является сенсором

энергии, который регулирует трансляцию мРНК про-воспалительных цитокинов в зависимости от доступности глюкозы в клетке. Когда концентрация глюкозы низкая, GAPDH связывается с элементами, богатыми AU, в 3'-нетранслируемой области мРНК, кодирующих IFN γ и IL-2 [230, 239]. Связывание GAPDH с этими транскриптами подавляет их трансляцию, тем самым ограничивая продукцию цитокинов во время депривации глюкозы. Богатые 3'AU элементы не являются уникальными особенностями мРНК IFN γ и IL-2, и вполне вероятно, что GAPDH может регулировать трансляцию и других цитокинов [75]. Для гликолитической реакции, катализируемой GAPDH, требуется НАД $^{+}$, который является важным индикатором клеточного окислительно-восстановительного состояния, однако, было показано, что НАД $^{+}$ связывающая структура GAPDH может работать в качестве РНК-связывающего домена [172]. Это позволяет предположить, что любой НАД $^{+}$ -зависимый фермент может связываться с РНК. Депривация глюкозы, однако, повышает уровень внутриклеточного НАД $^{+}$, который, как можно ожидать, будет конкурировать с РНК за возможность занять активный центр GAPDH. Таким образом, вероятно, существуют дополнительные уровни регуляции, управляющие ролью GAPDH как трансляционного репрессора, который функционирует во время депривации глюкозы и/или в ответ на колебания НАД $^{+}$ [194].

α -енолаза катализирует превращение 2-фосфоглицерата в фосфоенолпируват в процессе гликолиза. Ген, кодирующий α -энолазу Eno1, производит один транскрипт с двумя сайтами начала трансляции. В зависимости от места инициации трансляции Eno1 может генерировать полноразмерный канонический фермент α -енолазу (48 кДа), который участвует в гликолизе, или укороченную версию α -енолазы (37 кДа), также известную как MBP-1, который репрессирует пролиферативный фактор транскрипции c-Myc [175]. c-Myc является главным регулятором метаболической адаптации в Т-клетках [126]. При его недостатке наблюдаются нарушение роста и пролиферации Т-лимфоцитов при воздействии митогенных стимулов. MBP-1 репрессирует c-Myc путем связывания и ингибирования образования комплекса инициации транскрипции на промоторе c-Myc [140]. В то время как α -енолаза локализуется в цитоплазме, MBP-1

преимущественно перемещается в ядро, где выполняет эти репрессивные функции [127]. Сигналы, влияющие на дифференциальную трансляцию α -енолазы по сравнению с МВР-1 неясны. Предполагается, что гипоксия может быть одним из факторов, способствующих трансляции полноразмерной α -енолазы [59, 190].

Индукция МВР-1 функционально влияет на воспалительные реакции Т-клеток в контексте аутоиммунитета. Недавнее исследование показало, что противовоспалительная популяция CD4⁺ Т-клеток человека экспрессирует высокие уровни МВР-1. Более того, МВР-1 в Treg потенцирует экспрессию белка FoxP3, который, как известно, сильно подавляет воспалительные иммунные реакции, особенно те, которые опосредованы транскрипционным фактором. ROR γ T [145] и GM-CSF [207]. Treg повышают экспрессию обоих продуктов гена Eno1, однако супрессивные эффекты МВР-1 в этом случае могут преобладать над метаболическими, в частности над активацией гликолиза и стимуляцией провоспалительных реакций, которым способствует полноразмерная α -енолаза. Таким образом, индуцирование транскрипционной активности в гене Eno1 может быть достаточно для повышения уровней белка МВР-1 до иммуносупрессивных уровней без блокирования гликолиза [92].

Пируваткиназа представляет собой АТФ-генерирующий фермент, который катализирует превращение фосфоенолпирувата в пируват во время гликолиза. Существуют четыре изоформы пируваткиназы, причем в лейкоцитах преимущественно экспрессируются изоформы М1 и М2 [188]. Пируваткиназа М2 является основной изоформой, экспрессируемой на уровне белка лимфоцитами [168]. РКМ1 и РКМ2 представляют собой альтернативно сплайсированные изоформы пируваткиназы, которые отличаются включением одного экзона (экзон 9 для РКМ1 по сравнению с экзоном 10 для РКМ2), из которых различаются только 22 аминокислотных остатка [250]. Структуры РКМ1 и РКМ2 очень похожи, но важно то, что небольшая разница в аминокислотной последовательности позволяет РКМ2 способствовать воспалительным реакциям иммунных клеток [128]. В то время как РКМ1 существует исключительно как тетрамер, который функционирует как гликолитический фермент, РКМ2 может существовать как тетрамер с

функциями, аналогичными РКМ1, или как димер, который теряет активность как гликолитический фермент, но может выполнять множество других негликолитических функций. С точки зрения гликолиза, эта динамическая особенность РКМ2 снижает её эффективность в качестве гликолитического фермента и позволяет накапливать предшествующие гликолитические промежуточные продукты, тем самым способствуя биосинтезу аминокислот и липидов *de novo* — процессам, которые имеют решающее значение для образования дочерних клеток [201]. В контексте развития провоспалительных реакций димер РКМ2 может локализоваться в ядре, где он выступает в качестве коактиватора при транскрипции гена NF- κ B [165]. Это взаимодействие имеет важное значение для последующей активации транскрипции ЛДГ-А и провоспалительных цитокинов, например, IL-1 β . Сходным образом STAT3 и AhR также требуют взаимодействия с РКМ2 для связывания с ДНК [133, 143]. Таким образом, димер РКМ2, по-видимому, играет уникальную роль прямого модулятора пролиферативной и воспалительной активности клеток, поскольку, AhR, STAT3 и NF- κ B являются хорошо известными регуляторами дифференцировки клеток Th17 [153].

ЛДГ представляет собой тетрамерный фермент, состоящий из субъединиц А и В, которые при объединении образуют комплекс, способный превращать пируват в лактат. Эта реакция является определяющим этапом аэробного гликолиза [102]. Активированные иммунные клетки увеличивают регенерацию НАД⁺, потребляемого во время гликолиза, путем производства лактата независимо от содержания кислорода в окружающей среде [157]. Т-клетки в основном экспрессируют А-субъединицы ЛДГ. ЛДГ-А имеет важное значение для регуляции продукции стимулирующего воспаления цитокина IFN γ . Было показано, что снижение экспрессии ЛДГ-А в Т-клетках повышает потребление ацетил-КоА, полученного в результате гликолиза, через цикл трикарбоновых цикловых кислот и истощает внутриклеточные запасы этого метаболического побочного продукта катаболизма глюкозы. Истощение ацетил-КоА приводит к нарушению

ацетилирования гистонов, которое необходимо для открытия локуса IFN γ во время активации Т-клеток [60].

В дополнение к способности ЛДГ-А косвенно модулировать эпигенетический ландшафт активированных Т-клеток, есть данные, свидетельствующие о том, что этот фермент также может напрямую влиять на протекание активации Т-клеток способом, напоминающим прямую репрессию трансляции мРНК IFN γ и IL-2 гликолитическим ферментом GAPDH, сообщалось, что ЛДГ-А связывается с богатыми 3'AU элементами в мРНК GM-CSF. Остается неясным, как мРНК-связывающие свойства ЛДГ-А влияют на экспрессию нижестоящих белков и, кроме того, связана ли эта неметаболическая функция с активностью [235].

Изменения в метаболизме иммунных клеток могут происходить под воздействием цитокинов и при антигенной стимуляции. Затем происходит метаболическое перепрограммирование, влияющее на исход иммунного ответа. Уровень метаболической активности самой клетки также тесно связан с ее функциональной активностью [228].

Активация Т-клеток инициируется стимуляцией TCR за счет вовлечения родственных комплексов пептид-MHC, а также лигирования корцептора CD28 с костимулирующими молекулами на антигенпрезентирующей клетке [171]. Активация TCR и костимуляция инициируют дискретные наборы сигнальных каскадов, которые коллективно опосредуют выход наивных Т-клеток из состояния покоя. В широком смысле, стимуляция TCR способствует передаче сигналов через пути ERK/MAPK и увеличению притока кальция внутрь клетки. Передача сигналов CD28 активирует ось PI3K-AKT-mTOR, и оба пути вместе задействуют путь NF- κ B [147, 209]. Кроме того, факторы роста, например, IL-2, также, как и TCR, могут стимулировать передачу сигналов чрез PI3K-AKT-mTOR [214]. Из этих путей передачи сигнала ось PI3K-AKT-mTOR и Мус считаются основными регуляторами ранних метаболических изменений, связанных с активацией и дифференцировкой Т-клеток [173].

Наивные CD4⁺ Т-клетки требуют поддержания определенного уровня метаболической активности, синтез АТФ им требуется для выживания и миграции через лимфатическую систему, где они активно отбирают антигены, представленные дендритными клетками. Метаболические потребности наивных CD4⁺ Т-клеток удовлетворяются за счет окисления глюкозы и жирных кислот через пути митохондриального β -окисления и OXPHOS [100]. В отсутствие антигенной стимуляции передача сигналов через рецептор IL-7 и TCR способствует выживанию наивных CD4⁺ Т-клеток, индуцируя экспрессию переносчика глюкозы GLUT1 [159, 198]. Увеличение экспрессии GLUT1 и поглощения глюкозы происходит зависимым от PI3K/AKT образом, что позволяет клеткам поддерживать митохондриальный потенциал и гомеостаз АТФ. Соответственно, в отсутствие адекватных внешних сигналов экспрессия GLUT1 на клеточной поверхности снижается, что приводит к уменьшению поглощения глюкозы, падению потенциала митохондриальной мембраны, снижению синтеза АТФ и, в конечном итоге, к гибели клеток. То, что это снижение жизнеспособности происходит в присутствии достаточного количества глюкозы и O₂, свидетельствует о том, что передача сигналов фактора роста необходима для поддержания метаболического гомеостаза в наивных CD4⁺ Т-клетках [68].

Покой наивных Т-клеток прерывается при вовлечении TCR в специфический комплекс антиген/МНС класса II, представленный на поверхности дендритных клеток, одновременно с распознаванием костимулирующих молекул рецептором CD28. Эти два сигнала запускают активацию Т-клеток, секрецию IL-2, клеточную пролиферацию, называемую клональной экспансией, и их дифференцировку в эффекторный фенотип. Эти изменения в статусе активации CD4⁺ Т-лимфоцитов требуют не только энергии, но и увеличения потребности в метаболических предшественниках для биосинтеза белков, нуклеиновых кислот и липидов для подпитки клональной экспансии и последующей дифференцировки в эффекторные клетки. Следовательно, эффективная активация Т-клеток требует глубоких изменений в клеточном метаболизме [155].

Хотя аэробный гликолиз менее эффективен с точки зрения производства энергии, он генерирует промежуточные продукты метаболизма, которые используются в анаболических путях, необходимых для поддержания роста клеток и образования дочерних клеток. Однако в недавних исследованиях было продемонстрировано, что окислительное фосфорилирование сильно индуцируется во время активации CD4⁺ Т-клеток [87]. При сравнении активности метаболических путей CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, было выявлено, что они используют разные метаболические стратегии для удовлетворения своих функциональных потребностей. После активации в CD8⁺ Т-клетках наблюдалась более высокая активность гликолиза, чем в CD4⁺ Т-клетках. С другой стороны, CD4⁺ Т-клетки также индуцировали гликолиз, но при этом активность митохондриального биогенеза и OXPHOS, была выше, чем в CD8⁺ [97]. Таким образом, очевидно, что активация Т-клеток не сопровождается простым переключением с окислительного метаболизма на гликолиз, необходима активация обоих путей для удовлетворения биоэнергетических потребностей.

Развитие эффективного и сбалансированного иммунного ответа в значительной степени определяется статусом дифференцировки (наивные/память) и эффекторным профилем Т-клеток (Th1, Th17 и Treg) и контролируется различными метаболическими перестройками. Каждая из этих линий имеет отличительные функциональные свойства, в значительной степени определяемые продукцией определенного поднабора цитокинов. Дифференцировка активированных Т-клеток определяется интеграцией множества сигналов, присутствующих в иммунном микроокружении в момент активации [40].

Митохондриальный метаболизм играет доминирующую роль в развитии Т-клеток памяти, долговременном выживании и способности быстро реагировать на повторное воздействие антигена. Первоначальные исследования, подчеркивающие важность перехода от высоко анаболических эффекторных популяций Т-клеток к более спокойным популяциям Т-клеток памяти, продемонстрировали, что развитие популяций Т-клеток памяти зависело от ограничения аэробного гликолиза и участия митохондриального OXPHOS [122]. Переход на митохондриальный

метаболизм также был связан со способностью Т-клеток памяти к быстрому воспроизведению после повторной стимуляции антигеном [63].

1.2.2 SIRT3 и HIF-1 α – основные регуляторы Т-клеточного метаболизма и функциональной активности

HIF1 транскрипционно регулирует гены, участвующие в энергетическом метаболизме как при физиологических, так и при патологических состояниях, а зависящая от HIF1 регуляция клеточного энергетического метаболизма служит для регулирования продукции АТФ при снижении содержания кислорода, что обеспечивает выживание клеток. HIF1 адаптирует энергетический обмен, усиливая экспрессию метаболических ферментов. Таким образом, HIF1 считается главным драйвером метаболической адаптации к гипоксии. HIF1-зависимые гены контролируют использование клеточной глюкозы и снижают потребление кислорода, чтобы уменьшить метаболическую зависимость от кислорода при сохранении достаточной для жизнедеятельности клетки концентрации АТФ. Кроме того, HIF1 может уменьшать митохондриальную массу за счет усиления митофагии и снижения митохондриального биогенеза [142].

Фактор транскрипции HIF-1 α конститутивно продуцируется на высоком уровне в большинстве типов клеток. В присутствии достаточных уровней молекулярного кислорода α -субъединицы HIF1 гидроксилируются по определенным остаткам пролина тремя 2-оксоглутарат-зависимыми белками, содержащими домен пролилгидроксилазы (PHD1, PHD2 и PHD3), что приводит к убиквитинированию HIF-1 α комплексом убиквитинлигазы E3, рекрутируемым белком VHL, и протеасомной деградации [33]. Гидроксилирование 2-оксоглутарат-зависимым фактором, ингибирующим HIF (FIH), делает α -субъединицы HIF1 неспособными связываться с их коактиваторами транскрипции, гистон-ацетилтрансферазами CBP и p300, предотвращая образование функционального транскрипционного комплекса, тем самым подавляя активность HIF кислородзависимым образом. Однако в условиях гипоксии ферментативная

активность гидроксилаз PHD и FIH HIF снижается, тем самым стабилизируя α -субъединицы HIF и повышая их транскрипционную активность соответственно. Стабилизированные α -субъединицы HIF могут транслоцироваться в ядро, где HREs в пределах регуляторных областей ДНК HIF-чувствительных генов усиливают их транскрипцию [242].

Помимо пути, зависящего от кислорода, существует ряд механизмов регуляции активности HIF-1 α , которые не зависят от кислорода. На уровне транскрипции продукция мРНК HIF-1 α контролируется рядом транскрипционных факторов. Хотя базальные скорости транскрипции HIF-1 α обычно высоки, различия в скоростях транскрипции могут быть частично опосредованы изменением занятости сайтов связывания SP1 в промоторе HIF-1 α факторами транскрипции, которые распознают цис-действующие элементы в пределах 5' UTR [104].

Стимулы, такие как АФК, могут индуцировать транскрипцию мРНК HIF-1 α способом, зависящим от активации пути NF- κ B. ANGII увеличивает экспрессию мРНК HIF-1 α посредством АФК-зависимой активации киназы PI3 и путей PKC [89]. Медиаторы воспаления и бактериальные продукты, такие как липополисахарид, также могут стимулировать транскрипцию HIF-1 α посредством NF- κ B-зависимых путей [64]. Антиоксидантный фактор транскрипции NRF2 регулирует экспрессию мРНК HIF-1 α при нормоксии, однако более заметно регуляторный эффект проявляется при реоксигенации после гипоксии [174]. STAT3 также регулирует экспрессию HIF-1 α [80].

В дополнение к механизмам, изложенным выше, общий уровень активности HIF1 может модулироваться рядом других клеточных сигналов, включая физиологические газы, отличные от кислорода, например, оксид азота, углекислый газ, АФК и наличием кофакторов гидроксилазы HIF, в частности Fe 2+ и α -кетоглутарат [210].

Из-за широкого спектра генов, активность которых регулируется посредством HIF1, его метаболические эффекты очень многообразны. Далее будет рассмотрено влияние HIF1 гликолиз.

При гипоксии HIF1 увеличивает экспрессию PDK1. Этот фермент ингибирует митохондриальную пируватдегидрогеназу путем фосфорилирования, предотвращая превращение пирувата в ацетил-КоА, тем самым ограничивая его доступность для цикла трикарбоновых кислот. Это подавляет митохондриальное потребление кислорода и перенаправляет пируват на гликолиз [192]. Такой переход от окислительного к гликолитическому метаболизму эффективно снижает доступность клеточного кислорода для производства АТФ. Кроме того, снижение потребления кислорода митохондриями приводит к уменьшению митохондриальной продукции АФК, защищая клетку от повреждения [120].

Гликолиз менее эффективен с точки зрения производства АТФ на молекулу глюкозы, чем окислительный метаболизм. Для предотвращения биоэнергетического кризиса повышенная активность HIF усиливает поток глюкозы за счет увеличения экспрессии переносчиков глюкозы GLUT1 [161]. Более того, HIF1 усиливает экспрессию всех гликолитических ферментов, включая гексокиназы (HK1 и HK2), фосфофруктокиназы (PFKL и PFKP), альдолазы (ALDA и ALDC), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), фосфоглицераткиназы 1 (PGK1), енолазы (ENO1 и ENO2) и пируваткиназы M (PKM). Наконец, HIF1 усиливает экспрессию ЛДГ-А и МСТ4. ЛДГ-А превращает пируват в лактат и регенерирует НАД⁺, который необходим GAPDH для поддержания активности гликолитического расщепления глюкозы. МСТ4 удаляет лактат из клетки, транспортируя его во внеклеточное пространство. Следовательно, HIF1 запускает переключение с окислительного на гликолитический метаболизм, событие, которое имеет значение не только для клеточной биоэнергетики, но также и для клеточной функции и судьбы [138].

HIF-1 α играет важную функцию в развитии и дифференцировке лимфоцитов. Было показано, что HIF-1 α влияет на дифференцировку и функционирование различных субпопуляций Т-клеток как в гипоксических, так и в нормоксических условиях. В исследованиях была продемонстрирована различная гликолитическая активность в дифференцирующихся клетках Th1, Th2, Th17 и Treg, при этом воспалительные клетки Th17 демонстрируют наибольшую индукцию гликолиза, а

противовоспалительные Treg демонстрируют наименьшую. HIF-1 α участвует в регуляции этих гликолитических изменений [101]. В условиях гипоксии доля клеток, продуцирующих IL-17, увеличивалась, тогда как доля клеток FOXP3⁺ Treg значительно снижалась. STAT3 необходим для индукции HIF-1 α в дифференцирующихся клетках Th17. STAT3 активируется IL-6, IL-21 и IL-23 и может напрямую связываться с промотором HIF-1 α , повышая его экспрессию [212]. HIF-1 α играет непосредственную роль в дифференцировке Th17 посредством транскрипционной активации ROR γ t. Затем ROR γ t может образовывать комплекс с HIF-1 α и p300 на промоторе IL-17, усиливая его экспрессию [213].

HIF-1 α , по-видимому, играет разные роли в дифференцировке Th1 в зависимости от окружающей среды. В клетках Th1 усиление гликолиза играет центральную роль в их дифференцировке, однако гипоксия ингибирует IFN γ -продуцирующие клетки Th1. Активация STAT3 усиливается в клетках Th1 в условиях гипоксии, что приводит к увеличению внутриклеточного содержания HIF-1 α . Это увеличение HIF-1 α приводит к усилению продукции IFN γ . Частично это связано с увеличением уровня ЛДГ-А, повышающей уровень ацетил-КоА, что приводит к усилению ацетилирования гистонов и транскрипции IFN γ . В промоторе IFN γ также имеется сайт связывания HRE. Несмотря на это, в условиях гипоксии клетки Th1 ингибируют экспрессию IFN γ , и для этого ингибирования необходим HIF-1 α . Действительно, доля клеток, продуцирующих IFN γ , сильно снижается в условиях гипоксии по сравнению с нормоксическими условиями. Однако при повышении уровня HIF-1 α в отсутствие гипоксии увеличивается экспрессия IFN γ . VHL^{-/-} Treg, которые конститутивно экспрессируют HIF-1 α , демонстрируют увеличение экспрессии IFN γ наряду со снижением экспрессии FOXP3, что приводит к снижению FOXP3⁺ Treg и увеличению Th1-подобных эффекторных Т-клеток. Выключение PHDs в Т-клетках также приводит к накоплению HIF-1 α , уменьшению Treg и увеличению IFN γ -секретирующих Th1-клеток. Это предполагает сложную роль HIF-1 α в дифференцировке и регуляции Т-клеток [46].

HIF1 также играет важную роль в функционировании CD8⁺ Т-клеток. Экспрессия мРНК и белка HIF-1 α увеличивается в CD3/CD28 активированных

CD8⁺ Т-клетках, и это увеличение регулируется mTORC1 и 2. HIF-1 α необходим для увеличения гликолиза в цитотоксических Т-клетках после стимуляции TCR и способствует экспрессии многих факторов, участвующих в дифференцировке эффекторных CD8⁺ Т-клеток памяти. Было продемонстрировано, что CD8⁺ Т-клетки, лишенные HIF-1 α , демонстрируют сниженную экспрессию гликолитических ферментов наряду со сниженной экспрессией эффекторных цитокинов IFN γ и TNF α после стимуляции TCR. Делеция VHL приводила к увеличению экспрессии HIF-1 α в CD8⁺ Т-клетках, что приводило к усилению эффекторной функции при хронической инфекции и значительно обостряло воспалительные реакции [222].

В целом, при нормоксии HIF-1 α играет критическую роль в дифференцировке эффекторных Т-клеток Th1, Th17 и CD8⁺, ингибируя Treg. Индукция гликолиза с помощью HIF-1 α оказывается жизненно важной для этой функции. Снижение экспрессии HIF-1 α в Т-клетках приводит к дифференцировке наивных клеток в Treg, что обеспечивает увеличение выживаемости. Однако роль HIF-1 α в дифференцировке и активации Т-клеток сложна и зависит от действия внеклеточных сигналов и условий микроокружения клетки.

Несмотря на то, что активированные Т-клетки используют аэробный гликолиз для получения АТФ, митохондрии также играют значимую роль. Помимо производства энергии, эти органеллы участвуют в гомеостазе кальция, синтезе липидов, апоптозе, передаче сигналов и регуляции клеточного цикла. Митохондрии выполняют анаболическую роль в создании основных строительных блоков для синтеза макромолекул во время пролиферации. Поэтому регуляция митохондриального метаболизма также оказывает значительное влияние на работу иммунных клеток [227].

SIRT3 является одной из наиболее важных деацетилаз, локализуется главным образом в митохондриальном матриксе и играет важную роль в регуляции митохондриального метаболизма [141]. Например, деацетилирование пируватдегидрогеназного комплекса с помощью SIRT3 во время гликолиза позволяет пирувату активнее метаболизироваться в цикле Кребса и ускоряет

поглощение глюкозы за счет активации протеинкиназы B [166]. SIRT3 также обеспечивает нормализацию β -окисления жирных кислот путем деацетилирования длинноцепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы и ацетил-КоА-синтетазы 2 и участвует в образовании кетоновых тел путем деацетилирования 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-синтетазы. Деацетилирование глутамат-дегидрогеназы с помощью SIRT3 способствует утилизации аминокислот. SIRT3 также играет важную роль в обеспечении нормальной работы ТСА путем деацетилирования сукцинатдегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназы. Кроме того, деацетилирование с помощью SIRT3 многочисленных субъединиц комплекса I-V в окислительной дыхательной цепи указывает на важность этого фермента в поддержании работы цепи переноса электронов и синтезе АТФ. SIRT3 также предотвращает или задерживает повреждение, вызванное окислительным стрессом, путем активации многих антиоксидантных факторов, включая FOXO3 и изоцитратдегидрогеназу 2 [226].

Было показано, что при дефиците SIRT3 в Т-клетках происходит значительное снижение интенсивности реакции трансплантат против хозяина. Этот эффект был связан со сниженной пролиферацией Т-клеток и экспрессией CXCR3 без значительного влияния на секрецию цитокинов или цитотоксические функции. Более того, дефицит SIRT3 не влиял на иммунный ответ против бактериальных и грибковых инфекций, указывая на то, что SIRT3 может играть ограниченную роль в функциях Teff клеток [215].

Ингибирование OXPNS ухудшает функцию Treg-клеток. Фактически, при дефиците SIRT3, у Treg-клеток наблюдалось нарушение супрессорных функций, что продемонстрировано в *in vitro* исследовании супрессии на модели аллотрансплантата, где было обнаружено, что делеция HDAC9 увеличивает супрессорную активность Treg за счет усиления экспрессии SIRT3 [70].

Можно увидеть, что HIF1- α задействован в регуляции многих процессов, отвечающих за поддержание жизнедеятельности клетки. Основной точкой приложения для HIF1- α является гликолитический путь, экспрессия ферментов которого находится под контролем HIF1- α . SIRT3 в свою очередь участвует в

регуляции большинства метаболических процессов в митохондриях. Вместе эти оказывают значительное влияние на процессы пролиферации, дифференцировки и адаптации Т-клеток.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, ОРГАНИЗАЦИЯ, ОБЪЕМ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Организация и объем исследования

В соответствии с планом работы, на базе лаборатории экологической иммунологии ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН было проведено комплексное обследование, включающее оценку иммунологических параметров и энергетической обеспеченности лимфоцитов. В исследовании приняло участие 196 человек. Средний возраст составил 35 (12) лет. Из них женщин 123, мужчин 73. Отбор биологического материала проводился у жителей Архангельска и Коношского района.

Иммунологическое обследование включало в себя измерение следующих параметров: абсолютная концентрация лимфоцитов, CD4+, CD8+, CD71+, CD95+, CD16+, CD3+, HLADR+, CD10+, CD23+, CD25+. Для оценки энергетической обеспеченности лимфоцитов производились измерения внутриклеточного содержания АТФ, HIF1- α и SIRT3. При оценке холодового воздействия использовалась холодовая камера, где волонтер находился в течение 5 минут при температуре -25 C^0

Все исследования проводились в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта» (2013).

Для включения в исследование волонтер должен был соответствовать следующим критериям:

1. В течение месяца не выявлялись острые заболевания и/или обострение хронической патологии.

2. Возраст 18 лет или старше.

Критериями исключения являлись:

1. Выявление острой и/или хронической патологии в период не превышающий месяц до момента обследования.
2. Возраст младше 18 лет.

2.2 Методы исследования

Для измерения перечисленных параметров у волонтеров отбиралась венозная кровь из локтевой вены. Отбор материала производился утром строго натощак. В случае проведения холодной пробы кровь отбиралась дважды, второй раз сразу после 5-ти минутного пребывания в холодной камере. Схема дизайна исследования представлена на рисунке 1.

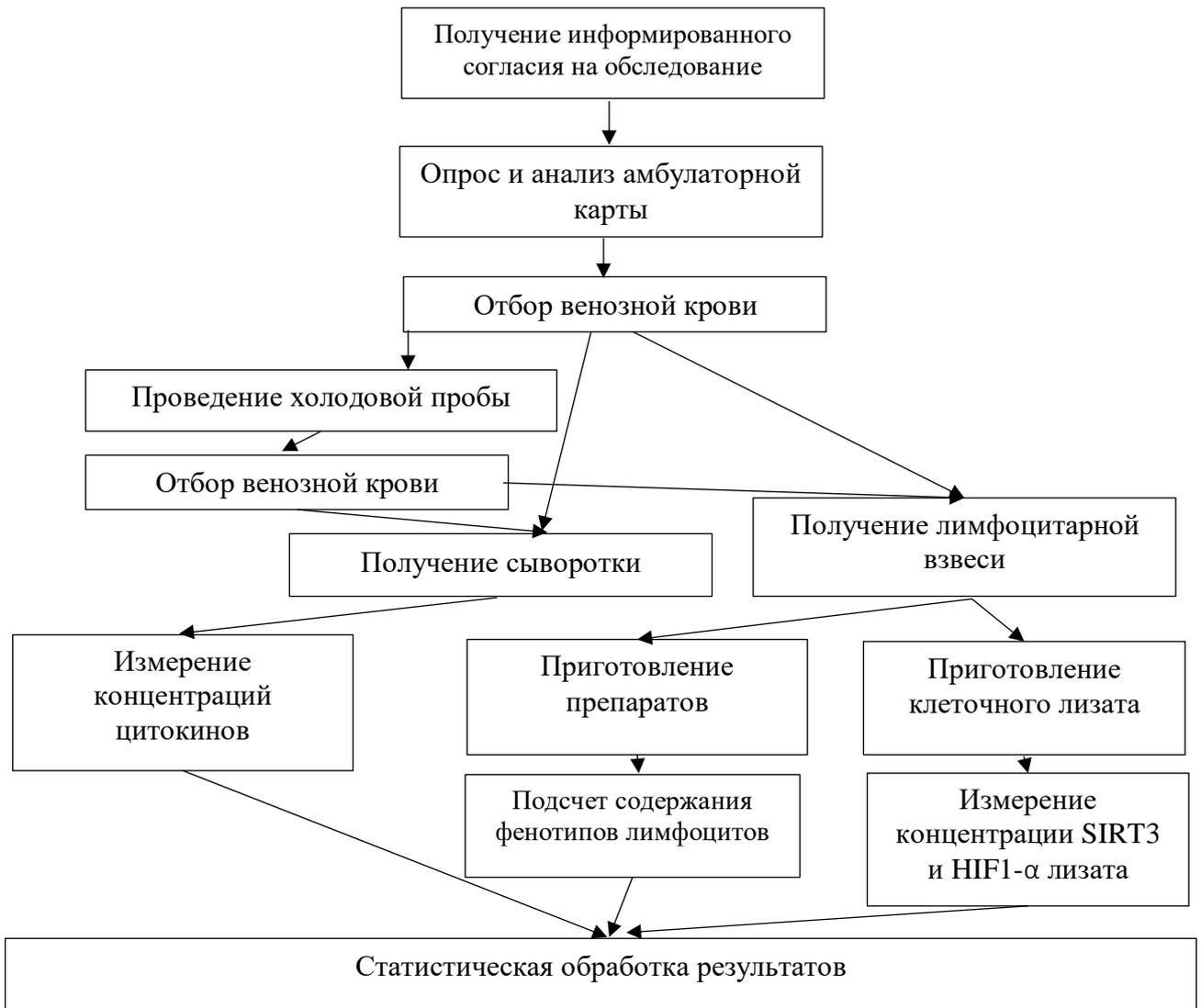


Рис. 1. Схема дизайна исследования

Методика получения лимфоцитарной взвеси

Получение биологического материала (венозной крови) производится из локтевой вены в вакуумную пробирку с ЭДТА в объеме 5 мл. После взятия кровь перемешивают, плавно переворачивая пробирку вверх дном. Для нормального перемешивания крови с антикоагулянтом процедуру нужно повторить 5-8 раз. Неохлажденные пробы необходимо использовать в течение часа для последующего фракционирования лимфоцитарной взвеси, либо хранить не более суток при температуре от +4°C до +8°C. Цельная кровь не подлежит заморозке. До начала выделения в полученной пробе измерялась абсолютная концентрация лимфоцитов на гематологическом анализаторе.

Для выделения лимфоцитарной взвеси в центрифужную пробирку объемом 10 мл (№1) при помощи пипетки Пастера вносят 3 мл венозной периферической крови из вакуумной пробирки. Далее в пробирку №1 при помощи пипетки Пастера аккуратно, по стенке пробирки, добавляют 2 мл физиологического раствора. В центрифужную пробирку объемом 10 мл (№2) при помощи пипетки Пастера вносят фиколл-верографин объемом 2 мл и аккуратно, по стенке пробирки, при помощи пипетки Пастера добавляют содержимое пробирки №1 в соотношении 4 к 1.

Пробирку №2 помещают в центрифугу и выставляют следующие параметры: скорость вращения 3000 оборотов/минута, ускорение, равное 400 G, время - 30 минут. После окончания центрифугирования надосадочное «облако» лимфоцитов из пробирки №2 при помощи дозатора вносят в пробирку №3 и аккуратно, по стенке пробирки, добавляют физиологический раствор при помощи пипетки Пастера доводя до объема 10 мл. Пробирку №3 помещают в центрифугу и выставляют параметры: скорость вращения 3000 оборотов/минута, ускорение, равное 400 G, 25 минут. Процедура отмывки повторялась 2 раза.

После отмывки в пробирку №3 добавляют 2 мл физиологического раствора, осадок ресуспензировался, 1 мл отбирался для приготовления клеточного лизата, а из оставшейся части готовились препараты для подсчета фенотипов лимфоцитов.

Методика приготовления препаратов

Препараты для подсчета концентраций лимфоцитов с фенотипами CD4+, CD8+, CD71+, CD95+, CD16+, CD3+, HLADR+, CD10+, CD23+, CD25+ готовились методом высушенной капли. Для этого на предметное стекло наносились до 5 капель полученной лимфоцитарной взвеси, после чего препарат высушивался на воздухе при комнатной температуре. После высушивания препарат фиксировался в этиловом спирте 95% в течение 20 минут.

Окраска препаратов и подсчет концентрации фенотипов лимфоцитов

Для определения концентраций фенотипов лимфоцитов применялся метод непрямой иммунопероксидазной реакции с использованием моноклональных антител. Принцип метода основан на взаимодействии антитела с антигеном, в качестве которого выступает один из кластеров дифференцировки.

Окраска препарата проводится в несколько этапов. Сначала необходимо обработать фиксированные препараты перекисью водорода для того чтобы ингибировать собственную пероксидазу лимфоцитов. Перекись наносится на 10 минут, инкубация проводится во влажной камере. После следует 5-ти кратная отмывка препарата физиологическим раствором. Далее наносится раствор моноклональных антител, после 30 минут инкубации процедура отмывки также повторяется 5 раз, после чего на стекло наносится раствор конъюгата, далее следует 30-ти минутная инкубация и отмывка. После отмывки на препарат наносится раствор хромогена, инкубируют 15 минут и отмывают физиологическим раствором, докрашивают раствором бриллиантового зеленого, высушивают и микроскопируют с использованием окуляра x15 и объектива x1000. Подсчитывается 100 лимфоцитов, количество окрашенных хромогеном лимфоцитов относительно остальных клеток показывает процентное содержание клеток с измеряемым кластером дифференцировки. Для получения абсолютного значения доля окрашенных хромогеном лимфоцитов умножается на абсолютную концентрацию лимфоцитов, измеренную в цельной крови.

Измерение содержания АТФ в лимфоцитах

Измерение концентрации АТФ в лимфоцитах производилось с использованием биoluminesцентного метода при помощи люциферин-

люциферазной реакции. Метод основан на расщеплении АТФ до АДФ под действием фермента люциферазы. В ходе реакции наблюдается свечение, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации АТФ в лимфоцитарной взвеси. Полученное значение пересчитывалось на количество лимфоцитов во взвеси.

Приготовление клеточного лизата

Для приготовления лизата из лимфоцитов в коническую пробирку отбирался 1 мл хорошо перемешанной лимфоцитраной взвеси. Перед процедурой лизирования в полученной взвеси на автоматическом гематологическом анализаторе измерялась концентрация лимфоцитов. После измерения пробирка со взвесью центрифугировалась на скорости вращения 3000 оборотов/минута, ускорение, равное 400 G в течение 10 минут. Надосадочная жидкость аккуратно удалялась при помощи дозатора. После следовала промывка фосфатным буфером. Для этого в пробирку к осадку добавлялся 1 мл холодного фосфатного буфера (температура не более +7 C⁰), после чего осадок перемешивался, и пробирка снова центрифугировалась 10 минут 3000 оборотов/минута, фосфатный буфер удалялся и заменялся на новый. Процедура отмывки повторялась 3 раза.

После выполнения отмывки в пробирку добавлялся лизирующий раствор до метки 1 мл. Для приготовления лизата использовался лизирующий раствор №4 производства компании CloudClone (США). Осадок смешивался с раствором, после чего необходимо дождаться пока взвесь не станет полностью прозрачной, что говорит об окончании процесса лизирования. Полученный раствор центрифугировался 15 минут 3000 оборотов/минута, дозировался по алликвотам и хранился до востребования. При -25 C⁰ лизат стабилен не более месяца.

Измерение концентраций SIRT3 и HIF1-α

Измерение SIRT3 и HIF1-α в лизате лимфоцитарных клеток производилось методом твердофазного иммуноферментного анализа с применением наборов производства фирмы CloudClone (США). Методика измерения для обоих белков существенно не различалась, поэтому нижеописанный порядок измерения актуален для обоих наборов.

Все компоненты и набора и исследуемые образцы доводились до комнатной температуры. После чего готовились калибраторы. Для этого лиофилизированная сыворотка, содержащая 10 нг/мл SIRT3 или HIF1- α , в зависимости от измеряемого показателя, разводилась разбавителем, который входил в состав наборов. Через 30 мин после полного растворения лиофилизата готовилась серия двукратных разведений. Для этого в 6 пробирок типа Eppendorf вносили по 250 мкл разбавителя для калибратора, из пробирки с калибратором отбиралось 250 мкл, переносилось в пробирку №2 и перемешивалось, далее 250 мкл раствора из пробирки №2 переносилось в пробирку №3 и т.д. В пробирку №8 вносится только дилуент. Процедура отражена на рисунке 2.

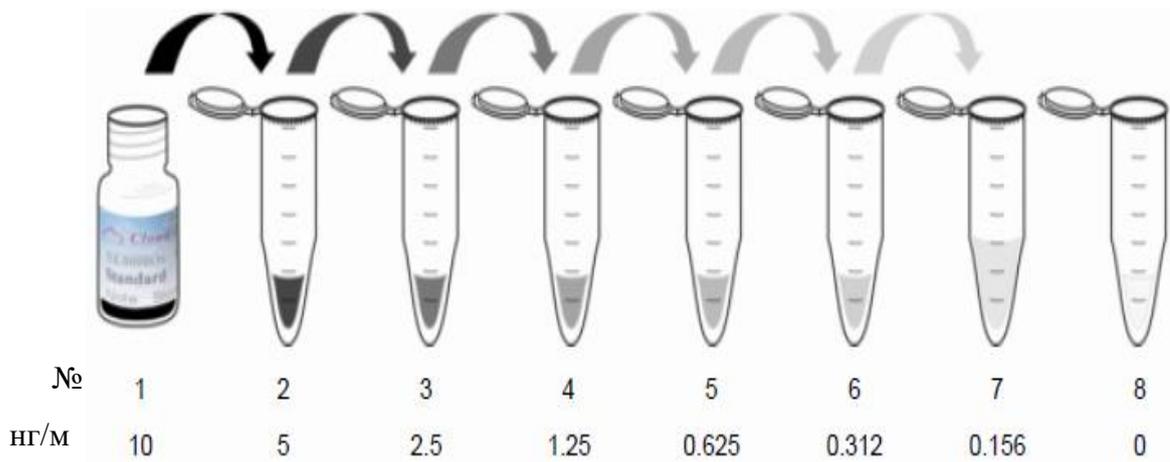


Рис. 2. Процедура приготовления калибраторов

Когда растворы калибраторов готовы необходимо отобрать нужное количество стрипов, в первые восемь лунок вносятся калибраторы, в остальные предварительно подготовленный лизат, после чего стрипы заклеиваются пленкой и инкубируются 30 минут при $+37C^0$. Во время инкубации готовятся детектирующие растворы А и В путем разведения в соответствующих дилуентах. В дистиллированной воде готовится раствор промывающего фосфатного буфера согласно инструкции к набору. После инкубации содержимое лунок удаляется и трижды промывается раствором для промывки, вносится детектирующий реагент А и стрипы инкубируются 60 минут. После пятикратной отмывки в лунки вносится детектирующий реагент В, инкубация длится 60 минут, далее следует пятикратная отмывка. После во все лунки вносится свежеприготовленный раствор тетраметилбензидина и после 15 минут вносится стоп-реагент. Детекция выполнялась на автоматическом иммуноферментном анализаторе Evolvis (BioRad США). Расчет концентраций производился по калибровочным графикам, которые представлены на рисунках 3 и 4.

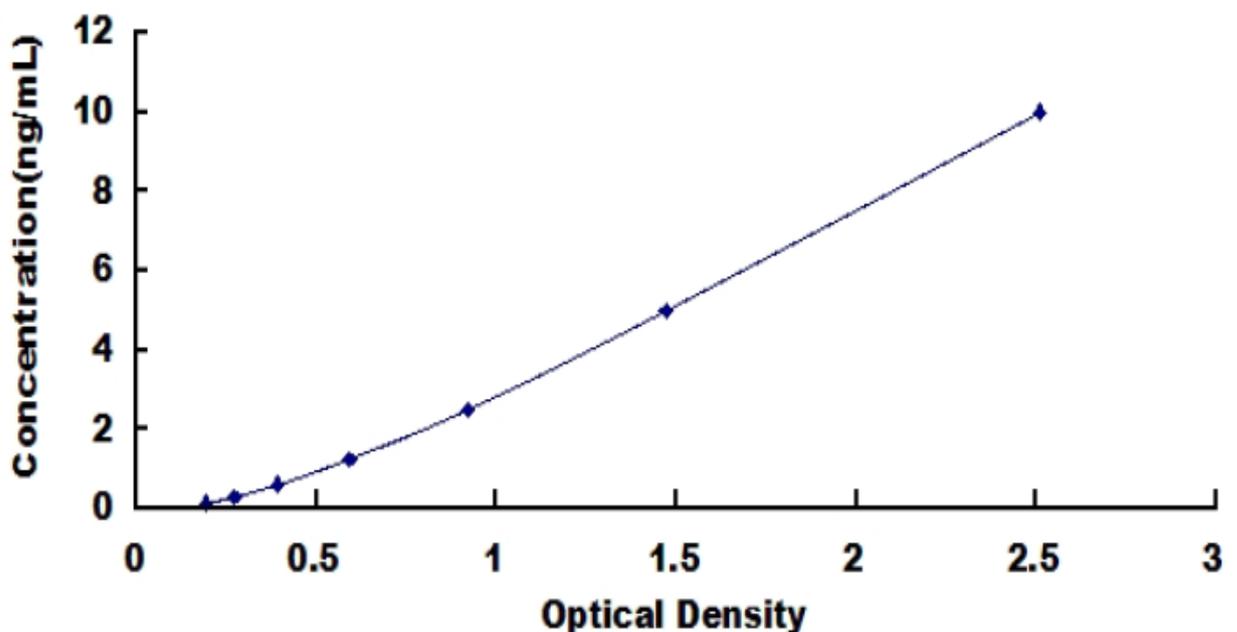


Рис. 3. Вид калибровочного графика для SIRT3

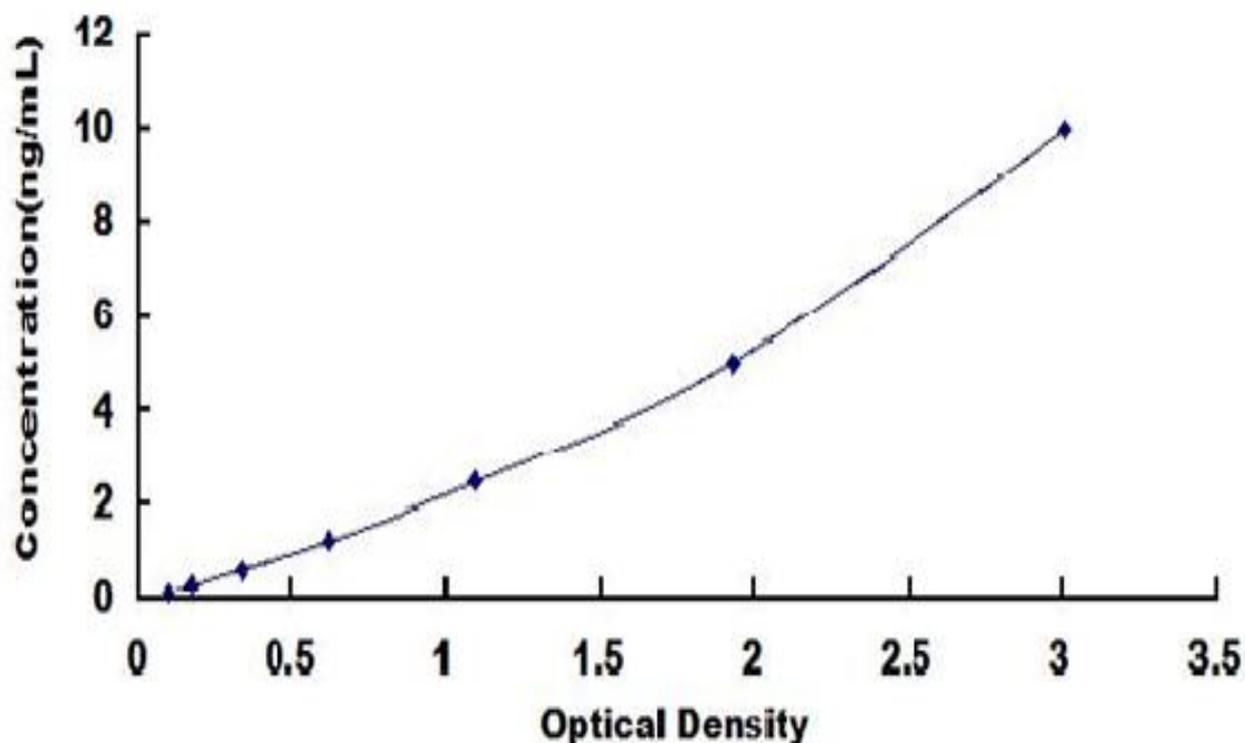


Рис. 4. Вид калибровочного график для HIF1- α

Полученные результаты пересчитывались на количество лимфоцитов во взвеси путем деления полученной концентрации SIRT3 или HIF1- α в лизате на концентрацию лимфоцитов во взвеси. При измерении SIRT3 и HIF1- α одновременно в одной пробе высчитывалось соотношение HIF1- α / SIRT3.

Измерение концентраций цитокинов

В проведённом нами исследовании в сыворотке крови производилось измерение IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN γ . Измерения проводились методом твердофазного иммуноферментного анализа. Использовались наборы производства компании «Вектор-Бест» (РФ), детекция проводилась на автоматическом иммуноферментном анализаторе Evolis (BioRad США).

2.3 Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка полученных результатов производилась при помощи программных пакетов для статистического анализа Statistica 11.0 StataSoft (США), MS Excel 2016. Сравнение распределения данных с нормальным выполнялось при помощи критериев Колмогорова – Смирнова и Шапиро – Уилка. Распределения результатов оказались сходны с нормальным, поэтому для статистического описания данных производилось вычисление среднего значения и стандартного отклонения. Кластерный анализ методом К-средних использовался для выделения из общего числа обследованных волонтеров групп с достоверными различиями по измеренным параметрам. Сравнение количественных значений между группами производилось с использованием критерия Стьюдента. При уровне значимости менее 0,05 различия считались статистически достоверными. Для выявления зависимостей между исследуемыми показателями вычислялся коэффициент корреляции Спирмена.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Влияние обеспеченности АТФ на популяционный состав лимфоцитов периферической крови

АТФ является универсальным медиатором метаболизма и передачи сигналов. Существует фундаментальная взаимосвязь между динамикой наработки, использования АТФ и физиологическими реакциями, происходящими внутри и вне клетки. Характеристика и понимание динамики использования АТФ может быть необходимо для более подробного понимания процессов функционирования лимфоцитов, их адаптации к меняющимся условиям микроокружения, хемотаксиса и механизмов формирования иммунных реакций.

Для установления влияния уровня энергетической обеспеченности лимфоцитов на иммунный статус было обследовано 104 человека. При помощи кластерного анализа выделены 2 группы кластеров (81 и 23 человека), в которых внутриклеточный уровень АТФ имел статистически значимые различия (рисунок 5).

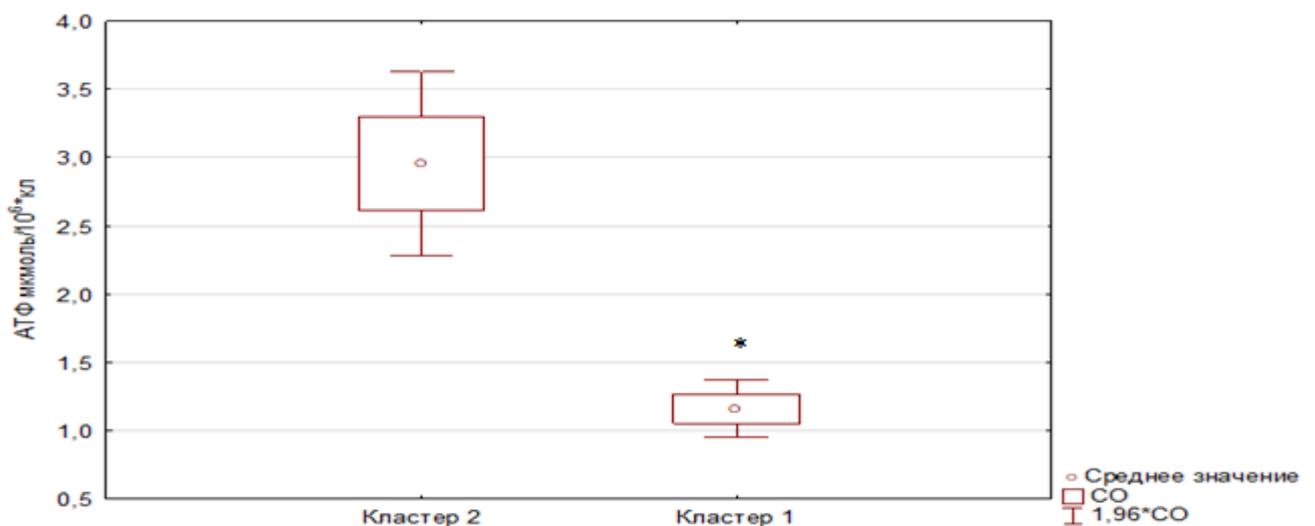


Рис. 5. Внутриклеточная концентрация АТФ лимфоцитов в группах кластеров

Примечание: * – различия статистически значимы ($p < 0,05$).

Можно увидеть, что в группах кластеров содержание АТФ в лимфоцитах имеет значительные различия. Так в группе второго кластера значение составило 2,96 (1,64) мкмоль/10⁶ кл, что статистически значимо ниже, чем в группе кластера 1, где значение составило 1,15 (0,97) мкмоль/10⁶ кл (P <0,0001).

Важно отметить, что измерение внутриклеточной концентрации АТФ лимфоцитов производилось во всем пуле клеток периферической крови. Полученное значение будет являться средним взвешенным, поскольку метаболическая активность может отличаться у лимфоцитов с разными поверхностными белками. Соответственно вклад различных субпопуляций в общее содержание АТФ будет различаться.

В таблице представлены результаты сравнительного анализа популяционного состава пула лимфоцитов периферической крови в группах с различающейся внутриклеточной концентрацией АТФ.

Таблица 1

Содержание лимфоцитов и их фенотипов в группах с различающимся содержанием АТФ

Параметр	Кластер 1 (n=81) M(SD)	Кластер 2 (n=23) M(SD)	Уровень значимости (P)
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
HLADR 10 ⁶ кЛ/мл	0,46 (0,250)	0,23 (0,094)	<0,0001

Примечание – различия статистически значимы при p<0,05.

Из представленных результатов можно увидеть, что в группе, где внутриклеточная концентрация АТФ была выше (кластер 2) абсолютная

концентрация лимфоцитов и содержание всех фенотипов было статистически значимо ниже, чем в группе с более низким содержанием АТФ (кластер 1).

Между группами также были выявлены достоверные различия в удельном весе измеренных фенотипов (см. рисунок 6).

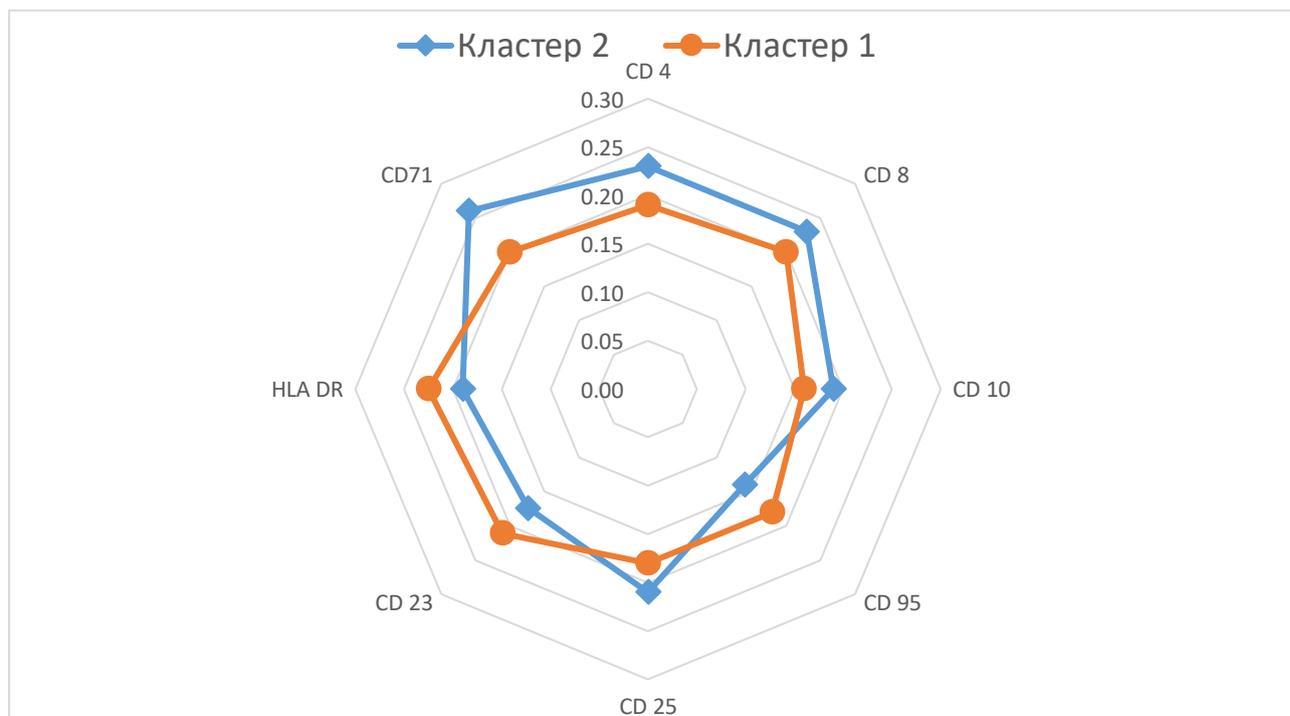


Рис. 6. Процентное содержание лимфоцитов в группах кластеров с различающимся внутриклеточным уровнем АТФ

Из данных, приведенных на рисунке, можно увидеть, что в группе первого кластера с более низким содержанием АТФ относительно группы кластера 2, где содержание АТФ было выше, наблюдается более высокий удельный вес лимфоцитов с рецептором к IgE (CD23), меченных к апоптозу (CD95) и HLADR+ клеток. В группе второго кластера выше был удельный вес лимфоцитов, имеющих на мембране дифференцировочные антигены (CD4, CD8), антигены клеточной активации (CD25, CD71), маркер пролиферации CD10.

Для того чтобы лучше визуализировать различия в иммунном реагировании в группах с различающимся содержанием АТФ была построена точечная диаграмма, где по оси Y наносились значения обратного натурального логарифма отношения CD3+ лимфоцитов к CD4+, CD8+, CD10+, CD23+, CD25+, CD71+, CD95+ и HLADR+ клеткам (см. рисунок 7).

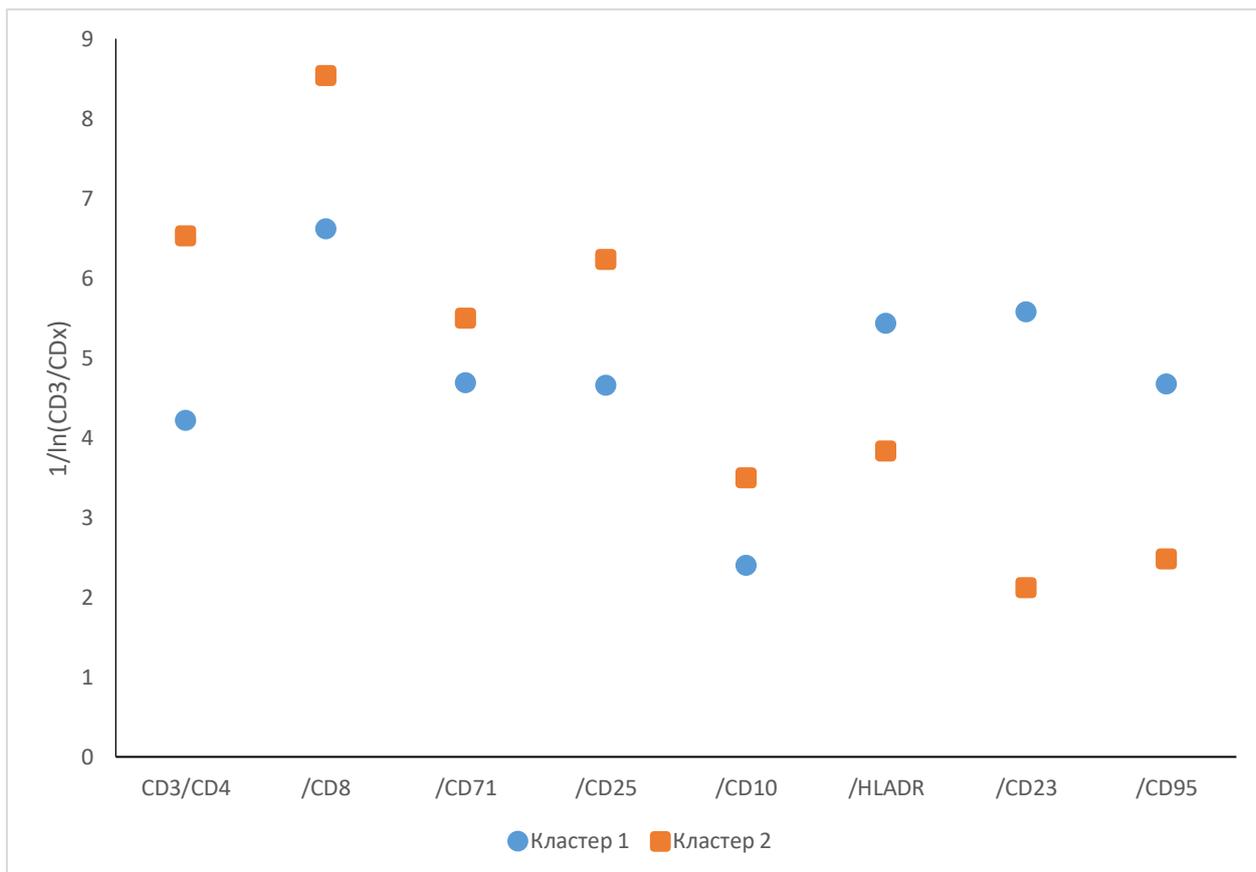


Рис. 7. Распределение фенотипов лимфоцитов в зависимости от уровня АТФ

Можно увидеть, что в группе кластера 2, где внутриклеточная концентрация АТФ была выше, также наблюдался более высокий удельный вес лимфоцитов, имеющих на мембране дифференцировочные антигены (CD4, CD8) и антигены отражающие процессы активации клеток (CD25, CD71), также увеличено содержание клеток с маркером пролиферации (CD10). В группе кластера 1 с меньшим содержанием АТФ выше был удельный вес лимфоцитов с рецепторами апоптоза (CD95) и рецепторами к IgE (CD23).

Для обоих кластеров были рассчитаны соотношения CD4+/CD8+, CD10+/CD95+, CD4+/CD23+. Эти соотношения характеризуют эффективность работы адаптивного иммунитета (CD4+/CD8+), направленность иммунных реакций в сторону клеточного, либо гуморального механизма реализации (CD4+/CD23+) и пролиферативную активность пула клеток (CD10+/CD95+). Результаты сравнительного анализа отражены на рисунке 8.

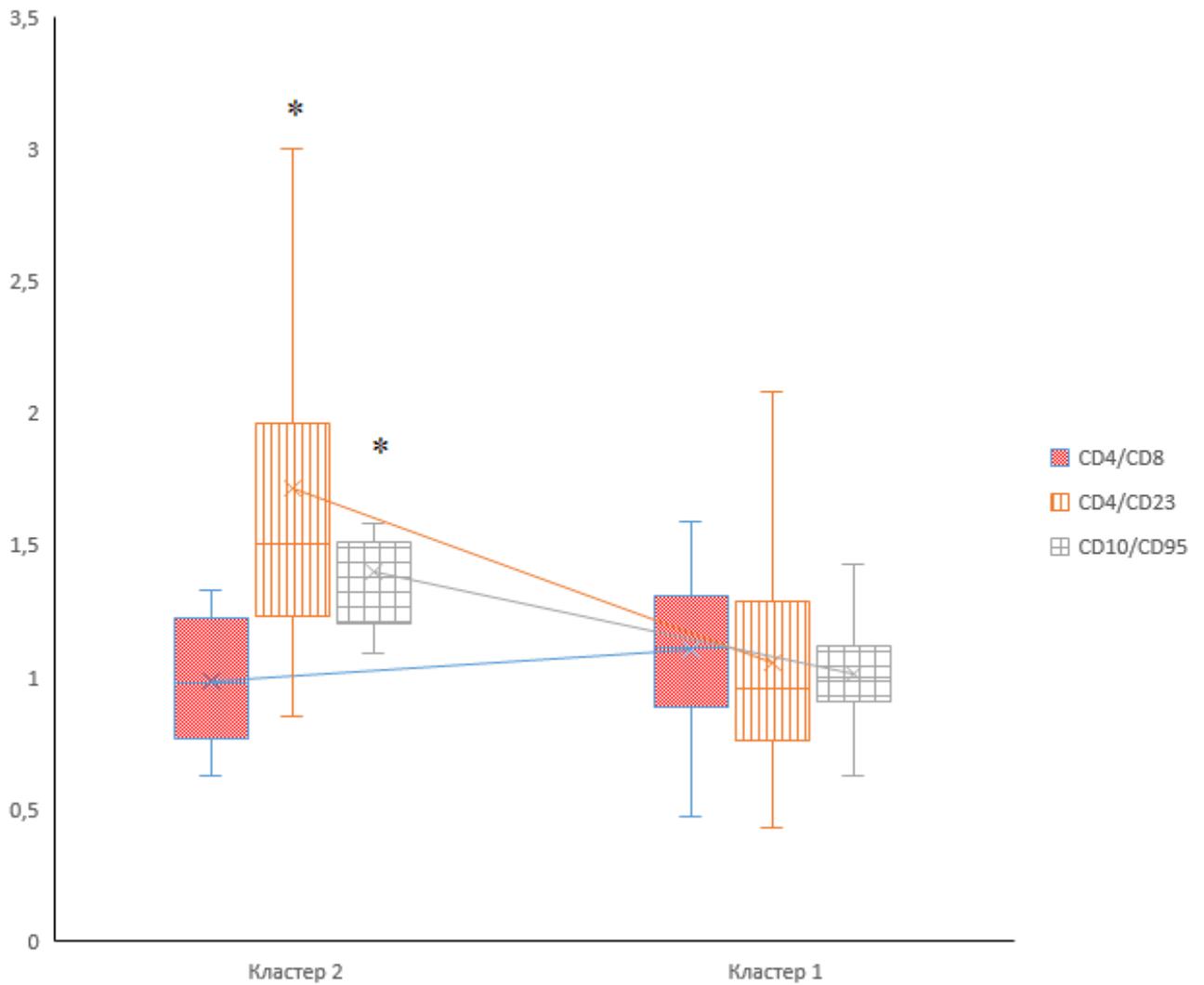


Рис. 8. Соотношения CD4+/CD8+, CD10+/CD95+, CD4+/CD23+ в группах с различающейся внутриклеточной концентрацией АТФ лимфоцитов
Примечание: * – различия статистически значимы ($p < 0,05$).

Из представленных результатов можно увидеть, что для группы первого кластера были характерны более низкие соотношения CD10+/CD95+, CD4+/CD23+, чем для группы второго кластера, значения составили 1,02 (0,33) и 1,39 (0,41) ($p = 0,0001$) для CD10+/CD95+, 1,05 (0,29) и 1,71 (0,47) ($p = 0,0004$) для CD4+/CD23+ в кластерах 1 и 2 соответственно.

Для того чтобы выявить влияние клеток с исследуемыми фенотипами на содержание АТФ были вычислены коэффициенты корреляции Спирмена между внутриклеточным содержанием АТФ и концентрациями лимфоцитов с

измеренными фенотипами. Наличие достоверных корреляционных взаимосвязей с концентрацией АТФ наблюдалось для клеток с фенотипами CD23+, CD95+, HLADR+. Результаты корреляционного анализа приведены на рисунках 9 - 11.

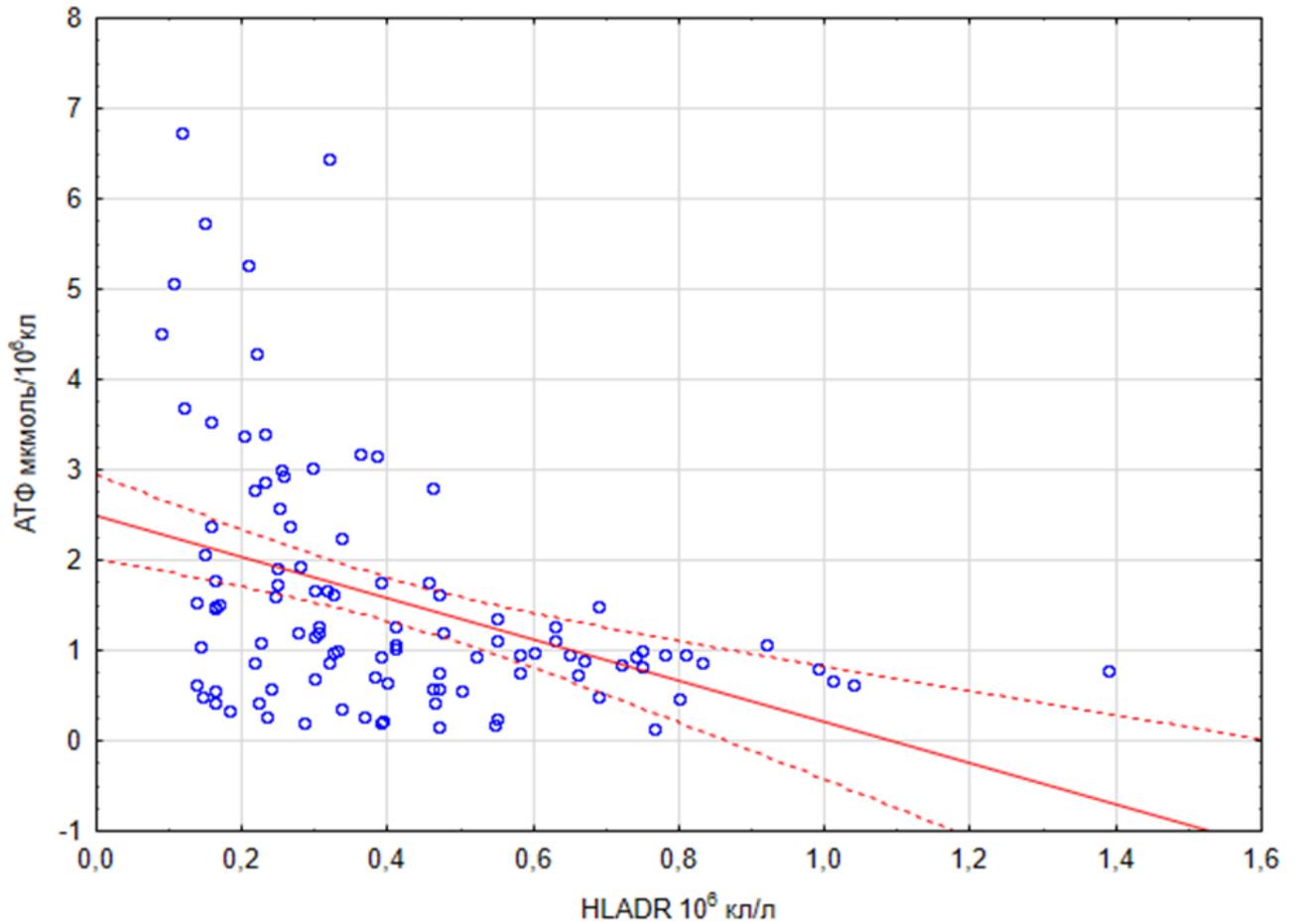


Рис. 9. График зависимости концентрации АТФ от содержания HLADR+ лимфоцитов

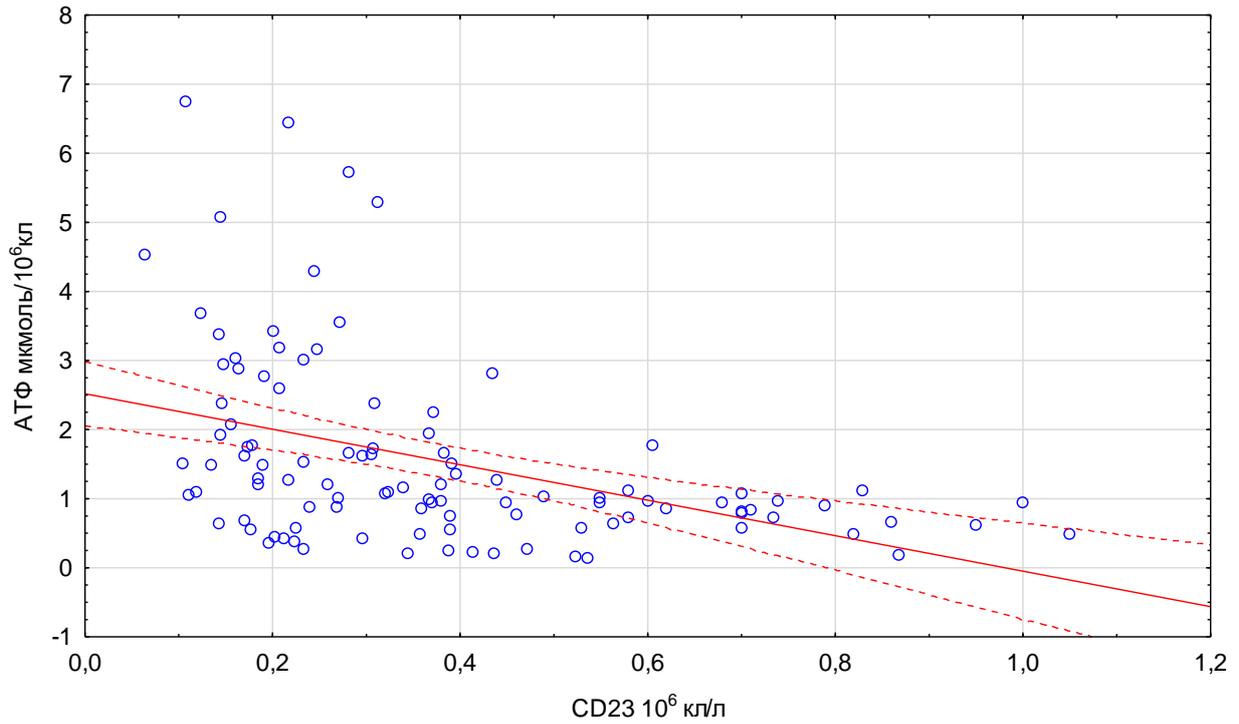


Рис. 10. График зависимости концентрации АТФ от содержания CD23+ лимфоцитов

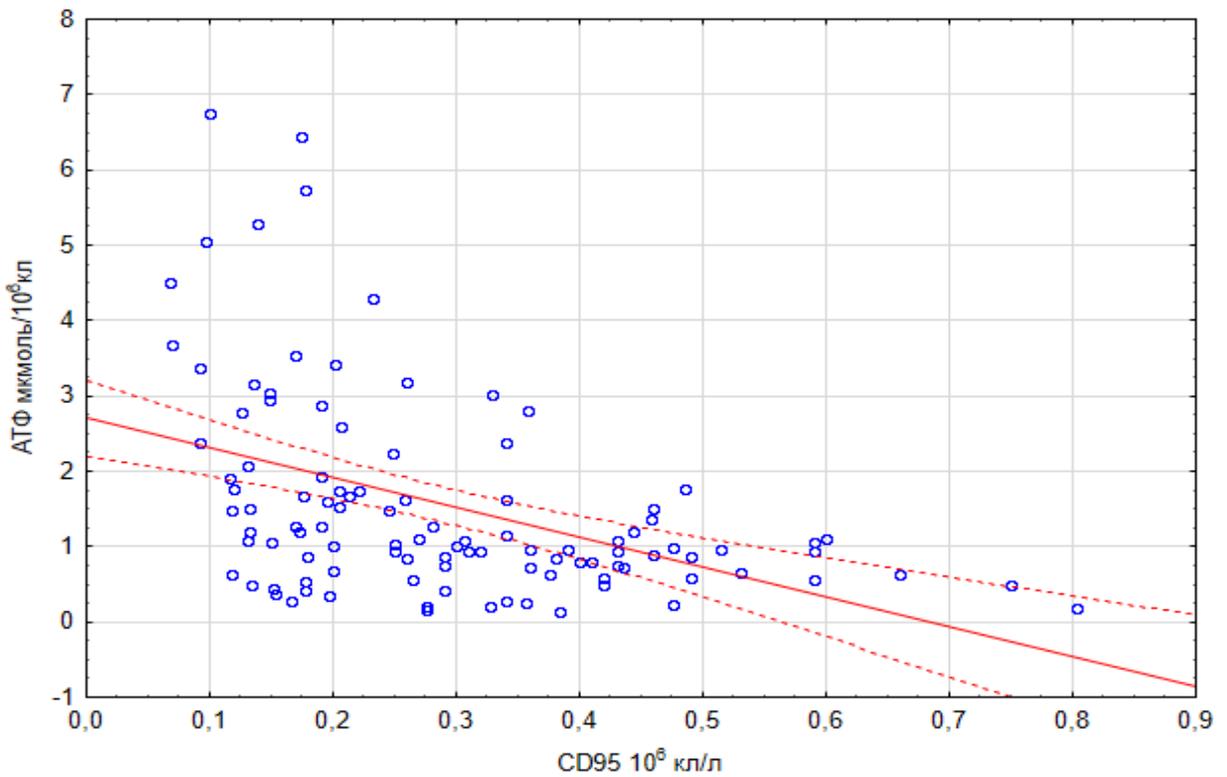


Рис. 11. График зависимости концентрации АТФ от содержания CD95+ лимфоцитов

Для CD95+, CD23+, HLADR+ лимфоцитов были обнаружены обратные корреляции средней силы с внутриклеточным содержанием АТФ. Значения коэффициентов корреляции Спирмена составили $r = -0,49$, $r = -0,51$, $r = -0,47$ ($p < 0,01$) для CD95+, CD23+, HLADR+ соответственно. Наличие корреляций также подтверждает повышенный расход АТФ у клеток с этими фенотипами.

Разнообразные метаболические пути играют важную роль в производстве основного источника энергии для клеток – АТФ. В случае лимфоцитов, основными путями наработки АТФ служат гликолиз, глютаминолиз и ОХРНOS [3, 50, 55]. Каждый из этих метаболических путей имеет свои преимущества и недостатки. Например, гликолиз обеспечивает быструю генерацию небольшого количества АТФ, в то время как при ОХРНOS вырабатывается значительное количество АТФ, но на это затрачивается больше времени, чем при гликолизе [65].

Лимфоциты имеют разные потребности в питательных веществах за счет которых происходит наработка АТФ и функциональное состояние иммунокомпетентной клетки в значительной степени определяет их. Так неактивированные Т-клетки преимущественно используют β -окисление жирных кислот, а АТФ вырабатывается преимущественно за счет ОХРНOS [179, 219]. В таком потребности в АТФ более низкие, поскольку в состоянии покоя энергетические траты клеток также будут низкими. Однако для поддержания этого состояния требуются внешние сигналы, поддерживающие жизнедеятельность лимфоцитов в отсутствие активационных сигналов. В качестве такого сигнала может использоваться стимуляция рецептора IL-7, который контролирует экспрессию белков FOXO3A и FOXJ1. В свою очередь FOXO3A и FOXJ1 ингибируют ряд других белков, отвечающих за клеточную активацию, например, NF- κ B, что позволяет клеткам в неактивном состоянии поддерживать жизнедеятельность [198, 219]. Еще одним механизмом, позволяющим не допустить активации лимфоцитов, является убиквитинилирование протеинкиназ. Многие регуляторные каскады, задействующиеся при активации Т-клеток, работают за счет фосфорилирования белков под действием протеинкиназ, однако на их инактивацию посредством убиквитин-лигазной системы затрачивается АТФ [238].

Энергетические требования лимфоцитов могут изменяться в зависимости от их функционального состояния, и регуляция работы метаболических путей и сигнальных путей может помочь сохранить клетки в неактивированном состоянии, когда это необходимо. При получении активационного сигнала происходит значительное изменение функциональной активности лимфоцита. Это связано со значительным увеличением расхода АТФ на процессы пролиферации, дифференцировки, роста и синтеза эффекторных молекул. Происходит изменение метаболического профиля лимфоцита в зависимости от выполняемых функций, так уровень гликолиза повышается в активированных CD4⁺ и CD8⁺, при чем повышение активности гликолиза происходит даже при достаточном содержании кислорода [205, 206, 231, 240]. Также T_H17 клетки в разной степени задействуют метаболизм глутамина, это наиболее выражено у Th17 [49].

Увеличение активности гликолиза связано со значительным повышением потребления глюкозы. При активации лимфоцитов клетки значительно увеличивают захват глюкозы из окружающей среды, это происходит за счет увеличения экспрессии GLUT1 на мембране клеток, также увеличивается экспрессия генов гликолитических ферментов. Это происходит за счет активации сигнального каскада PI-3K/AKT/mTOR. Также активация PI-3K/AKT/mTOR способствует увеличению интенсивности синтеза белков и стимуляции клеточного роста за счет повышения экспрессии eIF-4E и рибосомальной киназы p70S6K [14, 26, 155].

Ряд отличий имеется в метаболических программах клеток памяти и T_{reg}, которые преимущественно используют OXPHOS и окисление жирных кислот. Для них характерно увеличение активности AMPK, за счет чего происходит стимуляция процессов окисления, что ведет к генерации АТФ [162, 196, 217].

Полученные в ходе исследования результаты показывают, что способность лимфоцитов к активации, пролиферации и их функциональная активность обусловлена обеспеченностью клеток АТФ. Так в группе второго кластера, где содержание АТФ было выше, а общее содержание лимфоцитов наоборот было ниже, преобладали клетки с более высокой метаболической активностью CD4⁺,

CD8+ и более высокой экспрессией активационных антигенов CD25+, CD71+, эти клетки значительно активнее используют гликолиз для синтеза АТФ, что может обуславливать его более высокую концентрацию, также об этом может говорить смещение соотношения пролиферирующих лимфоцитов (CD10+) к клеткам, меченным к апоптозу (CD95+) в сторону CD10+, что может говорить о более активном протекании процессов пролиферации, CD4+/CD23+ было смещено в сторону Т-хелперных клеток. В то же время в группе первого кластера было выше содержание CD95+, CD23+, HLADR+ лимфоцитов, при этом содержание АТФ было значительно ниже. Рассчитанные соотношения CD4+/CD23+ и CD10+/CD95+ были смещены в сторону клеток, меченных к апоптозу, и клеток с рецептором к IgE. Сниженное содержание АТФ в этой группе может быть объяснено повышенными затратами энергии на продукцию антител, синтез и выброс эффективных молекул, необходимых для регуляции иммунного ответа и затратами энергии на апоптозу деградацию.

Важное значение в поддержании жизнедеятельности, функциональной активности, регуляции процессов дифференцировки и пролиферации, и формирования клеточной памяти имеет продукция АТФ за счет работы гликолиза, ОХРНOS и глутаминолиза, активность метаболических процессов регулируется посредством контроля экспрессии генов, посттрансляционной модификации белков за счет действия различных регуляторных факторов. В частности, при стимуляции CD28 происходит активация PI-3K/АКТ/mTOR, в результате чего происходит стимуляция аэробного гликолиза и синтетических процессов [50, 71, 155, 201]. В свою очередь при увеличении расхода энергии происходит нарастание концентрации АМФ, что приводит к активации АМПК, что наоборот приводит к ингибированию синтетических процессов, увеличению катаболизма глюкозы и увеличению активности ОХРНOS [81, 217]. В результате происходит увеличение концентрации АТФ.

3.2 Анализ активности путей метаболизма, участвующих в продукции АТФ, по уровню метаболических регуляторов SIRT3 и HIF-1 α в лимфоцитах периферической крови

Изменения в метаболизме Т-клеток являются строго регулируемые процессами, которые контролируются как транскрипционно, так и посттрансляционно. Эти внутриклеточные процессы регулируются специфическими внеклеточными сигналами, которые формируют клеточный метаболизм [14, 16, 26, 87, 149].

SIRT3 является одной из наиболее важных деацетилаз в митохондриях и играет ключевую роль в регуляции митохондриальной функции. Под действием SIRT3 происходит деацетилирование пируватдегидрогеназного комплекса. Активация β -окисления жирных кислот происходит за счет деацетилирования длинноцепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы и ацетил-КоА-синтетазы 2. Деацетилирование глутаматдегидрогеназы способствует активации метаболизма глутамина. Также SIRT3 играет важную роль в поддержании работы цикла трикарбоновых кислот за счет деацетилирования сукцинатдегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназы и предотвращает или отсрочивает повреждение, вызванное окислительным стрессом, путем активации антиоксидантных факторов, включая FOXO3 и SOD [70, 76, 141].

Для оценки влияния SIRT3 на лимфоцитарный метаболизм было обследовано 55 волонтеров. При помощи кластерного анализа из общего числа обследуемых было выделено две группы в которых измеренные значения имели значимые отличия. К группе первого кластера были отнесены 28 человек, группе второго 27 человек. Значения измеряемых параметров для каждого кластера приведены в таблице 2.

**Значение измеряемых параметров в группах с различающимися
внутриклеточными концентрациями SIRT3**

Параметр	кластер 1 (n=28) М (SD)	кластер 2 (n=27) М (SD)	Уровень значимости P
Лимфоциты 10 ⁶ кЛ/мл	2,53 (0,46)	1,64 (0,32)	<0,0001
CD3 10 ⁶ кЛ/мл	1,76 (0,29)	1,1 (0,22)	<0,0001
CD4 10 ⁶ кЛ/мл	0,77 (0,24)	0,48 (0,16)	<0,0001
CD8 10 ⁶ кЛ/мл	0,76 (0,28)	0,44 (0,17)	<0,0001
CD10 10 ⁶ кЛ/мл	0,76 (0,32)	0,45 (0,16)	<0,0001
CD23 10 ⁶ кЛ/мл	0,43 (0,17)	0,25 (0,08)	<0,0001
CD25 10 ⁶ кЛ/мл	0,38 (0,11)	0,22 (0,06)	<0,0001
CD71 10 ⁶ кЛ/мл	0,77 (0,29)	0,45 (0,21)	0,0002
CD95 10 ⁶ кЛ/мл	0,78 (0,3)	0,47 (0,2)	0,0037
SIRT3 нг/10 ⁶ кЛ	0,35 (0,22)	0,54 (0,38)	0,0411

Примечание – различия статистически значимы при $p < 0,05$.

Представленные в таблице результаты показывают, что в группе второго кластера, где выявлена статистически достоверно более высокая внутриклеточная концентрация SIRT3, абсолютная концентрация лимфоцитов и всех измеренных фенотипов оказалась статистически достоверно ниже, чем в группе первого кластера с более низкой внутриклеточной концентрацией SIRT3.

Для исследования влияния внутриклеточной концентрации SIRT3 на обеспеченность лимфоцитов периферической крови энергией был проведен сравнительный анализ уровня АТФ в группах первого и второго кластера. Результаты представлены на рисунке 12.

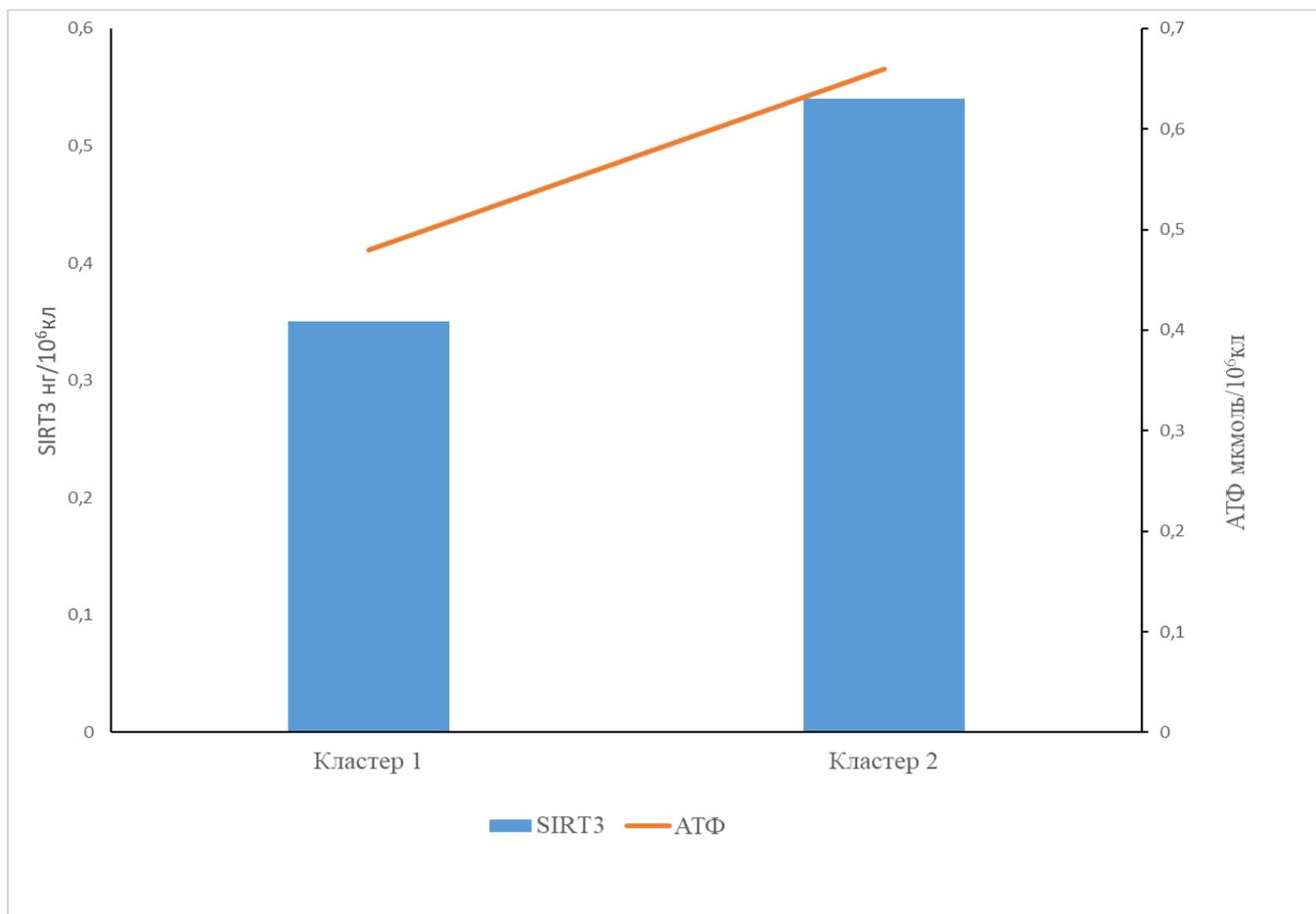


Рис. 12. Содержание SIRT3 и АТФ в лимфоцитах периферической крови

При сравнении содержания АТФ в лимфоцитах в зависимости от уровня SIRT3 было выявлено, что в группе первого кластера при более низком содержании SIRT3 концентрация АТФ также была статистически значимо ниже, чем в группе с более высокой концентрацией SIRT3, концентрации АТФ составляли 0,48 (0,29) и 0,66 (0,31) ($p = 0,0023$) для кластеров 1 и 2 соответственно.

Был проведен сравнительный анализ процентного содержания лимфоцитов в группах. Для более наглядного представления результатов использовались методы математического потенцирования. Вычислялся обратный натуральный логарифм соотношения абсолютного содержания лимфоцитов к концентрации исследуемых фенотипов. Результаты представлены на точечной диаграмме (см. рисунок 13)

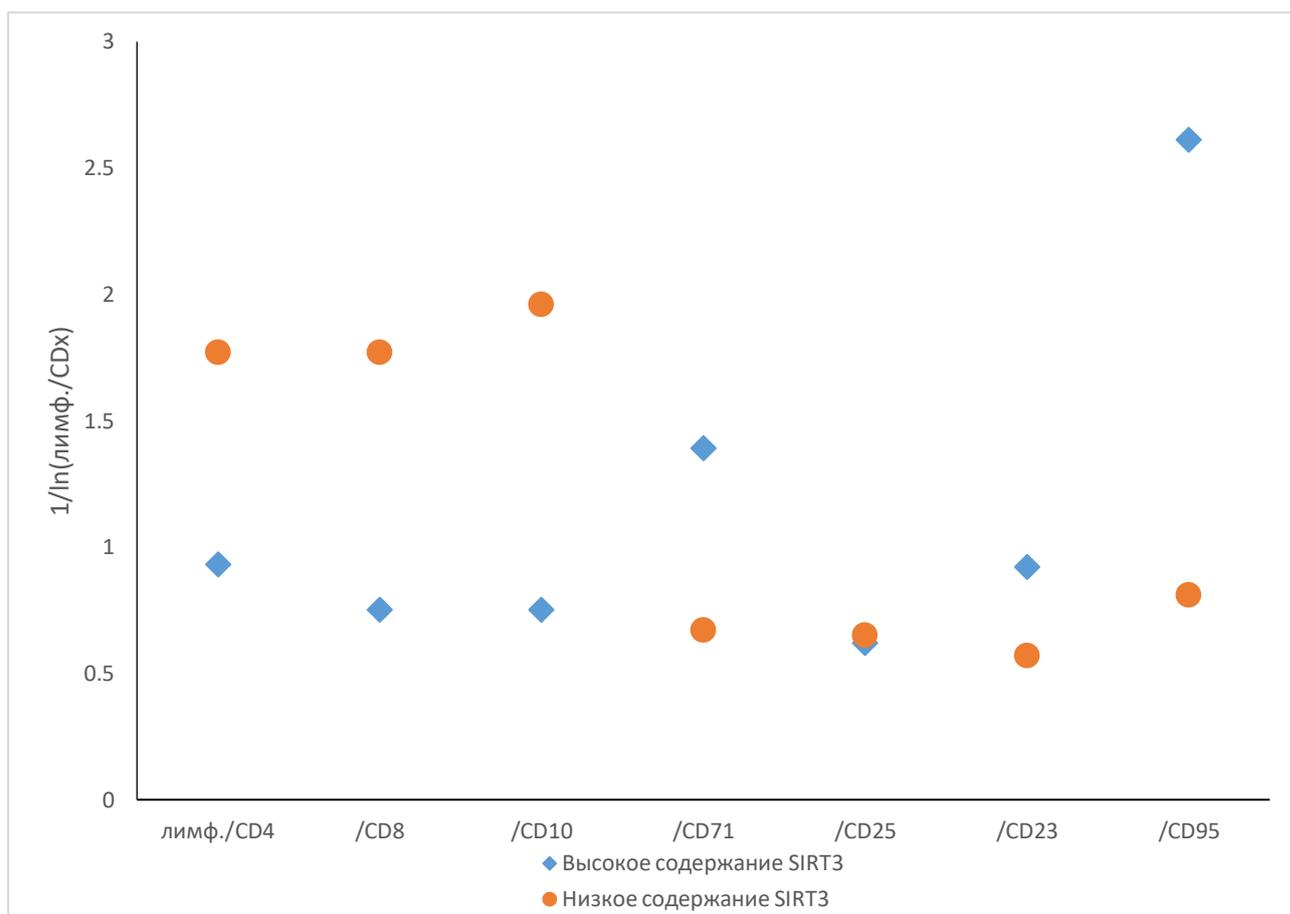


Рис. 13. Распределение фенотипов лимфоцитов в группах с разным содержанием SIRT3

Из данных, приведенных на рисунке можно увидеть, что для группы с более высокой концентрацией SIRT3 характерно более высокое процентное содержание лимфоцитов с рецепторами к IgE (CD23), клеток, меченных к апоптозу (CD95), и клеток с рецептором трансферрина (CD71), тогда как в группе с меньшим внутриклеточным содержанием SIRT3 выявлено большее процентное содержание клеток с дифференцировочными антигенами (CD4, CD8) и пролиферирующих клеток (CD10), процентное содержание клеток с рецептором к IL2 между группами значимо не различалось.

Результаты сравнительного анализа соотношений CD4+/CD8+, CD10+/CD95+, CD4+/CD23+ представлены на рисунке 14.

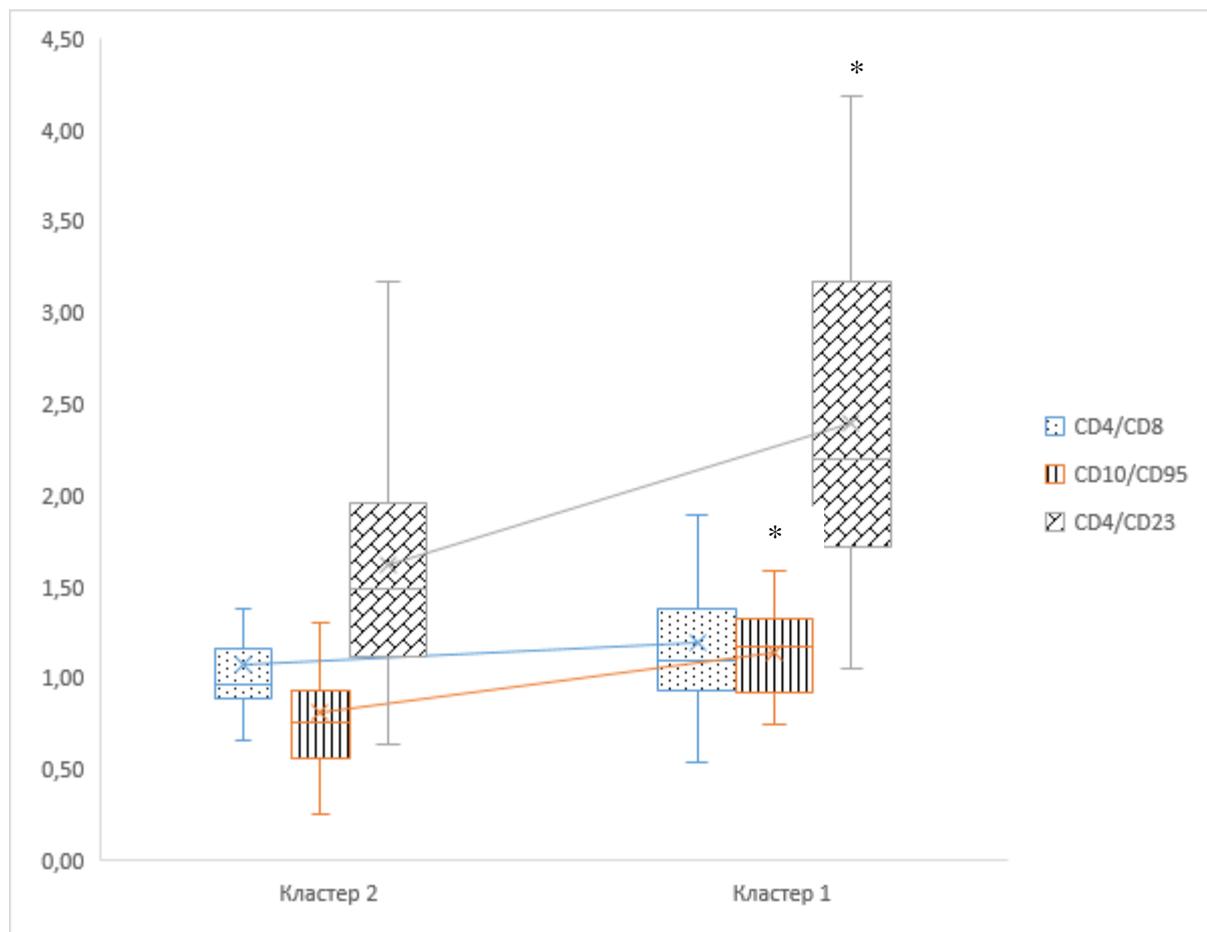


Рис. 14. Соотношения фенотипов лимфоцитов CD4+/CD8+, CD10+/CD95+, CD4+/CD23+ в кластерах

Примечание: * – различия статистически значимы ($p < 0,05$)

Из представленных на рисунке данных видно, что для кластера 2 с более высоким внутриклеточным содержанием SIRT3 характерно статистически достоверно более низкое соотношение CD4+/CD23+, также было статистически достоверно снижено соотношение CD10+/CD95+, соотношение CD4+/CD8+ статистически значимо не различалось.

SIRT3 вместе с другими митохондриальными сиртуинами регулирует большое число функций этих органелл за счет контроля транскрипции генов, отвечающих за энергетический метаболизм и посттрансляционной модификации белков. Контролируя активность белков посредством деацетилирования, SIRT3 регулирует работу ферментов цикла Кребса, таких как сукцинатдегидрогеназа и изоцитратдегидрогеназа, также он поддерживает активность комплексов цепи

переноса электронов. Контролирует скорость образования активных форм кислорода, за счет регуляции активности каталазы и супероксиддисмутазы 2 [121, 141, 166, 215].

При анализе групп с различающейся концентрацией SIRT3 было выявлено, что в группе с более высоким внутриклеточным содержанием SIRT3 концентрация лимфоцитов и всех фенотипов была ниже, при этом между группами имелись значимые различия в популяционном составе. Так при анализе относительного содержания фенотипов было выявлено повышение CD23+ и CD95+ лимфоцитов, соотношения CD10+/CD95+, CD4+/CD23+ также были сдвинуты в сторону лимфоцитов с фенотипами CD23+ и CD95+.

Клетки, меченные к апоптозу (CD95+), характеризуются повышенной активностью митохондриального метаболизма. CD95 может провоцировать два сигнальных пути, один из которых запускает апоптоз. Апоптоз является процессом, который требует большого количества энергии. Исследования показали, что при провоцировании апоптоза концентрация АТФ в клетках поддерживается на высоком уровне, при этом гликолиз ингибируется за счет стимуляции проапоптического белка p53 [115, 244]. Этот белок снижает экспрессию гексокиназы и уменьшает захват глюкозы, подавляя экспрессию GLUT1. Другим путем, который обычно не индуцирует апоптоз, является Fas-опосредованный сигнальный каскад. В этом случае, Fas-опосредованная передача запускает митоген-активируемую протеинкиназу, что приводит к увеличению экспрессии NF-κB [109]. NF-κB в свою очередь усиливает экспрессию SIRT3, связываясь с его промотором [158]. Кроме того, повышение активности цитохром С оксидазы, фермента цепи переноса электронов митохондрий, способствует повышению активности OXPHOS и происходит за счет увеличения экспрессии белка, собирающего цитохром С оксидазу [115, 154, 187, 189, 221].

SIRT3 играет важную роль в работе CD23+ лимфоцитов. Исследования показали, что SIRT3 играет роль в поддержании метаболического баланса и способствует выживанию CD23+ клеток. В частности, было показано, что SIRT3 регулирует энергетический метаболизм CD23+ клеток, способствуя

преимущественному окислению жирных кислот и переходу этих клеток на митохондриальный метаболизм, что позволяет поддерживать продукцию антител [76, 121, 243].

Более высокое процентное содержание клеток с рецептором трансферрина (CD71) может быть объяснено прямым транскрипционным контролем его экспрессии SIRT3 [70].

Анализ полученных данных показывает, что повышение внутриклеточной концентрации SIRT3 может говорить о преобладании в этих клетках митохондриального метаболизма.

Важную роль в регуляции метаболизма лимфоцитов также выполняет HIF-1 α . Этот белок постоянно экспрессируется в цитоплазме, его функциональная активность зависит от содержания кислорода в микроокружении. При снижении содержания кислорода он проникает в ядро и активирует транскрипцию генов, отвечающих за синтез ферментов гликолиза и ряда других факторов, необходимых для адаптации к гипоксии [120, 142, 144]. Однако существуют независимые от кислорода механизмы регуляции HIF-1 α , которые могут реализовываться в процессе лимфоцитарной активации [210].

Для оценки влияния HIF-1 α на метаболизм лимфоцитов было обследовано 68 человек. При помощи кластерного анализа из было выделено 2 группы с достоверными различиями по большинству измеренных параметров. В таблице 3 представлены значения параметров для каждого кластера.

Таблица 3

**Значения измеряемых параметров в группах с различающейся
концентрацией HIF-1 α**

Параметр	кластер 1 (n=25) M (SD)	кластер 2 (n=43) M (SD)	Уровень значимости P
Лимфоциты 10 ⁶ кЛ/мл	1,61 (0,48)	2,22 (0,63)	0,0009
CD3 10 ⁶ кЛ/мл	1,05 (0,33)	1,48 (0,42)	0,0005

CD4 10 ⁶ кЛ/мл	0,53 (0,17)	0,77 (0,25)	0,0008
CD8 10 ⁶ кЛ/мл	0,48 (0,18)	0,71 (0,24)	0,0006
CD23 10 ⁶ кЛ/мл	0,27 (0,06)	0,37 (0,14)	0,0094
CD10 10 ⁶ кЛ/мл	0,51 (0,2)	0,79 (0,28)	0,0004
CD71 10 ⁶ кЛ/мл	0,56 (0,23)	0,81 (0,28)	0,0031
CD95 10 ⁶ кЛ/мл	0,58 (0,2)	0,8 (0,28)	0,0058
HIF1 нг/10 ⁶ кЛ	3,02 (1,37)	1,18 (0,35)	>0,0001

Примечание: различия статистически значимы при $p < 0,05$.

Сравнительный анализ показал, что в группе, где выявлено статистически достоверно более низкое внутриклеточное содержание HIF-1 α , абсолютная концентрация лимфоцитов и всех измеренных фенотипов были статистически значимо выше,

Были обнаружены изменения в процентном составе субпопуляций лимфоцитов в группах с различающимся содержанием HIF-1 α . Результаты сравнительного анализа представлены на точечной диаграмме (см. рисунок 15).

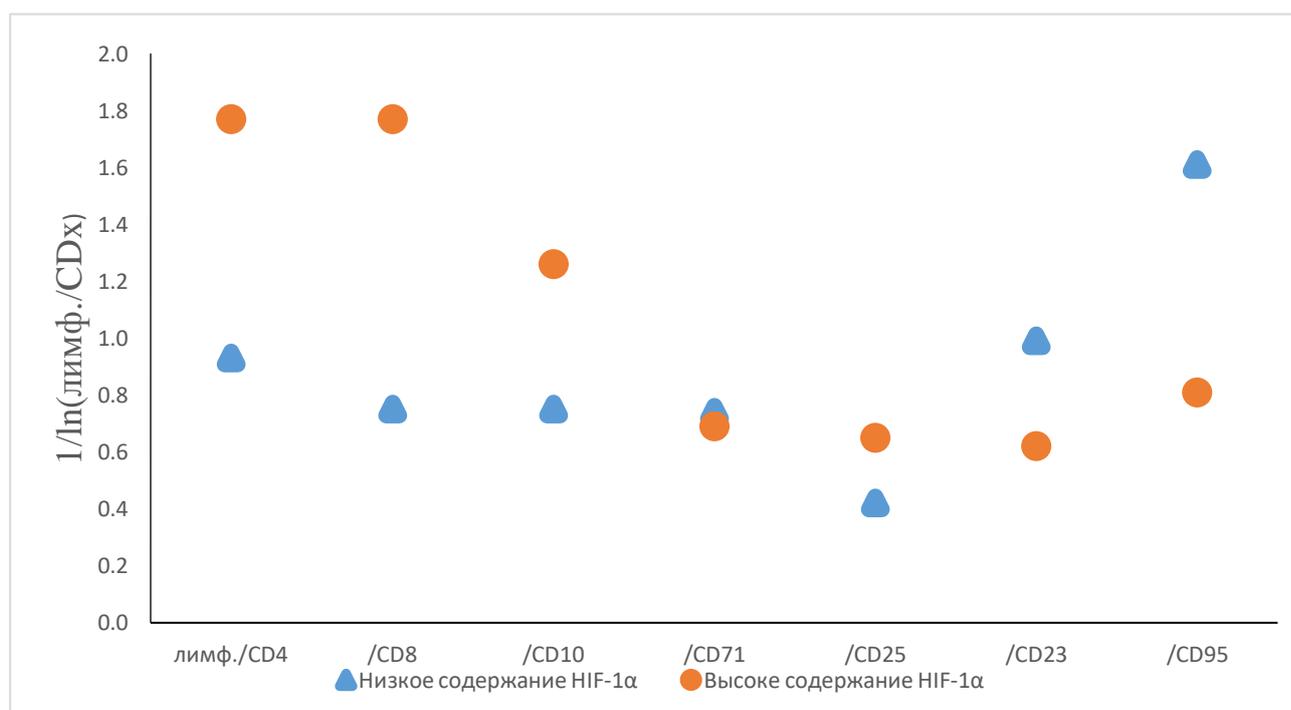


Рис. 15. Распределение фенотипов лимфоцитов в группах с разным содержанием HIF1- α

Из представленных на рисунке данных видно, что в группе с более высоким содержанием HIF-1 α было выше процентное содержание клеток с дифференцировочными маркерами (CD4, CD8), пролиферирующих клеток (CD10), клеток с рецептором IL2 (CD25), тогда как процентное содержание клеток, меченных к апоптозу (CD95), и клеток с рецептором к иммуноглобулину E (CD23) было ниже. Процентное содержание CD71+ лимфоцитов не статистически значимо не различалось.

Проводилась оценка влияния HIF1- α на обеспеченность энергией лимфоцитов. Результаты сравнительного анализа представлены на рисунке 16.

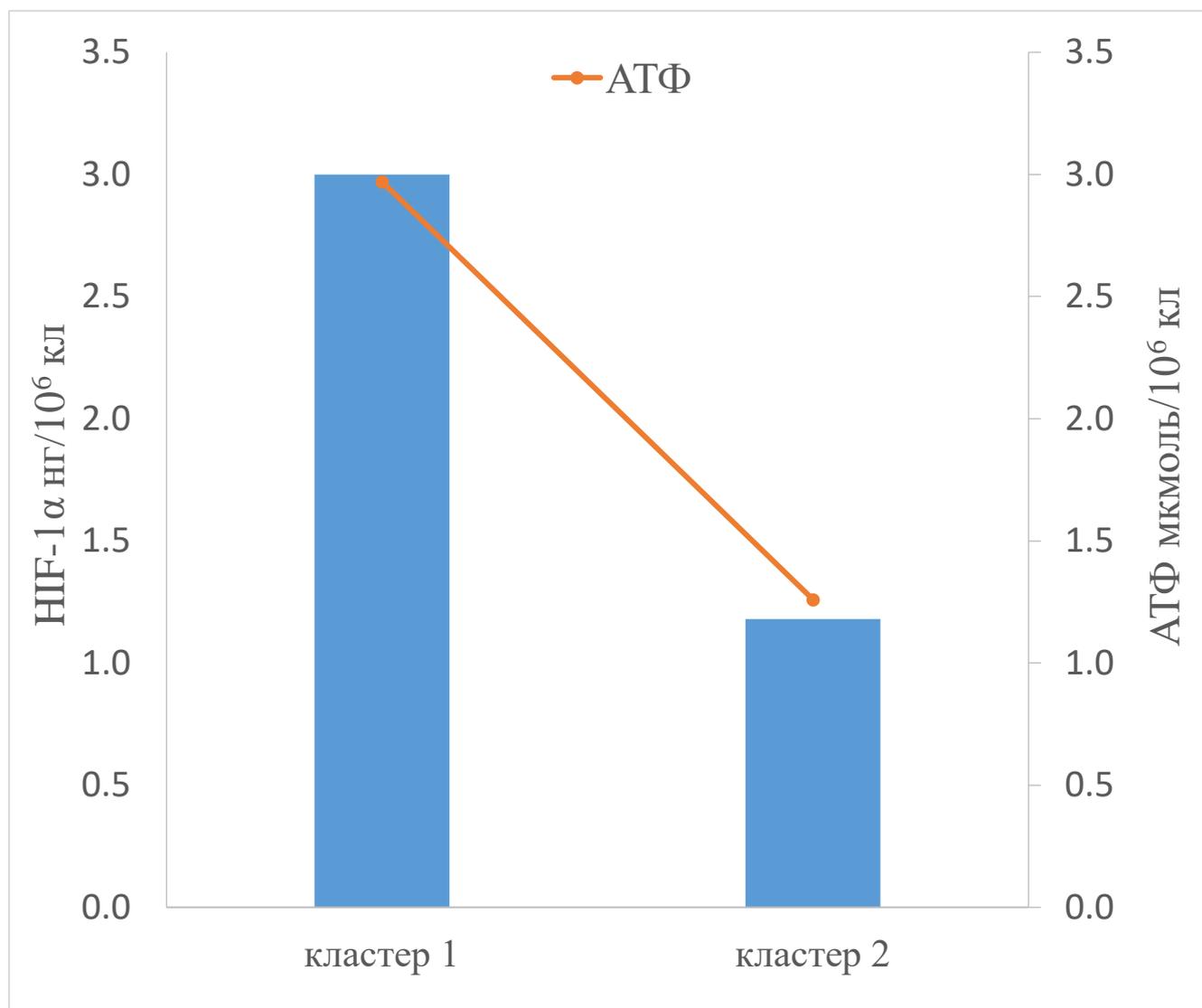


Рис. 16. Внутриклеточное содержание АТФ в группах с различающимся содержанием HIF-1 α

Из рисунка можно увидеть, что изменение внутриклеточной концентрации АТФ происходит однонаправленно с HIF-1 α .

Также для обеих групп были вычислены соотношения CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$, CD10 $^{+}$ /CD95 $^{+}$, CD4 $^{+}$ /CD23 $^{+}$, результаты представлены на рисунке 17.

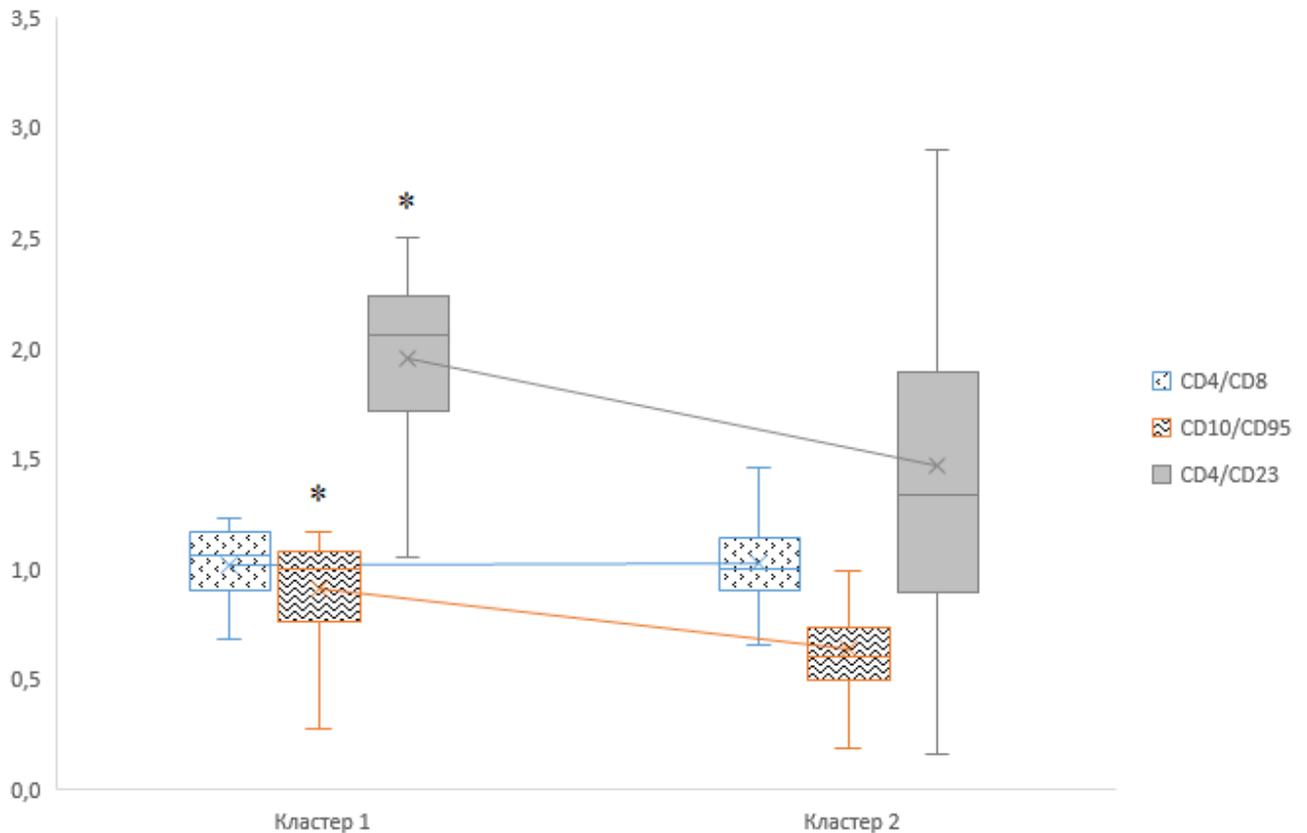


Рис. 17. Соотношения фенотипов лимфоцитов CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$, CD10 $^{+}$ /CD95 $^{+}$, CD4 $^{+}$ /CD23 $^{+}$ в кластерах.

Примечание: * – различия статистически значимы ($p < 0,05$)

В группе с более высоким содержанием HIF1- α наблюдается смещение соотношений CD10 $^{+}$ /CD95 $^{+}$, CD4 $^{+}$ /CD23 $^{+}$ в сторону более метаболически активных CD10 $^{+}$ и CD4 $^{+}$ клеток, что может говорить о преобладании в лимфоцитах с этими фенотипами гликолитического пути расщепления глюкозы.

HIF-1 α влияет на дифференцировку и функционирование различных субпопуляций Т-клеток в условиях нормоксии [144, 213]. Активированные и пролиферирующие Т-клетки могут дифференцироваться в различные функциональные субпопуляции, в значительной степени определяемые природой стимуляции антигеном, составом и уровнем цитокинов в окружающей клетку

среде; совместно с нижестоящей передачей сигналов, метаболической перестройкой и инициацией факторов транскрипции. Роль гликолиза, глутаминолиза, окислительного фосфорилирования в разных субпопуляциях лимфоцитов не одинакова [82, 114, 151]. Переход клеток на гликолитический путь метаболизма происходит под действием HIF-1 α , который может быть активирован независимым от кислорода способом, например, при антигенной стимуляции под действием mTOR и NF- κ B. Также стабилизация HIF-1 α может происходить под действием активных форм кислорода и при ингибировании пролингидроксилазы сукцинатом [64, 213].

При достаточном содержании кислорода активация экспрессии HIF-1 α происходит под действием STAT3 который может напрямую связываться с промотором HIF-1 α [170]. В свою очередь активация STAT3 происходит под действием IL-2 через его рецептор CD25 [69]. Субпопуляции CD4 $^{+}$ лимфоцитов Th1, Th2, Th17 и Treg имеют различную гликолитическую активность [130]. Для Th17 характерна наибольшая индукция гликолиза, а для Treg наименьшая. HIF-1 α играет непосредственную роль в дифференцировке Th17 посредством транскрипционной активации ROR γ t, являющегося ключевым фактором, необходимым для развития Th17 [211]. HIF-1 α необходим для увеличения активности гликолиза в цитотоксических Т-клетках после стимуляции TCR и способствует экспрессии многих факторов, участвующих в дифференцировке эффекторных CD8 $^{+}$ лимфоцитов [144]. В целом, при нормоксии HIF-1 α играет критическую роль в дифференцировке эффекторных Т-клеток Th1, Th17 и CD8 $^{+}$, ингибируя Treg. Также экспрессия HIF-1 α повышается в пролиферирующих лимфоцитах, что способствует их переходу на аэробный гликолиз.

Полученные результаты показывают, что в группе с более высоким содержанием HIF-1 α происходит снижение абсолютной концентрации лимфоцитов и всех измеренных фенотипов, при этом в популяционном составе преобладают клетки с более высокой метаболической активностью CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$, CD10 $^{+}$, CD25 $^{+}$, что может говорить о более высокой активности гликолиза в клетках с этими фенотипами.

В целом можно отметить что раздельное определение SIRT3 и HIF-1 α может дать информацию о преобладании гликолиза либо митохондриального метаболизма. Также было выявлено, что оба регуляторных белка способствуют увеличению внутриклеточной концентрации АТФ в разных субпопуляциях лимфоцитов. Поэтому при определении метаболической активности клеток адаптивной иммунной системы через измерение SIRT3 и HIF-1 α представляется важным учитывать возможные взаимодействия между этими белками. Известно, что регуляторное действие HIF-1 может приводить к изменениям митохондриального метаболизма, в частности, снижая интенсивность образования ацетил-СоА, за счет увеличения экспрессии PDK1, что ведет к снижению эффективности работы ТСА. Под действием HIF-1 может снижаться экспрессия переносчиков жирных кислот, что ведет к замедлению их окисления. Также под действием HIF-1 может снижаться интенсивность OXPHOS. Это происходит за счет снижения экспрессии белков железосерного кластера входящих в состав аконитазы и комплексов цепи переноса электронов. Кроме того, HIF-1 может снижать экспрессию PGC-1 α , играющего ключевую роль в регуляции активности митохондриального биогенеза и окислительных процессов, что непосредственно ведет к снижению экспрессии SIRT3 [70, 121, 144, 192, 213]. В целом можно заключить, что HIF-1 α снижает активность окислительных процессов в митохондриях, что негативно сказывается на активности OXPHOS и синтезе АТФ митохондриями. Таким образом более полное представление о влиянии SIRT3 и HIF-1 α на метаболическую активность лимфоцитов может быть получено при их одновременном измерении.

Для оценки степени влияния SIRT3 и HIF-1 α на клеточный метаболизм были обследованы 39 волонтеров, у которых проводилось измерение фенотипов лимфоцитов и определение концентрации SIRT3 и HIF-1 α в одной пробе, после чего рассчитывалось соотношение HIF-1 α /SIRT3.

При помощи кластерного анализа методом К-средних было выделено две группы в которых наблюдались статистически достоверные различия по большинству измеряемых показателей. Результаты представлены в таблице 4.

Концентрации HIF-1 α , SIRT3, лимфоцитов и их фенотипов в группах кластеров

Параметр	Кластер 1 (n = 24) М (SD)	Кластер 2 (n = 15) М (SD)	Уровень значимости Р
Лимфоциты 10 ⁶ кЛ/мл	2,3 (0,36)	1,5 (0,21)	<0,00001
CD310 ⁶ кЛ/мл	1,55 (0,29)	0,93 (0,11)	<0,00001
CD410 ⁶ кЛ/мл	0,81 (0,24)	0,49 (0,12)	<0,00002
CD810 ⁶ кЛ/мл	0,85 (0,21)	0,48 (0,07)	<0,00001
CD1010 ⁶ кЛ/мл	0,85 (0,28)	0,50 (0,13)	<0,00005
CD2310 ⁶ кЛ/мл	0,39 (0,12)	0,23 (0,05)	<0,00003
CD2510 ⁶ кЛ/мл	0,33 (0,09)	0,20 (0,04)	<0,00001
CD7110 ⁶ кЛ/мл	0,85 (0,24)	0,52 (0,19)	<0,00008
CD9510 ⁶ кЛ/мл	0,84 (0,28)	0,53 (0,18)	<0,00059
SIRT310 ⁶ кЛ/мл	0,28 (0,314)	0,22 (0,169)	0,5234
HIF1- α нг/10 ⁶ кЛ	1,127 (0,221)	1,635 (0,715)	<0,0096

Примечание: различия статистически значимы при $p < 0,05$.

Из данных представленных в таблице можно увидеть, что в группе первого кластера абсолютное содержание лимфоцитов статистически значимо выше, чем в группе кластера 2, также статистически значимо выше оказался уровень всех измеренных фенотипов. При этом внутриклеточная концентрация HIF-1 α в группе первого кластера оказалась статистически значимо ниже, чем в группе второго. В концентрации SIRT3 статистически значимых различий выявлено не было.

Было рассчитано соотношение $\text{HIF-1}\alpha/\text{SIRT3}$, которое оказалось статистически значимо выше в группе кластера 2 по сравнению с кластером 1, значения составили 7,4 (1,78) и 4,0 (0,69) соответственно. Данные о содержании фенотипов лимфоцитов и соотношении $\text{HIF-1}\alpha/\text{SIRT3}$ представлены на рисунке 18.

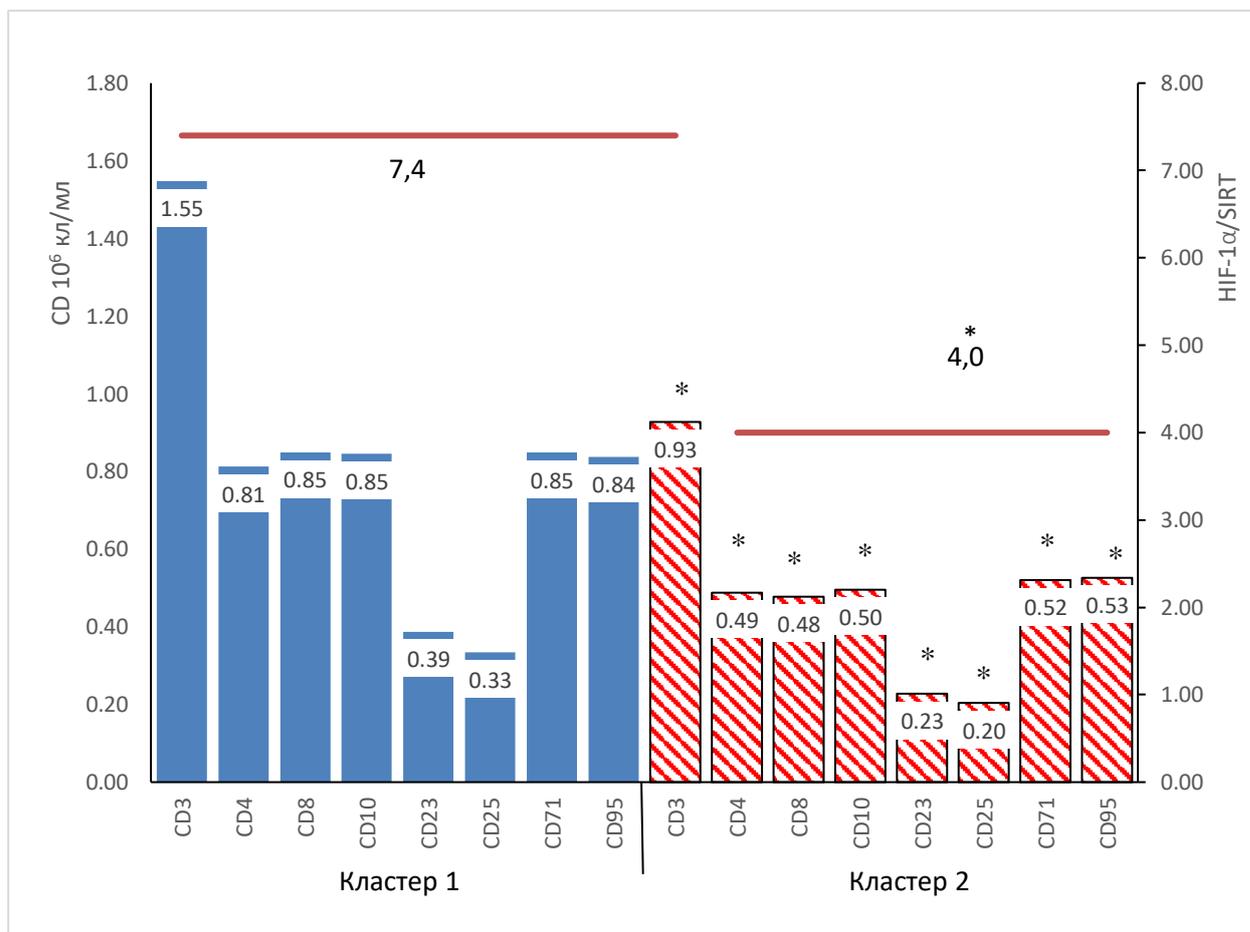


Рис. 18. Содержание фенотипов лимфоцитов и изменение соотношения сигнальных молекул в группах кластеров

*Примечание: * – различия статистически значимы ($p < 0,05$).*

Из переведенных результатов можно увидеть, что изменение соотношения $\text{HIF-1}\alpha/\text{SIRT3}$, влияет на количественные показатели лимфоцитарного пула в периферической крови. Так при увеличении соотношения $\text{HIF-1}\alpha/\text{SIRT3}$ выявлено снижение абсолютной концентрации лимфоцитов и всех измеренных фенотипов.

Обнаружено, что в группе с более высоким $\text{HIF-1}\alpha/\text{SIRT3}$ концентрация АТФ в лимфоцитах также увеличивалась. Значения АТФ составили 3,71 (1,07) и 1,25

(0,72) ($p = 0,0004$) соответственно для групп первого и второго кластеров. Результаты сравнительного анализа представлены на рисунке 19.

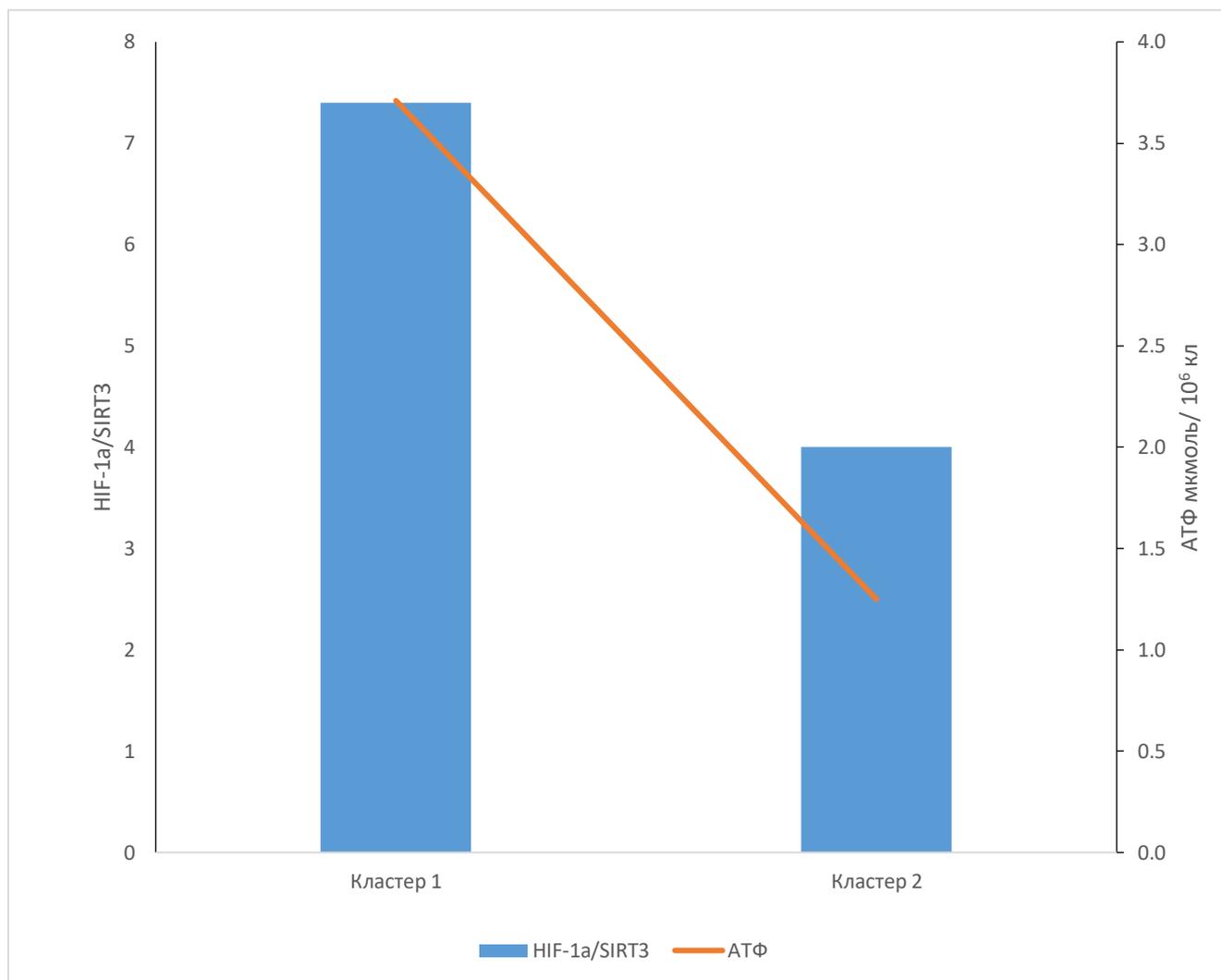


Рис. 19. Изменение уровня АТФ в зависимости от соотношения HIF-1α к SIRT3

Чтобы выявить влияние соотношения HIF-1α/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-1α/SIRT3 преобладали лимфоциты с фенотипами CD4+, CD8+, CD10+, CD25+. В группе с более низким соотношением HIF-1α/SIRT3 был выше удельный вес лимфоцитов с фенотипами CD23+, CD95+. Удельный вес CD71+ лимфоцитов статистически значимо не различался. Результаты представлены на рисунке 20.

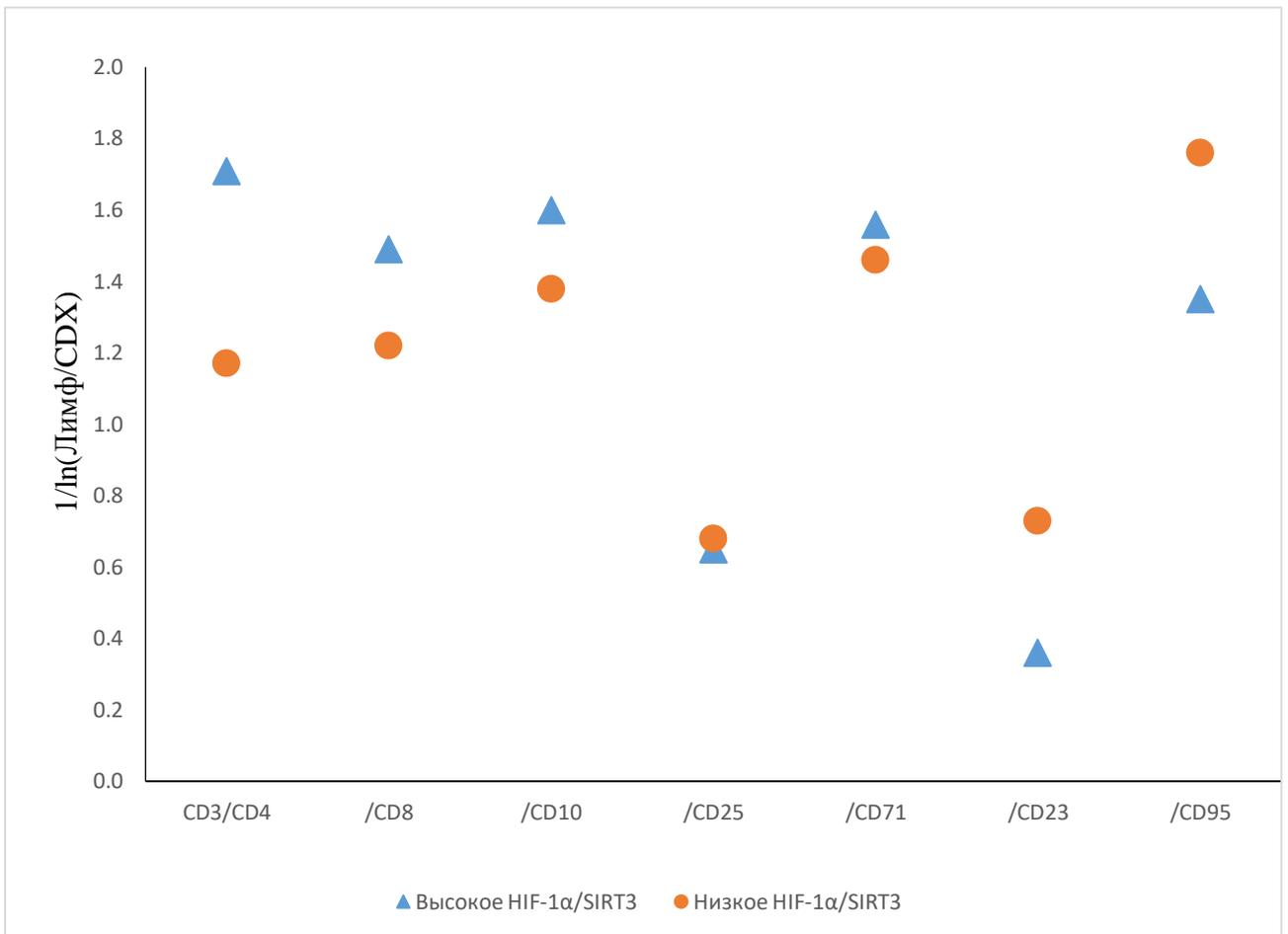


Рис. 20. Распределение фенотипов лимфоцитов в группах с различающимся соотношением SIRT3/HIF-1 α .

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.

3.3 Влияние изменения внутриклеточной концентрации АТФ на популяционный состав лимфоцитов периферической крови

Кратковременное действие холода может оказать влияние на функции лимфоцитов человека. Было показано, что короткие периоды воздействия низких

температур (2-3 минуты) могут оказывать стимулирующее воздействие на иммунную систему. Обнаружено, что краткое воздействие холода способствовало увеличению числа лимфоцитов и активации некоторых важных маркеров иммунной активности в периферической крови. Также было показано, что действие холода может приводить к снижению концентрации провоспалительных цитокинов [4, 6, 15, 24]. Эти эффекты могут быть обусловлены тем, что 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 [38, 43, 246].

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 холодной пробы (см. рисунки 21, 22).

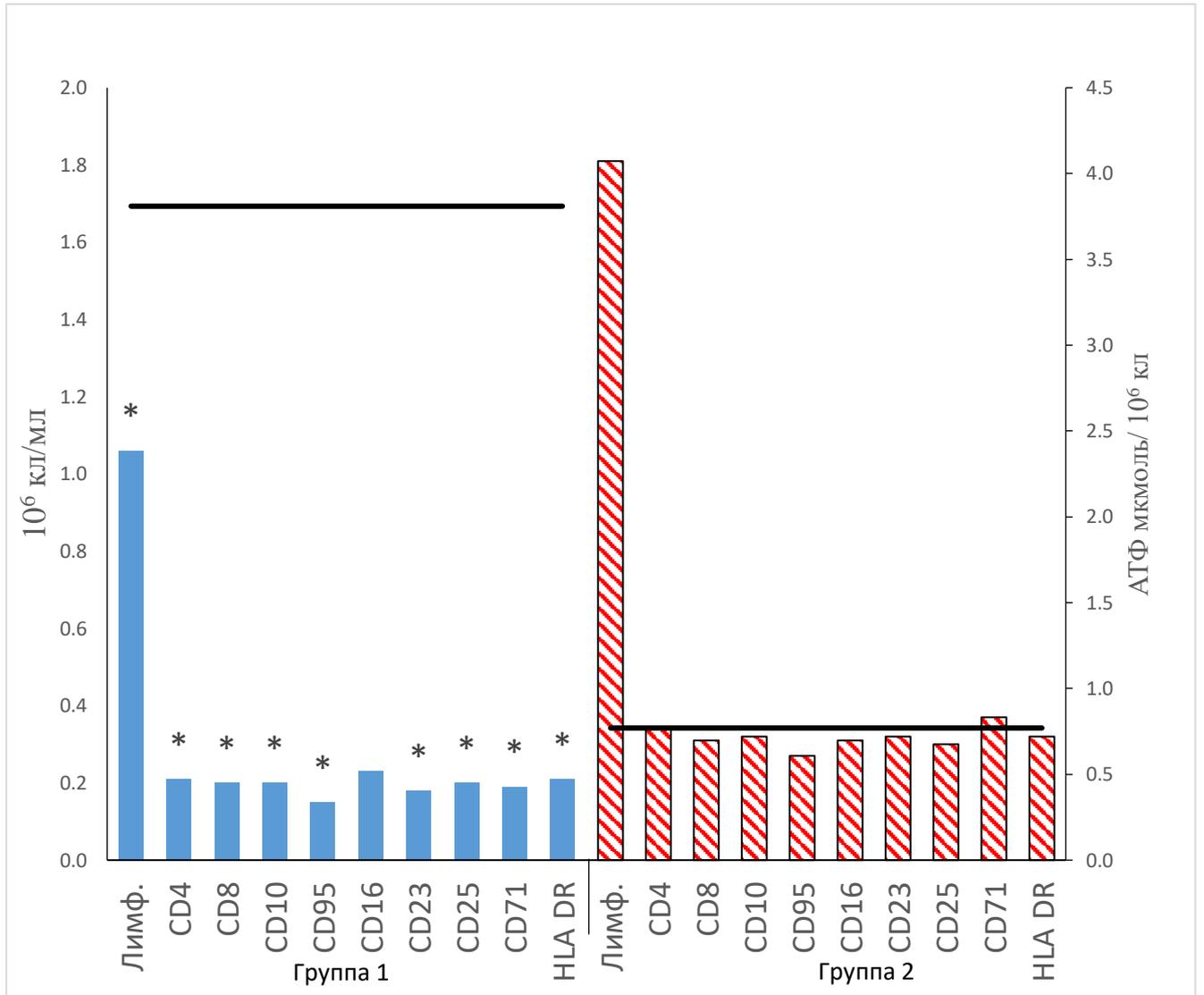


Рис. 21. Концентрация АТФ, лимфоцитов и их фенотипов в группах кластеров.

Примечание: * – различия статистически значимы ($p < 0,05$)

Сравнительный анализ значений групп кластеров 1 и 2, полученных до холодной пробы выявил, что в группе кластера 2 относительно группы кластера 1 внутриклеточная концентрация АТФ лимфоцитов была выше, абсолютное содержание лимфоцитов и CD4+, CD8+, CD10+, CD23+, CD25+, CD71+, CD95+ и HLADR+ клеток ниже. Содержание CD16+ клеток статистически достоверно не различалось.

Обнаружены статистически значимые различия в цитокиновом профиле. Результаты сравнительного анализа отражены на рисунке 22.

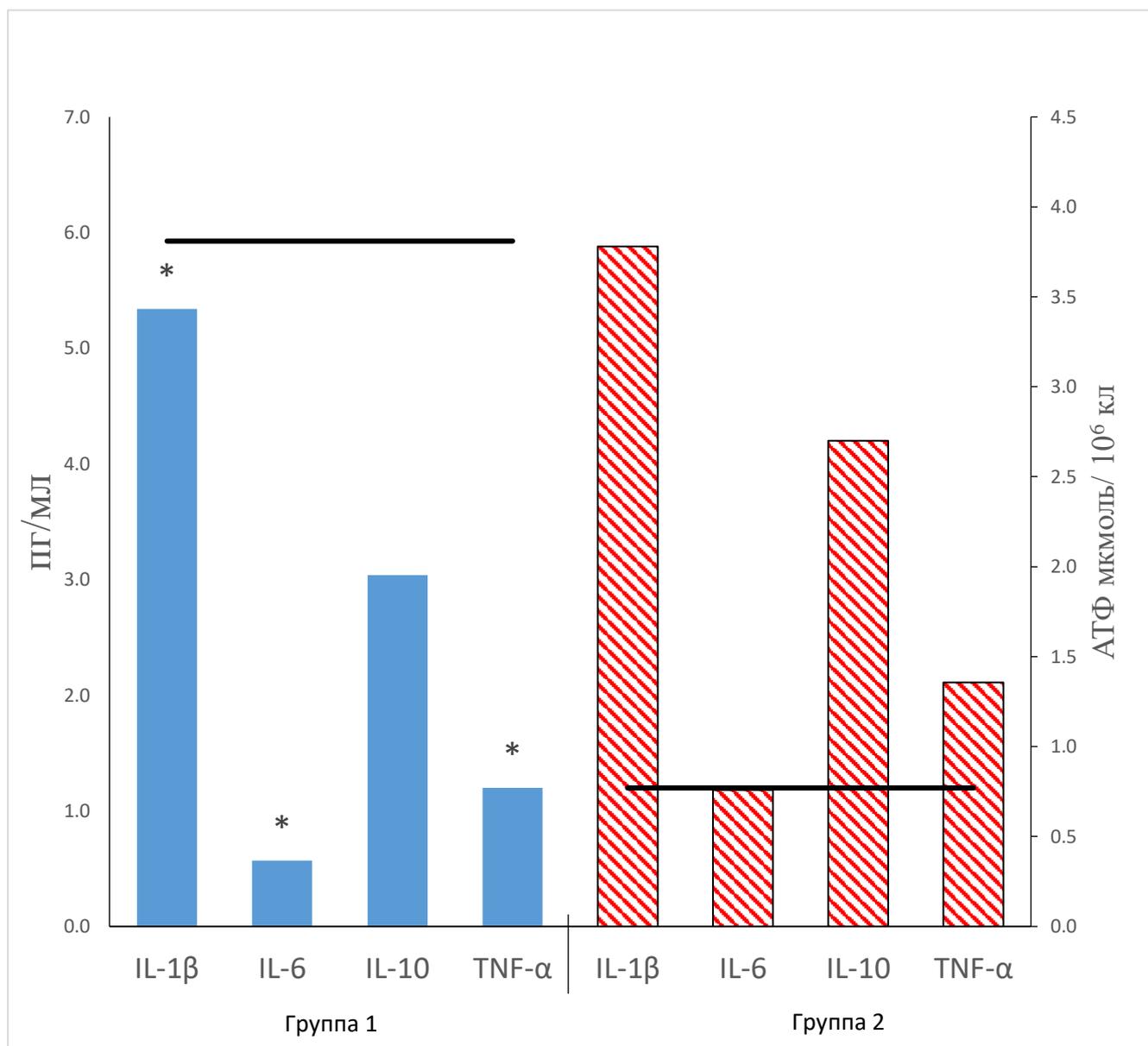


Рис. 22. Концентрации АТФ и цитокинов в группах кластеров

Примечание: * – различия статистически значимы ($p < 0,05$)

В группе кластера 1 цитокиновый профиль характеризуется более низкими концентрациями IL-1β, IL-6 и TNF-α по сравнению с группой кластера 2, при этом статистически достоверных различий в концентрации IL-10 между группами кластеров выявлено не было. IL-1β, IL-6 и TNF-α являются провоспалительными цитокинами и способствуют активации, дифференцировке и миграции клеток в ткани, а противовоспалительный цитокин IL-10 подавляет активность этих процессов. Увеличение соотношения провоспалительных цитокинов к

противовоспалительным показывает увеличенную фоновую активацию иммунной системы.

Далее проводился сравнительный анализ значений, полученных до и после холодной пробы, внутри групп кластеров.

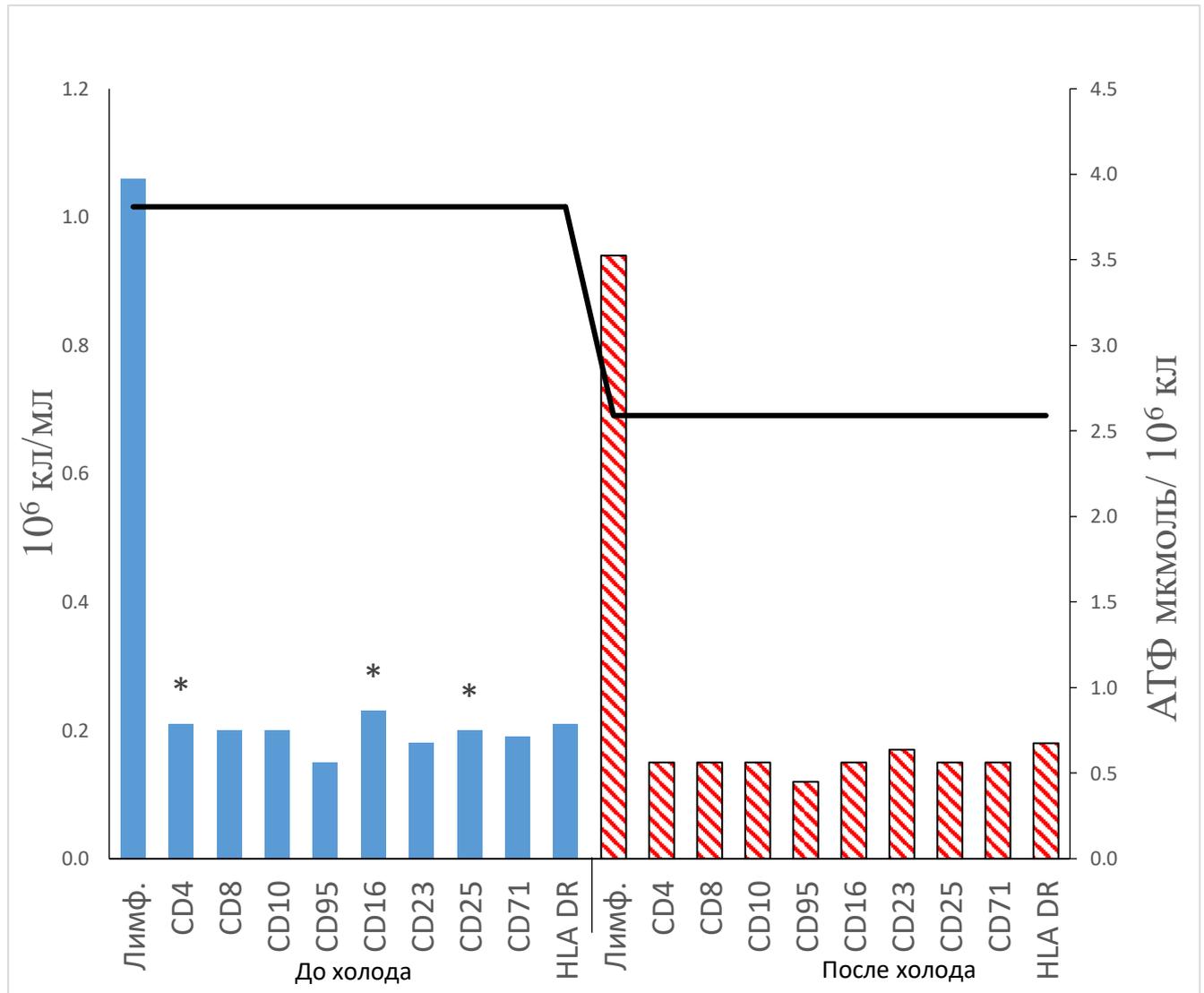


Рис. 23. Содержание лимфоцитов и их фенотипов до и после кратковременного действия холода в группе первого кластера

*Примечание: * – различия статистически значимы ($p < 0,05$)*

В группе первого кластера в ответ на кратковременное действие холода выявлено статистически значимое снижение внутриклеточной концентрации АТФ, на фоне которого обнаружены изменения в пуле лимфоцитов периферической крови. Абсолютное содержание лимфоцитов в ответ на действие холода статистически значимо не изменилось, однако снизились концентрации CD4+,

CD16+, CD25+ клеток (см рисунок 23). Наибольшее снижение было характерно для CD16+ лимфоцитов с $0,23 (0,105) \cdot 10^6$ кл/л до $0,15 (0,085) \cdot 10^6$ кл/л ($p = 0,0257$), концентрации остальных измеренных фенотипов статистически значимо не различались. Также снизился удельный вес этих клеток внутри популяции на 5,8%, 3,9 % и 3%, и для CD16+, CD25+ и CD4+ соответственно (см. рисунок 23).

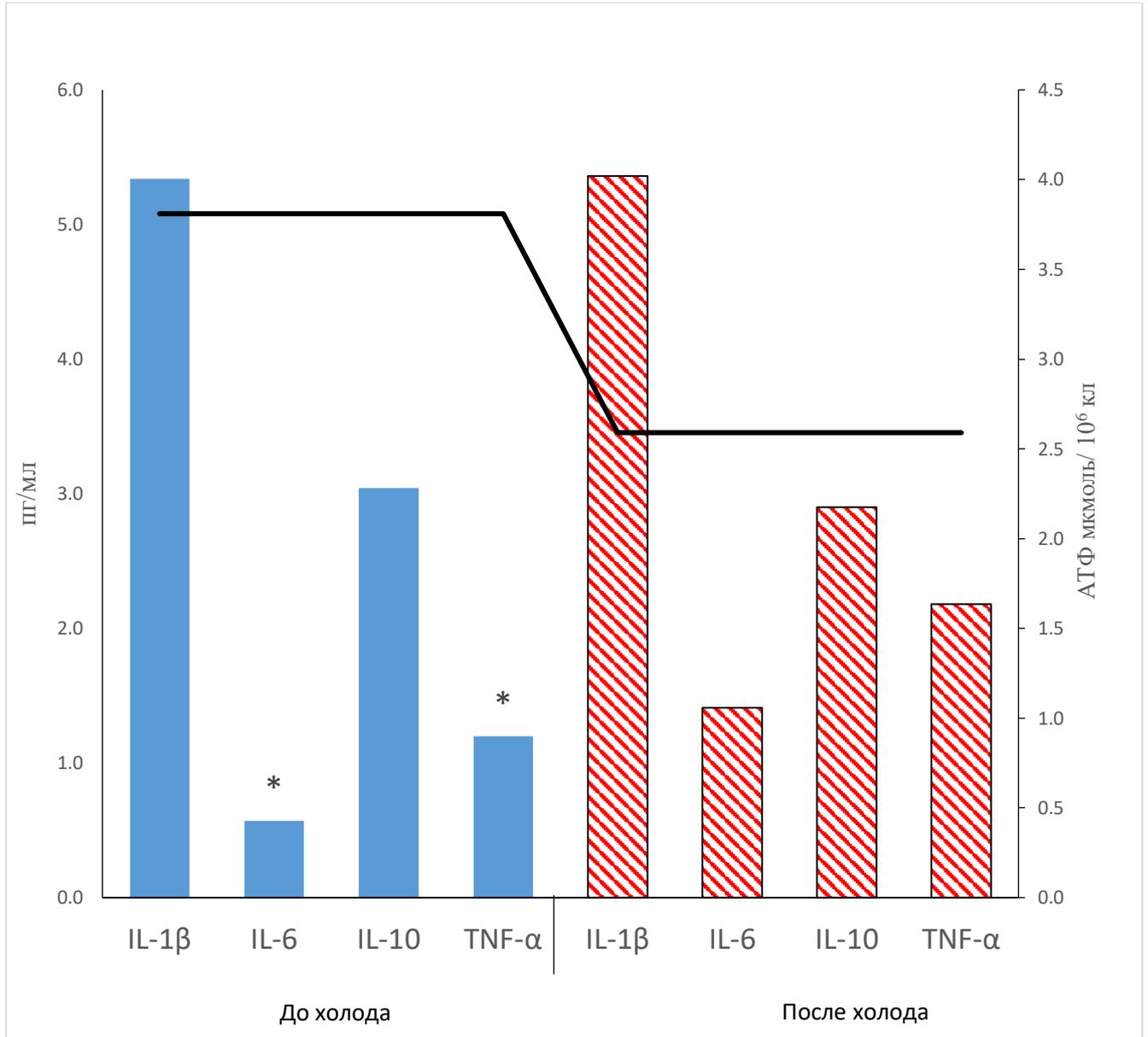


Рис. 24. Содержание цитокинов в плазме до и после холодной пробы в группе первого кластера

*Примечание: * – различия статистически значимы ($p < 0,05$)*

Сравнительный анализ цитокинового профиля до и после холодной пробы выявил статистически значимое повышение концентраций про-воспалительных

цитокинов IL-6 и TNF- α (см. рисунок 24). 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. 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 (см. рисунок 24).

Для адаптации к существованию в условиях пониженной температуры лимфоциты активируют ряд механизмов, которые регулируют их метаболизм. На поверхности лимфоцитов находятся чувствительные к изменениям температуры окружающей среды рецепторы семейства TRP, например, термочувствительные рецепторы TRPV1,4 и TRPM8. Эти рецепторы - это кальциевые ионные каналы, которые активируются при понижении температуры и способствуют поступлению ионов кальция в клетку [38]. Увеличение концентрации свободного кальция в цитозоле играет важную роль в активации Т-лимфоцитов, стимулирует транскрипцию, деление и дифференциацию Т-клеток в различные эффекторные субпопуляции. Ключевыми регуляторами, зависящими от концентрации кальция в цитозоле, являются кальциневрин и активированный ядерный фактор Т-клеток [86].

Также при адаптации к действию холода организм может активировать специальные протеины, такие как белки холодового шока. Одним из таких белков является CIRP. Его активация происходит при гипотермии, а механизм действия заключается в трансляции и увеличении устойчивости определенных мРНК. Цитопротекторное воздействие CIRP осуществляется за счёт активации нуклеарного фактора NF- κ B, а также через повышение экспрессии белков Bcl-2 и Bcl-x1, препятствующих апоптозу [246]. Кроме того, при воздействии холодового стресса наблюдается увеличение образования АФК, а CIRP способствует активации антиоксидантной защиты, снижая негативное влияние активных форм кислорода на клетку [208]. В то же время, попадая во внеклеточное пространство,

CIRP взаимодействует с рецепторами TLR4, что инициирует иммунный ответ и стимулирует выработку провоспалительных цитокинов [43].

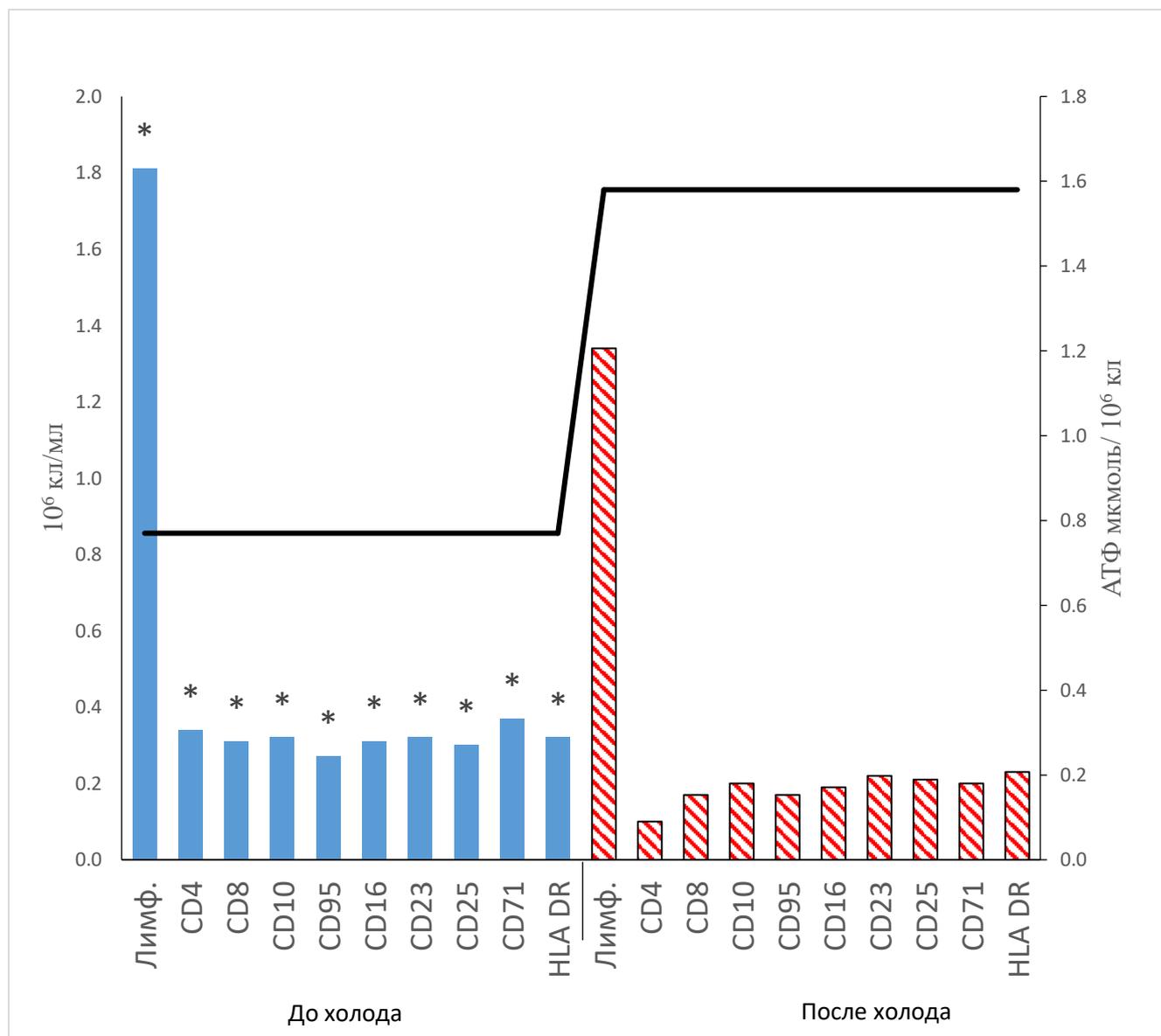


Рис. 25. Содержание лимфоцитов и их фенотипов до и после кратковременного действия холода в группе второго кластера

*Примечание: * – различия статистически значимы ($p < 0,05$)*

В группе кластера 2 на фоне статистически значимого повышения уровня АТФ после холодового воздействия произошло статистически значимое уменьшение абсолютной концентрации лимфоцитов и всех измеренных фенотипов, при этом наибольшее снижение выявлено в содержании CD4+ клеток с $0,34 (0,176) \cdot 10^6$ кл/л до $0,10 (0,087) \cdot 10^6$ кл/л ($p = 0,0002$) (рисунок 25).

В цитокиновом профиле выявлено снижение лимфоцит-активирующего цитокина IL-1 β (см. рисунок 26).

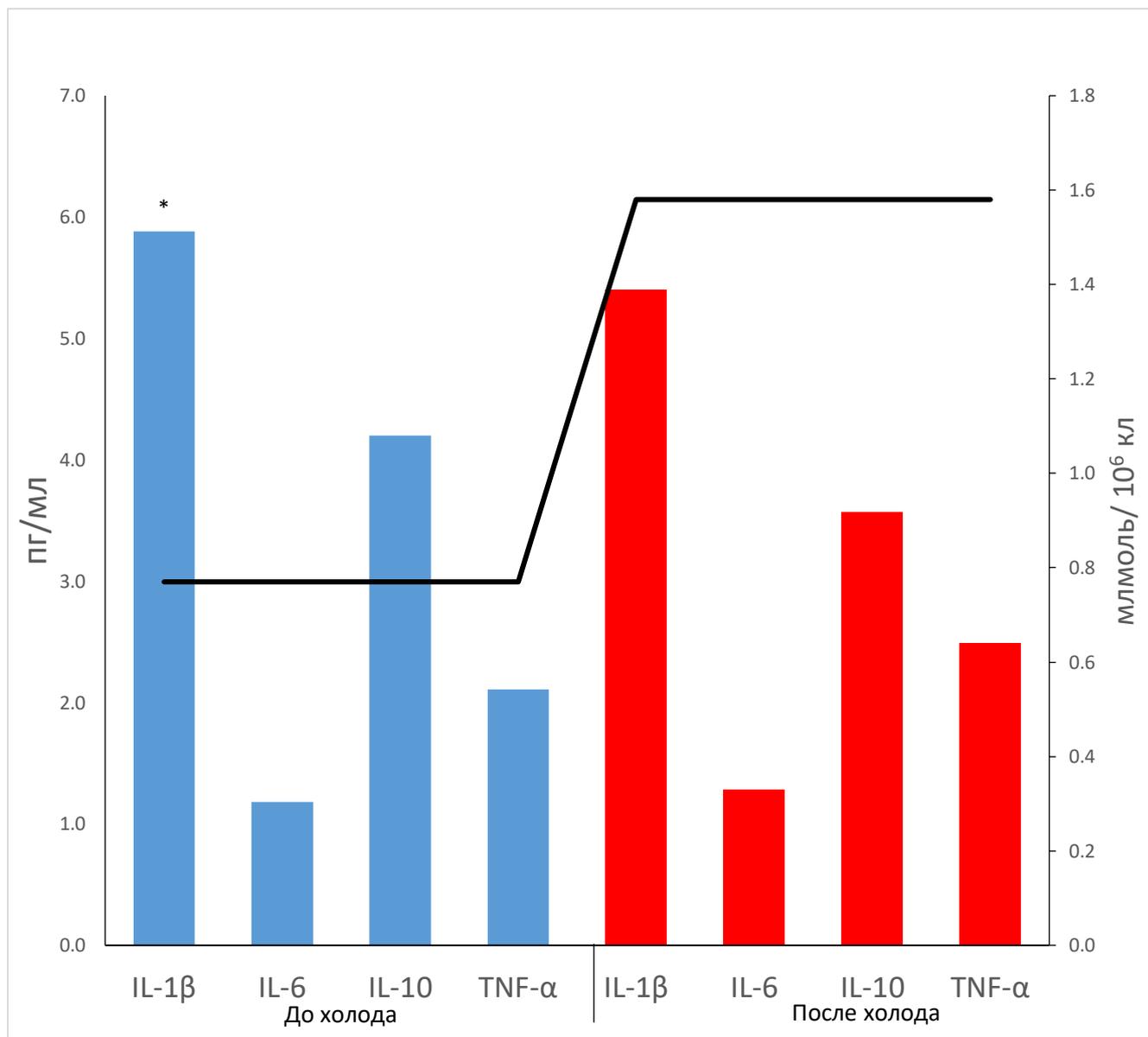


Рис. 26. Содержание цитокинов в плазме до и после холодовой пробы в группе второго кластера

*Примечание: * – различия статистически значимы ($p < 0,05$)*

Важно отметить, что в этой группе на фоне сниженной внутриклеточной концентрации АТФ содержание лимфоцитов, всех фенотипов и провоспалительных цитокинов было повышено относительно группы первого кластера, что предполагает протекание в иммунной системе активационных процессов до холодового воздействия на организм. Чтобы не допустить чрезмерной активации в клетках задействуется ряд механизмов, направленных на

ингибирование провоспалительных процессов. В частности, связанные со стимуляцией, увеличение концентрации АМФ приводит к активации АМПК. Повышенное регулирование АМПК приводит к снижению экспрессии ряда белков, способствующих клеточной активации и дифференцировке, одним из них является ядерный фактор активированных Т-клеток. При этом увеличивается активность митохондриального метаболизма, в том числе при регуляторном воздействии SIRT3. Изменение баланса между гликолизом и окислительным фосфорилированием влияет на соотношение Th17/Treg, смещая его в сторону дифференцировки Т-регуляторных клеток. Вместе все эти процессы ведут к снижению пролиферации и функциональной активности лимфоцитов, что выражается в падении концентрации всех фенотипов лимфоцитов и снижении секреции лимфоцит-активирующего цитокина IL-1 β . Результатом такого ингибирующего воздействия является повышение внутриклеточного содержания АТФ.

Таким образом иммунное реагирование в ответ на действие низких температур проявляется изменениями субпопуляционного состава лимфоцитов, уровня цитокинов и сопряжено с энергетическим обеспечением иммунокомпетентных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В эффективном функционировании иммунной системы ключевую роль играют различные субпопуляции иммунокомпетентных клеток, в частности Т-хелперы и цитотоксические Т-лимфоциты. Эти клетки имеют высокие энергетические потребности, которые связаны с их способностью к пролиферации, продукции специфических цитокинов и эффекторных молекул. Энергия, необходимая для выполнения этих функций, поставляется главным образом за счет метаболизма глюкозы, аминокислот и жирных кислот [65, 82, 88].

Важность энергетического обеспечения лимфоцитов также была продемонстрирована в механизмах иммунологической толерантности и контроля иммунного ответа. Показано, что замещение глюкозы другими метаболическими субстратами у Т-клеток приводит к снижению их функциональной активности и продукции специфических цитокинов [152]. Изменения в метаболизме лимфоцитов были выявлены при различных патологических состояниях, например, у лиц с сахарным диабетом обнаруживались нарушения метаболизма глюкозы в Т-лимфоцитах, что приводило к снижению функциональной активности этих клеток [163]. Аналогичные нарушения ассоциировались с другими патологиями, такими как аутоиммунные заболевания, рак и инфекции [56, 134, 231].

Таким образом, оценка уровня энергетической обеспеченности и метаболической активности лимфоцитов может быть полезной в диагностике и мониторинге различных заболеваний, особенно тех, которые связаны с изменением метаболизма клеток. Кроме того, эти параметры могут использоваться для оценки эффективности различных методов лечения.

АТФ является наиболее часто используемым источником энергии для осуществления энергозависимых внутриклеточных процессов, таких как поддержание мембранного потенциала, транспорт органелл, ядерно-цитозольные транслокации, синтез эффекторных молекул и многие другие. Основным фактором, определяющим внутриклеточную концентрацию АТФ, является баланс между катаболическими и анаболическими процессами. Потребности в

метаболитах и энергии для различных видов Т-клеток варьируются [14, 147, 148, 152, 171, 179]. Наивные Т-клетки поддерживают состояние покоя с относительно низкими энергетическими потребностями. Глюкоза, жирные кислоты и аминокислоты могут расщепляться до пирувата, ацетил-КоА или других промежуточных продуктов, которые преимущественно поступают в митохондрии. Синтез АТФ происходит в основном за счет работы ОХРНOS. [80]. После активации эффекторные Т-клетки переходят на преимущественное использование аэробного гликолиза для удовлетворения повышенного спроса на энергию и промежуточные метаболиты необходимые для быстрого роста, деления, дифференцировки клеток и синтеза эффекторных молекул [200]. В этом процессе, поскольку доступные аминокислоты переводятся из цикла трикарбоновых кислот в синтез белка, а доступные жирные кислоты направляются в мембранный синтез, большая часть АТФ образуется в результате гликолиза [228, 231, 232, 237]. В отличие от наивных и эффекторных лимфоцитов, Т-клетки памяти увеличивают митохондриальную массу, в основном используют β -окисление жирных кислот и митохондриальный ОХРНOS для обеспечения долгосрочного выживания и поддержания ответной реакции при вторичной антигенной стимуляции [179].

Изменения в метаболизме Т-клеток также происходят при длительной стимуляции, вызываемой как активацией ТСR, так действием провоспалительных цитокинов и иных стимулов. При этом может происходить «истощение» иммунокомпетентных клеток, когда они постепенно теряют свою функциональную активность: сначала снижается продукция ИL-2, потенциал пролиферации и цитолитическая активность, затем экспрессия IFN γ и TNF- α , что приводит к нарушению их функциональной активности [42, 67, 110]. Истощенные Т-лимфоциты сверх экспрессируют различные ингибирующие рецепторы, такие как PD-1, TIM-3, LAG-3 и другие [96, 98, 241]. Кроме того, хроническая стимуляция Т-клеток сопровождается изменениями в экспрессии факторов транскрипции, в частности наблюдается повышение экспрессии Blimp-1 и BATF, при этом происходит подавление экспрессии T-bet [73, 169, 229]. В результате, несмотря на сохраняющийся высокий уровень гликолитической активности, поглощение

глюкозы снижается. Выявляется сниженная экспрессия PGC-1 α , который участвует в регуляции митохондриального биогенеза [91], что ведет к избыточному образованию АФК, повреждению митохондриальной мембраны, снижению ее потенциала и в итоге к неспособности Т-клеток эффективно использовать OXPHOS для продукции АТФ [180].

Результаты проведенного нами исследования показывают, что в группе с более низким содержанием АТФ выявляется повышение абсолютной концентрации лимфоцитов и всех измеренных фенотипов. Такие изменения в общем пуле лимфоцитов могут быть объяснены активным протеканием процессов пролиферации и дифференцировки клеток, что сопровождается более высоким расходом АТФ. Однако, чтобы не допустить избыточной активации иммунных реакций адаптивного иммунитета и ограничить экспансию иммунных клеток, активируется ряд механизмов, направленных на сдерживание этих процессов. Одним из таких механизмов является программируемая клеточная гибель [137, 195, 204]. При оценке процентного содержания фенотипов было выявлено увеличение относительно группы с более высоким содержанием АТФ удельного веса CD95+ лимфоцитов и более низкое соотношение CD10+/CD95+. Также выявлено увеличение доли CD23+ лимфоцитов и снижение соотношение CD4+/CD23+. Такое смещение дифференцировки от хелперных клеток к CD23+ лимфоцитам может являться следствием истощения клеток в следствие длительно текущей стимуляции, ведущей к увеличению экспрессии Blimp-1 и BATF, необходимых для дифференцировки антителопродуцирующих лимфоцитов, и снижению экспрессии T-bet, являющегося основным фактором дифференцировки Т-клеток [73, 169, 229]. Дополнительно, повышенный расход АТФ лимфоцитами HLADR+, CD23+, CD95+ подтверждается наличием статистически достоверных отрицательных корреляций между содержанием этих фенотипов и внутриклеточной концентрацией АТФ.

В целом, полученные данные позволяют предположить, что сниженный уровень АТФ является следствием более напряженной работы системы иммунитета. Активация иммунных клеток опосредует их пролиферацию и дифференцировку, что ведет к смещению метаболических процессов от

катаболических к анаболическим, повышая потребление АТФ, при этом задействуется ряд механизмов, сдерживающих иммунное реагирование, которые тоже повышают энергетические траты [50, 130]. Длительная стимуляция может приводить к постепенному истощению, вызывающему нарушения в метаболизме Т-клеток и невозможности эффективно использовать как гликолиз, так и ОXPHOS для наработки АТФ. При этом происходит сдвиг дифференцировки от CD4+ к CD23+ клеткам и преимущественная реализация иммунного ответа по гуморальному механизму [73, 169, 229]. Таким образом более низкая внутриклеточная концентрация АТФ в данной группе может указывать на сниженную способность лимфоцитов к реагированию.

Увеличение внутриклеточного содержания АТФ может происходить при снижении пролиферативной активности и увеличении доли клеток с повышенной активностью гликолиза. В группе где внутриклеточное содержание АТФ было выше, а общее количество лимфоцитов ниже, анализ распределения удельного веса измеренных фенотипов лимфоцитов показал преобладание CD4+, CD8+, CD10+, CD25+, CD71+ клеток. 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.

Основными путями производства АТФ являются гликолиз и митохондриальный метаболизм. Эти пути имеют важное значение в регуляции функции лимфоцитов и их дифференцировке, в частности, ингибирование гликолиза или усиление ОXPHOS может приводить к изменению направления дифференцировки лимфоцитов, например, смещению баланса Th17/Treg, и способствовать образованию Т-клеток памяти. Поэтому важное значение имеют белки, связанные с регуляцией этих метаболических путей, к ним относятся HIF-1 α и SIRT3 [34, 99, 196, 237].

Анализ влияния внутриклеточной концентрации регуляторных белков выявил, что к увеличению внутриклеточной концентрации АТФ приводит как

повышение содержания HIF-1 α , такие SIRT3, однако были выявлены разнонаправленные изменения в популяционном составе.

При анализе групп с различающейся концентрацией SIRT3 было выявлено, что в группе с более высоким содержанием SIRT3 концентрация лимфоцитов и всех фенотипов была ниже, при этом между группами имелись значимые различия в популяционном составе. Так при анализе относительного содержания фенотипов было выявлено повышение CD23⁺ и CD95⁺ лимфоцитов, соотношения CD10⁺/CD95⁺, CD4⁺/CD23⁺ также были сдвинуты в сторону лимфоцитов с фенотипами CD23⁺ и CD95⁺.

Повышение активности митохондриального метаболизма характерно для CD95⁺ клеток, меченных к апоптозу. CD95 может инициировать два первичных сигнальных пути. Один из них индуцирует апоптоз. Программируемая клеточная смерть является весьма энергетически затратным процессом. Данные научной литературы показывают, что в апоптирующих клетках концентрация АТФ поддерживается на высоком уровне [244], при этом происходит ингибирование гликолиза за счет стимуляции экспрессии проапоптического белка p53. Белок p53 негативно регулирует экспрессию гексокиназы и снижает захват глюкозы за счет подавления экспрессии белка переносчика глюкозы GLUT1 [95]. Активность ОXPHOS повышается за счет увеличения экспрессии белка сборки цитохром С оксидазы – фермента цепи переноса электронов митохондрий [189]. Другой путь способствует неапоптическому Fas-опосредованному сигнальному каскаду. Fas-опосредованная передача запускает сигнальный каскад митоген-активируемой протеинкиназы, что приводит к усилению экспрессии NF- κ B [109, 115, 154]. В свою очередь NF- κ B связывается с промотором SIRT3, усиливая его экспрессию [158].

SIRT3 играет важную роль в работе CD23⁺ лимфоцитов. Исследования показали, что SIRT3 играет роль в поддержании метаболического баланса и способствует выживанию CD23⁺-клеток. В частности, было показано, что SIRT3 регулирует энергетический метаболизм CD23⁺ клеток, способствуя преимущественному окислению жирных кислот и переходу этих клеток на

митохондриальный метаболизм, что позволяет поддерживать продукцию антител [76, 243].

При анализе влияния уровня HIF-1 α на распределение исследуемых субпопуляций лимфоцитов нами было выявлено, что в группе с более высоким содержанием HIF-1 α удельный вес лимфоцитов с маркерами дифференциации эффекторных (CD4, CD8), пролиферирующих (CD10) клеток, клеток с рецептором к IL2 (CD25) был выше, чем в группе с более низким содержанием HIF-1 α .

При достаточном уровне кислорода активация экспрессии HIF-1 α стимулируется через непосредственное связывание STAT3 с промотором HIF-1 α . В свою очередь, активация STAT3 происходит под воздействием IL-2 через рецептор CD25 [170]. Различные субпопуляции CD4⁺ лимфоцитов, включая Th1, Th2, Th17 и Treg, проявляют разную гликолитическую активность [203]. Th17 характеризуются наибольшей индукцией гликолиза, а Treg – наименьшей. В процессе дифференциации Th17 HIF-1 α играет важную роль в качестве ключевого фактора, необходимого для транскрипционной активации ROR γ t [61]. HIF-1 α также увеличивает активность гликолиза в цитотоксических Т-клетках после стимуляции TCR и способствует экспрессии многих факторов, необходимых для дифференцировки эффекторных CD8⁺ лимфоцитов [9]. В целом, в условиях нормоксии HIF-1 α влияет на дифференциацию эффекторных Т-клеток Th1, Th17 и CD8⁺ и тормозит Treg. Экспрессия HIF-1 α также повышается у пролиферирующих лимфоцитов, что способствует переходу на аэробный гликолиз. Кроме того, HIF-1 α может непосредственно регулировать экспрессию мембранного белка CD10 [41]. Важно понимать, что для регуляции дифференцировки и поддержания функциональной активности лимфоцитов необходимо соблюдение баланса между активностью гликолиза и OXPHOS. В целом большая активность гликолиза характерна для активированных эффекторных клеток, участвующих в иммунном ответе, в то время, когда Treg, клетки памяти и апоптирующие лимфоциты преимущественно используют OXPHOS [162, 194, 195], что было выявлено при отдельном анализе влияния внутриклеточного содержания HIF-1 α и SIRT3. Однако более полную информацию о влиянии этих белков на энергетическую

обеспеченность и метаболическую активность пула лимфоцитов дает соотношение HIF-1 α /SIRT3. Сравнительный анализ выявил, что в группе с более высоким соотношением HIF-1 α /SIRT3 преобладали лимфоциты с кластерами дифференцировки CD4, CD8, CD10 и CD25. В группе с более низким соотношением HIF-1 α /SIRT3 был выше удельный вес лимфоцитов с поверхностными белками CD23 и CD95. Внутриклеточная концентрация АТФ также оказалась выше в группе с более высоким соотношением HIF-1 α /SIRT3. Важно отметить, что статистически достоверной разницы между внутриклеточными концентрациями SIRT3 в группах выявлено не было и изменение соотношения HIF-1 α /SIRT3 обусловлено повышением внутриклеточной концентрации именно HIF-1 α . Это позволяет предположить, что увеличение концентрации АТФ в клетках связано с активацией гликолиза.

Установление взаимосвязи между изменением внутриклеточной концентрации АТФ и направленностью механизмов иммунного реагирования проводилось при кратковременном общем охлаждении организма. 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 [36, 72, 246].

При статистической обработке полученных нами данных кластерным анализом были выделены группы, различающиеся по внутриклеточной концентрации АТФ. В ответ на кратковременное действие холода в группе с изначально более высокой внутриклеточной концентрацией АТФ произошло ее статистически значимое снижение, при этом изменения в пуле лимфоцитов периферической крови характеризовались уменьшением концентраций CD4⁺, CD16⁺, CD25⁺ клеток. Внутри популяции снизился удельный вес этих клеток, более всего уменьшился удельный вес CD16⁺ лимфоцитов, на 5,8%. Концентрации остальных измеренных фенотипов, как и абсолютное содержание лимфоцитов не

изменились. Кроме того, произошло повышение концентраций провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α , что может предполагать вероятность развития неинфекционного воспалительного ответа. Для адаптации к работе в условиях сниженной температуры лимфоциты используют ряд механизмов, регулирующих процессы их метаболизма. На мембране лимфоцитов экспрессируются чувствительные к различным изменениям факторов внешней среды рецепторы семейства TRP, например, термочувствительные рецепторы TRPV1,4 и TRPM8. Эти рецепторы представляют собой кальциевые ионные каналы и активируются при понижении температуры, способствуя притоку ионов кальция внутрь клетки [38]. Увеличение концентрации свободного цитозольного кальция играет важную роль в активации Т-лимфоцитов, инициации транскрипции, пролиферации и дифференцировке Т-клеток в эффекторные клетки. Основными регуляторами, зависящими от цитозольной концентрации кальция, являются кальциневрин и ядерный фактор активированных Т-клеток [86, 216]. Также для адаптации к снижению температуры могут быть задействованы белки холодового шока. Одним из них является CIRP. Его активация происходит при гипотермии, а механизм действия реализуется за счет трансляции и увеличения стабильности некоторых специфических мРНК [123]. Цитопротекторное действие CIRP реализуется через активацию нуклеарного фактора NF- κ B и экспрессию антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-x1 [47]. В условиях холодового стресса наблюдается увеличение продукции активных форм кислорода, CIRP способствует активации антиоксидантной защиты и снижению отрицательного влияния активных форм кислорода на клетку [208]. В то же время при попадании во внеклеточное пространство CIRP взаимодействует с рецепторами TLR4, что приводит к инициации иммунного ответа и выработке провоспалительных цитокинов [43].

Таким образом снижение внутриклеточной концентрации АТФ может быть объяснено задействованием ряда механизмов, приводящих к активации Т-клеток и увеличению экспрессии провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α . Также энергия затрачивается на миграцию клеток в ткани, опосредуемую сужением капилляров и увеличением экспрессии молекул адгезии [106], что может приводить

к снижению количества лимфоцитов в кровеносном русле, в частности, как показали результаты исследования, происходит уменьшение содержания CD4+, CD16+, CD25+ клеток

В другой группе после холодого воздействия произошло повышение уровня АТФ, при этом абсолютное содержание лимфоцитов и концентрации всех измеренных фенотипов снизились. Внутри популяции наиболее всего уменьшился удельный вес CD4+ клеток (на 11,2%). В цитокиновом профиле выявлено снижение лимфоцит-активирующего фактора IL-1 β , что позволяет предположить срабатывание механизмов сдерживания развития Т-клеточно-опосредованного воспаления. Такой эффект может быть обусловлен активацией АМРК, в результате которой может уменьшаться интенсивность синтеза белков и жирных кислот, что ведет к снижению функциональной активности Т-клеток [30, 81, 217]. Увеличение продукции АТФ может происходить за счет активации β -окисления жирных кислот и окислительного фосфорилирования в митохондриях, в том числе за счет действия SIRT3 [121]. Эти метаболические изменения способствуют снижению экспрессии IL-1 β и дифференцировке лимфоцитов в Treg, которые подавляют иммунные реакции [236].

Таким образом, полученные результаты показывают, что метаболическая активность и энергетическая обеспеченность лимфоцитов оказывают значительное влияние на функциональную активность клеток и развитие клеточно-опосредованных иммунных реакций. Исходя из анализа данных были сделаны следующие выводы.

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 холодовое 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, падение 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 ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балацкая, Н. В. Особенности эффекторных субпопуляций лимфоцитов у пациентов с увеальной меланомой при активации и хроническом течении герпесвирусной инфекции / Н. В. Балацкая [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2021. – Т. 11. – № 6. – С.1123–1130.
2. Будихина, А. С. Роль гликолиза в иммунном ответе / А. С. Будихина, М. В. Пашенков // Иммунология. – 2021. – Т. 42. – № 1. – С. 5–20.
3. Власова, В. В. Особенности метаболизма наивных CD4⁺ т-лимфоцитов и CD4⁺ т-клеток памяти в покое и при пролиферации / В. В. Власова, Е. В. Сайдакова, Л. Б. Королевская // Acta Biomedica Scientifica. – Т. 7. – № 5–1. – С. 167–178.
4. Гармаева Д. К. Влияние холодового стресса на морфофункциональные показатели тимуса в эксперименте / Д. К. Гармаева, Д. С. Белолюбская, А. И. Федорова // Морфологические ведомости. – 2019. – Т. 27. – № 2. – С. 19–23.
5. Голохваст, К. С. Некоторые аспекты механизма влияния низких температур на человека и животных (литературный обзор) / К. С. Голохваст, В. В. Чайка // Вестник новых медицинских технологий. – Т. 18. № 2. – С. 486–489.
6. Горбунов, М. М. Основные физиологические механизмы и адаптационные реакции при закаливании организма в условиях холодного климата / М. М. Горбунов, Н. В. Коршунова, О. В. Юречко // Бюл. физ. и пат. дых. – 2020. – № 77. – С 107–114.
7. Губкина, Л. В. Индивидуальные особенности ответа системы иммунитета человека на кратковременное пребывание в воздушной среде, охлажденной до -25°C / Л. В. Губкина, А. В. Самодова // Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. – 2021. – Т. 13. — № 4. – С. 159–174.
8. Губкина, Л. В. Особенности клеточных и гуморальных иммунных реакций у жителей Европейского Севера, и Арктики / Л. В. Губкина, А. В. Самодова, Л. К. Добродеева. // Якутский медицинский журнал. – 2022. – Т. 4. – № 80. – С. 87–90.

9. Джалилова, Д. Ш. Молекулярно–биологические механизмы взаимосвязи гипоксии, воспалительных и иммунных реакций / Д. Ш. Джалилова, О. В. Макарова // Иммунология. – 2019. – № 5. – С. 97 – 105.

10. Добродеева, Л. К. Межклеточные взаимодействия и уровень агрегации клеток крови в области воспаления у людей, проживающих на Европейском Севере России / Л. К. Добродеева, С. Н. Балашова, А. В. Самодова // Якутский медицинский журнал. – 2023. – Т. 81. – № 1. – С. 87–91.

11. Добродеева, Л. К. Соотношение содержания иммунокомпетентных клеток в регуляции иммунного статуса человека, проживающего на севере / Л. К. Добродеева, О. Е. Филиппова, С. Н. Балашова // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2014. – Т. 2. – № 48. – С. 132–134.

12. Дудина, М. А. Особенности внутриклеточного метаболизма лимфоцитов крови у больных активной акромегалией / М. А. Дудина, И. И. Гвоздев // Вестник Хакасского государственного университета им. Н. Ф. Катанова. – 2015. – Т. 12. – С. 38–41.

13. Загородников, Г. Г. Основные гематологические и метаболические показатели крови у летного состава на разных сроках службы в условиях Арктики / Г. Г. Загородников [и др.] // Биосфера. – 2019. – № 4. – С. 211–226.

14. Зубаткина, О. В. Метаболическое репрограммирование Т–клеток (Обзор) / О. В. Зубаткина // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2019. – Т. 16. – № 3. – С. 365–383, DOI: 10.22138/2500–0918–2019–16–3–365–383.

15. Каленова, Л. Ф. Влияние локального воздействия температурного фактора на иммунофизиологические параметры организма в эксперименте / Л. Ф. Каленова, Ю. Г. Суховой, М. А. Новикова [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2009. – Т. 16. – № 4. С. 21–24.

16. Куприянов, С. В. Сложные регуляторные сети: взаимосвязи метаболизма, внутриклеточных сигнальных путей и эпигенетических регуляторов в контроле функций ТН1 / С. В. Куприянов, А. И. Синицкий, И. И. Долгушин // Иммунология. – 2021. – Т. 42. – № 5. – С. 562–573.

17. Куртасова, Л. М., Изменения метаболизма лимфоцитов крови у детей с рецидивирующими респираторными инфекциями / Л. М. Куртасова, Н. А. Шакина, Т. В. Лубнина // Инфекция и иммунитет. – 2020. – № 3. – С. 515–523.
18. Манина, И. В. Динамика показателей иммунной системы у пациентов с IgE-зависимым заболеванием на фоне специфической иммунотерапии / И. В. Манина, А. М. Рыжих, Л. И. Стась // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11. – № 1. – С. 47–52.
19. Медицинская статистика: учебное пособие для студентов факультета среднего профессионального образования / Е. Е. Лобанова, А. В. Кочубей, Э. С. Антипенко, Н. Г. Дедова, А. Ф. Лебедева, И. О. Кочеткова. – М.: МГМСУ, 2015. – 128 с.
20. Николаева, Т. Н. Изучение иммунного ответа и состояния метаболизма на экспериментальных моделях развития гиперлипидемии и метаболического синдрома / Т. Н. Николаева, В. В. Козлов, Т. Н. Кожевникова // Иммунология. – 2021. – Т. 42. – № 4. – С. 337–345.
21. Пашинская, К. О. Взаимосвязь содержания транспортных белков сыворотки крови иммуноглобулинов класса М, G, А и Е с уровнем иммунной реакции у жителей арктической зоны РФ / К. О. Пашинская, А. В. Самодова, Л. К. Добродеева // Якутский медицинский журнал. – 2022. – Т. 79. – № 3. – С. 69–73.
22. Соловьева, А. С. Противовирусный иммунитет / А. С. Соловьева // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2021. – № 56. – С. 113–118.
23. Фефелова, В. В. Здоровье и метаболизм клеток иммунной системы в период острой адаптации и в конце учебного года у первоклассников, занимавшихся по разным школьным программам / В. В. Фефелова, С. В. Струч, Е. С. Овчаренко [и др.] // Байкальский медицинский журнал. – 2013. – Т. 19. – № 4. – С. 46–48.
24. Черешнев, В. А. Экология, иммунитет, здоровье / В. А. Черешнев // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2016. – № 11 (1). – С. 55.

25. Шаравьева, И. Л. Влияние острого холодцового стресса на секрецию IL–2, IL–4, IFN γ , IL–12 спленоцитами мыши IN VIVO / И. Л. Шаравьева, С. В. Гейн // Медицинская иммунология. – 2022. – Т. 24. – № 4. – С. 843–848.
26. Шейбак, В. М. Биохимическая гетерогенность T–лимфоцитов / В. М. Шейбак, А. Ю. Павлюковец // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2018. – Vol. 17. – № 6. – С. 7–17.
27. Щеголева, Л. С. Особенность иммунологической активности периферической крови у лиц разных возрастных групп приполярного региона / Л. С. Щеголева, Т. Б. Сергеева, Е. Ю. Шашкова [и др.] // Экология человека 2016. – № 8. – С. 15–20.
28. Aguilar–Ballester, M. Impact of Cholesterol Metabolism in Immune Cell Function and Atherosclerosis / M. Aguilar–Ballester, A. Herrero–Cervera, Á. Vinué, // Nutrients – 2020. – Vol. 12. – № 7. – P. 2021. DOI: 10.3390/nu12072021.
29. Allos, H. Regulatory T Cells for More Targeted Immunosuppressive Therapies / H. Allos [et al.] // Clinics in laboratory medicine. – 2019. – Vol. 39. – № 1. – P. 1–13. DOI: 10.1016/j.cll.2018.11.001.
30. Andris, F. AMPK in lymphocyte metabolism and function / F. Andris, L. Oberdan. // International reviews of immunology. – 2015. – Vol. 34. – № 1. – P. 67–81. DOI: 10.3109/08830185.2014.969422.
31. Angkasekwina, P. Th9 Cells in Allergic Disease / P. Angkasekwina // Current allergy and asthma reports. – 2019. – Vol. 19. – № 5. – P. 29. DOI: 10.1007/s11882–019–0860–8.
32. Asao, H. Interleukin–21 in Viral Infections / Asao H. // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22. – № 17. – P. 9521. DOI: 10.3390/ijms22179521.
33. Badawi, Y. Relative Contribution of Prolyl Hydroxylase–Dependent and –Independent Degradation of HIF–1alpha by Proteasomal Pathways in Cerebral Ischemia / Y. Badawi, H. Shi // Frontiers in neuroscience. – 2017. – Vol. 11. – P. 239. DOI: 10.3389/fnins.2017.00239.

34. Barbi, J. Metabolic control of the Treg/Th17 axis / J. Barbi, D. Pardoll, F. Pan // *Immunological reviews*. – 2013. – Vol. – 252. – № 1. – P. 52–77. DOI: 10.1111/imr.12029.
35. Basu, A. Differentiation and Regulation of T_H Cells: A Balancing Act for Cancer Immunotherapy / A. Basu, G. Ramamoorthi, G. Albert [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 669474. DOI: 10.3389/fimmu.2021.669474
36. Bayley, J. S. Cold acclimation increases depolarization resistance and tolerance in muscle fibers from a chill-susceptible insect, *Locusta migratoria* / J. S. Bayley, Sørensen, M. Moos [et al.] // *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. – 2020. – Vol. 319. – № 4. – P. R439–R447. DOI: 10.1152/ajpregu.00068.2020.
37. Berasain, C. Amphiregulin / C. Berasain, M.A. Avila // *Seminars in cell & developmental biology*. – 2014. – Vol. 28. – P. 31–41. DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.01.005.
38. Bertin, S. Transient Receptor Potential (TRP) channels in T cells / S. Bertin, E. Raz // *Seminars in immunopathology*. – 2016. – Vol. 38. – № 3. – P. 309–319. DOI: 10.1007/s00281-015-0535-z.
39. Bird, L. Getting enough energy for immunity / L. Bird // *Nature reviews. Immunology*. – 2019. – Vol. 19. – № 5. – P. 269. DOI: 10.1038/s41577-019-0159-y.
40. Bishop, E. L. Control of T Cell Metabolism by Cytokines and Hormones / E. L. Bishop, N. Gudgeon, S. Dimeloe // *Frontiers in immunology*. – 2021 Vol. 12. – P. 653605. DOI: 10.3389/fimmu.2021.653605.
41. Biswas, S. Effects of HIF-1 α and HIF2 α on Growth and Metabolism of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma 786-0 Xenografts / S. Biswas, H. Troy, R. Leek [et al.] // *J. Oncol.* – 2010. – Vol. 21. – P. 757908. DOI: 10.1155/2010/757908.
42. Blank, C. U. T cell exhaustion / C.U. Blank, W.N. Haining, W. Held, [et al.] // *Nat Rev Immunol.* – 2019. – Vol. 19. – P. 665–674. DOI: 10.1038/s41577-019-0221-9.

43. Bolourani, S. Extracellular CIRP Induces an Inflammatory Phenotype in Pulmonary Fibroblasts via TLR4 / S. Bolourani, E. Sari, M. Brenner // *Frontiers in immunology*. – 2021 – Vol. 12. – P. 721970. DOI: 10.3389/fimmu.2021.721970.
44. Boonpiyathad, T. Il-10 producing T and B cells in allergy / T. Boonpiyathad [et al.] // *Seminars in immunology*. – 2019. – Vol. 44. – P. 101326. DOI: 10.1016/j.smim.2019.101326.
45. Booty, M. G. IL-21 signaling is essential for optimal host resistance against *Mycobacterium tuberculosis* infection / M. G. Booty [et al.] // *Scientific reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 36720. DOI: 10.1038/srep36720.
46. Braverman, J. HIF-1 α Is an Essential Mediator of IFN- γ -Dependent immunity to *mycobacterium tuberculosis* / J. Braverman [et al.] // *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950). – 2016. – Vol. 197(4). – P. 1287–1297. DOI: 10.4049/jimmunol.1600266.
47. Brochu, C. NF- κ B-dependent role for cold-inducible RNA binding protein in regulating interleukin 1 β / C. Brochu, M. A. Cabrita, B. D. Melanson [et al.] // *PloS one*. – 2013. – Vol. 8. – № 2. – e57426. DOI: 10.1371/journal.pone.0057426.
48. Brodin, P. Human immune system variation / P. Brodin, M.M. Davis // *Nature reviews. Immunology*. – 2017. – Vol. 17. – № 1. – P. 21–29. DOI: 10.1038/nri.2016.125.
49. Bystrom, J. Functional and phenotypic heterogeneity of Th17 cells in health and disease / J. Bystrom [et al.] // *European journal of clinical investigation*. – 2019. – Vol. 49. – № 1. – P. e13032. DOI: 10.1111/eci.13032.
50. Chakraborty, S. Regulation of immune cell metabolism in health and disease: Special focus on T and B cell subsets / S. Chakraborty, P. Khamaru, A. Bhattacharyya // *Cell biology international*. – 2022. – Vol. 46. – № 11. – P. 1729–1746. DOI: 10.1002/cbin.11867.
51. Chapman, N. M. Metabolic coordination of T cell quiescence and activation / N. M Chapman, M. R. Boothby, H. Chi // *Nature reviews. Immunology*. – 2020. – Vol. 20. – № 1. P. 55–70. DOI: 10.1038/s41577-019-0203-y.

52. Chavakis, T. Immunometabolism: Where Immunology and Metabolism Meet. / T. Chavakis // *J Innate Immun.* – 2022. – Vol. 14. – P. 1–3. DOI: 10.1159/000521305.
53. Chemin, K. Effector functions of CD4⁺ T cells at the site of local autoimmune inflammation—lessons from rheumatoid arthritis / K. Chemin, C. Gerstner, V. Malmstrom // *Front Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 353. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00353.
54. Chen, T. Th9 Cell Differentiation and Its Dual Effects in Tumor Development / T. Chen [et al.] // *Frontiers in immunology.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1026. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01026.
55. Chi, H. Immunometabolism at the intersection of metabolic signaling, cell fate, and systems immunology / H. Chi // *Cell Mol Immunol.* – 2022. – Vol. 19. – P. 299–302. DOI: 10.1038/s41423-022-00840-x
56. Chimenti, M. S. The interplay between inflammation and metabolism in rheumatoid arthritis / M. S. Chimenti, P. Triggianese, P. Conigliaro [et al.] // *Cell death & disease* 2015. – Vol. 6. – № 9. – P. e1887. DOI: 10.1038/cddis.2015.246.
57. Cicalese, M. P. Editorial: Follicular Helper T Cells in Immunity and Autoimmunity / M. P. Cicalese [et al.] // *Frontiers in immunology.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1042. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01042.
58. Ciscato, F. Hexokinase 2 displacement from mitochondria-associated membranes prompts Ca²⁺-dependent death of cancer cells / F. Ciscato, R. Filadi, I. Masgras [et al.] // *EMBO reports.* – 2020. – Vol. 21 № 7. – P. e49117. DOI: 10.15252/embr.201949117.
59. Czogalla, B. Nuclear Enolase-1/ MBP-1 expression and its association with the Wnt signaling in epithelial ovarian cancer / B. Czogalla, A. Partenheimer, S. Badmann // *Translational oncology.* – 2021. – Vol. 14. – № 1. – P. 100910. DOI: 10.1016/j.tranon.2020.100910.
60. Dai, M. LDHA as a regulator of T cell fate and its mechanisms in disease / M. Dai, L. Wang, J. Yang [et al.] // *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie.* – 2023. – Vol. 158. – P. 114164. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.114164.

61. Dang, E. V. Control of T(H)17/T(reg) Balance by Hypoxia–Inducible Factor 1 / Dang, Barbi J., Yang H. Y. // *Cell*. – 2011. – Vol. 146. – № 5. – P. 772–784. DOI: 10.1016/j.cell.2011.07.033.
62. Deng, C. Roles of IL–25 in Type 2 Inflammation and Autoimmune Pathogenesis / C. Deng // *Frontiers in immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 691559. DOI: 10.3389/fimmu.2021.691559..
63. Desdín–Micó, G. Mitochondrial activity in T cells / G. Desdín–Micó, G. Soto–Heredero. M. Mittelbrunn // *Mitochondrion*. – 2018. – Vol. 41. – P. 51–57. DOI: 10.1016/j.mito.2017.10.006.
64. D'Ignazio, L. NF– κ B and HIF crosstalk in immune responses / L. D'Ignazio, D. Bandarra, S. Rocha // *The FEBS journal*. – 2016. – Vol. 283. – № 3. – P. 413–424. DOI: 10.1111/febs.13578.
65. Diniz, V. L. S. Essential metabolism required for T and B lymphocyte functions: an update / V. L. S. Diniz, A. M. Alvares–Saraiva, T. D. A. Serdan, [et al.] // *Clinical science (London, England : 1979)*. – 2023. – Vol. 137. – № 10. – P. 807–821. DOI: 10.1042/CS20220869.
66. Dougan, M. GM–CSF, IL–3, and IL–5 Family of Cytokines: Regulators of Inflammation / M. Dougan, G. Dranoff, S. K. Dougan // *Immunity*. – 2019. – Vol. 50. – № 4. – P. 796–811. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.022.
67. Durward–Diiioia, M. CD8+ T cell exhaustion, suppressed gamma interferon production, and delayed memory response induced by chronic *Brucella melitensis* infection / M. Durward–Diiioia, J.Harms, M. Khan, // *Infection and immunity*. – 2015. – Vol. 83. – № 12. – P. 4759–4771. DOI: 10.1128/IAI.01184–15.
68. Eggert, J. Functional heterogeneity and adaptation of naive T cells in response to tonic TCR signals. / J. Eggert, B. B. Au–Yeung // *Current opinion in immunology*. – 2021. – Vol. 73. – 43–49. DOI: 10.1016/j.coi.2021.09.007.
69. Fan, M. Y. Differential Roles of IL–2 Signaling in Developing versus Mature Tregs / M. Y. Fan [et al.] // *Cell reports* 2018. – Vol. 25. – № 5. – P. 1204–1213. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.10.002.

70. Fortuny, L. Sirtuins as Metabolic Regulators of Immune Cells Phenotype and Function / L. Fortuny, C. Sebastián // *Genes*. – 2021. – Vol. 12. – № 11. – P. 1698. DOI: 10.3390/genes12111698.
71. Franco, F. Metabolic and epigenetic regulation of T-cell exhaustion / F. Franco // *Nature metabolism*. – 2020. – Vol. 2. – № 10. – P. 1001–1012. DOI: 10.1038/s42255-020-00280-9.
72. Frevert, C. W. Danger-Associated Molecular Patterns Derived From the Extracellular Matrix Provide Temporal Control of Innate Immunity / C. W. Frevert, J. Felgenhauer, M. Wygrecka [et al.] // *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. – 2018. – Vol. 66. – № 4. – P. 213–227. DOI: 10.1369/0022155417740880.
73. Fu, S. H. New insights into Blimp-1 in T lymphocytes: a divergent regulator of cell destiny and effector function / S. H. Fu, L. T. Yeh, C. C. Chu [et al.] // *Journal of biomedical science* 2017. – Vol. 24. – № 1. – P. 49. DOI: 10.1186/s12929-017-0354-8.
74. Galluzzi, L. Metabolic control of autophagy / L. Galluzzi [et al.] // *Cell*. – 2014. – Vol. 159. – № 6. – P. 1263–1276. DOI: 10.1016/j.cell.2014.11.006.
75. Garcin, E. D. GAPDH as a model non-canonical AU-rich RNA binding protein / E. D. Garcin // *Seminars in cell & developmental biology*. – 2019. – Vol. 86. – P. 162–173. DOI: 10.1016/j.semcdb.2018.03.013.
76. Ghirotto, B. Sirtuins in B lymphocytes metabolism and function / B. Ghirotto, F. F. Terra, N. O. S. Câmara [et al.] // *World journal of experimental medicine*. – 2019. – Vol. 9 № 1. – P. 1–13. DOI: 10.5493/wjem.v9.i1.1.
77. Goswami, R. Cell Differentiation and Function in Tissue Inflammation / R. Goswami, A. Awasthi // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 289. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00289.
78. Green, D. R. Cell biology. Metabolic control of cell death / D. R. Green, L. Galluzzi, G. Kroemer // *Science*. – 2014. – Vol. 345. – P. 1250256. DOI: 10.1126/science.1250256.

79. Gupta, S. S. Metabolic Reprogramming in CD8⁺ T Cells During Acute Viral Infections / S. S. Gupta, J. Wang, M. Chen // *Frontiers in immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1013. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01013.
80. Hallal, R. Acriflavine targets oncogenic STAT5 signaling in myeloid leukemia cells / R. Hallal [et al.] // *Journal of cellular and molecular medicine*. – 2020. – Vol. 24. – № 17. – P. 10052–10062. DOI: 10.1111/jcmm.15612.
81. Hardie, D. G. AMPK: An Energy–Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs / D. G. Hardie, B. E. Schaffer, A. Brunet // *Trends in cell biology*. – 2016. – Vol. 26. – № 3. – P. 190–201. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.10.013.
82. Hartmann, F. J. Single–cell metabolic profiling of human cytotoxic T cells / F. J. Hartmann, D. Mrdjen, E. McCaffrey [et al.] // *Nat Biotechnol*. – 2021 Vol. 39. – P. 186–197 (2021). DOI: 10.1038/s41587–020–0651–8.
83. Hassani, M. Immunological and hematological effects of IL–5(R α)–targeted therapy: An overview / M.Hassani, L. Koenderman // *Allergy*. – 2018. – Vol. 73. – № 10. – P. 1979–1988. DOI: 10.1111/all.13451.
84. He, Y. IL–9 and Th9 Cells in Tumor Immunity / Y. He [et al.] // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2020. – Vol. 1240. – P. 35–46. DOI: 10.1007/978–3–030–38315–2_3.
85. Ho, I. C. Regulation of IL–4 Expression in Immunity and Diseases / I.C. Ho, S.C. Miaw // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2016. – Vol. 941. – P. 31–77. DOI: 10.1007/978–94–024–0921–5_3.
86. Hogan P. G. Calcium–NFAT transcriptional signalling in T cell activation and T cell exhaustion / P. G. Hogan // *Cell calcium*. – 2017. – Vol. 63. – P. 66–69. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.01.014.
87. Holthaus, L. Functional and metabolic fitness of human CD4⁺ T lymphocytes during metabolic stress / L. Holthaus. V. Sharma, D. Brandt [et al.] // *Life science alliance*. – 2021. – Vol. 4. – № 12. – P. e202101013. DOI: 10.26508/lsa.202101013.

88. Howie, D. The Role of Lipid Metabolism in T Lymphocyte Differentiation and Survival / D. Howie, A. Ten Bokum, A. S. Necula [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2018. – Vol. 8. – P. 1949. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01949.
89. Huang, H. HIF-1 α contributes to Ang II-induced inflammatory cytokine production in podocytes / H. Huang [et al.] // *BMC pharmacology & toxicology* 2019. – Vol. 20. – 1. – P 59. DOI: 10.1186/s40360-019-0340-8.
90. Huang, M. Critical Roles of Balanced T Helper 9 Cells and Regulatory T Cells in Allergic Airway Inflammation and Tumor Immunity / M. Huang, J. Dong // *Journal of immunology research*. – 2021. – Vol. 243. – P. 8816055. DOI: 10.1155/2021/8816055.
91. Huang, Y. Rewiring mitochondrial metabolism to counteract exhaustion of CAR-T cells / Y. Huang, X. Si, M. Shao, [et al.] // *J Hematol Oncol*. – 2022. – Vol. 15. – P. 38. DOI: 10.1186/s13045-022-01255-x.
92. Huppertz, I. Riboregulation of Enolase 1 activity controls glycolysis and embryonic stem cell differentiation / I. Huppertz, J. I. Perez-Perri, P. Mantas [et al.] // *Molecular cell*. – 2022. – Vol. 82. – № 14. – P. 2666–2680.e11. DOI: 10.1016/j.molcel.2022.05.019.
93. Hutmacher, C. Targeted Delivery of IL2 to the Tumor Stroma Potentiates the Action of Immune Checkpoint Inhibitors by Preferential Activation of NK and CD8+ T Cells / C. Hutmacher [et al.] // *Cancer immunology research*. – 2019. – Vol. 7. – № 4. – P. 572–583. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0566.
94. Ikeda, S. Hypoxia-inducible hexokinase-2 enhances anti-apoptotic function via activating autophagy in multiple myeloma / S. Ikeda, F. Abe, Y. Matsuda [et al.] // *Cancer science*. – 2020. – Vol. 111. – № 11. – P. 4088–4101. DOI: 10.1111/cas.14614.
95. Itahana, Y. Emerging Roles of p53 Family Members in Glucose Metabolism / Y. Itahana, K. Itahana, // *International journal of molecular sciences*. – 2018. – Vol. 19. – № 3. – P. 776. DOI: 10.3390/ijms19030776.
96. Jayaraman, P. TIM3 Mediates T Cell Exhaustion during Mycobacterium tuberculosis / P. Jayaraman, M. K. Jacques, C. Zhu [et al.] // *Infection. PLoS pathogens*. – 2016. – Vol. 12. – № 3. – P. e1005490. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005490.

97. Jones, N. Metabolic Adaptation of Human CD4⁺ and CD8⁺ T-Cells to T-Cell Receptor-Mediated Stimulation / N. Jones, J. G. Cronin, G. Dolton [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1516. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01516.
98. Jubel, J. M. The Role of PD-1 in Acute and Chronic Infection / J. M. Jubel, Z. R. Barbati, C. Burger [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 487. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00487.
99. Kanamori, M. Reprogramming of Th1 cells into regulatory T cells through rewiring of the metabolic status / M. Kanamori, H. Nakatsukasa, M. Ito [et al.] // *International immunology*. – 2018. – Vol. 30. – № 8. – P. 357–373. DOI: 10.1093/intimm/dxy043.
100. Khalsa, J. K. Functionally significant metabolic differences between B and T lymphocyte lineages / J. K. Khalsa, A. S. Chawla, S. B Prabhu [et al.] // *Immunology*. – 2019. – Vol. 158. – № 2. – P. 104–120. DOI: 10.1111/imm.13098.
101. Kierans S. J. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology / S. J. Kierans, C. T. Taylor // *The Journal of physiology*. – 2021. – Vol. 599. – № 1. – 23–37. DOI: 10.1113/JP280572.
102. Klein, R., Clinical and Diagnostic Significance of Lactate Dehydrogenase and Its Isoenzymes in Animals / R. Klein, O. Nagy, C. Tóthová [et al.] // *Veterinary medicine international*. – 2020. – Vol. 7. – P. 5346483. DOI: 10.1155/2020/5346483.
103. Koch, S. Th9 and other IL-9-Producing cells in allergic asthma / S. Koch, N. Sopel, S. Finotto // *Seminars in immunopathology*. – 2017. – Vol. 39. – № 1. – P. 55–68. DOI: 10.1007/s00281-016-0601-1.
104. Koizume, S. Diverse Mechanisms of Sp1-Dependent Transcriptional Regulation Potentially Involved in the Adaptive Response of Cancer Cells to Oxygen-Deficient Conditions / S. Koizume, Y. Miyagi // *Cancers*. – 2015. – Vol. 8. – № 1. – P. 2. DOI: 10.3390/cancers8010002.
105. Kondělková, K. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders / K. Kondělková [et al.] // *Acta medica (Hradec Kralove)* 2010. – Vol. 53. – № 2. – P.73–77. DOI: 10.14712/18059694.2016.63.

106. Kong, D. H. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer / D. H. Kong [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2018. – Vol. 19. – № 4. – P 1057. DOI: 10.3390/ijms19041057.
107. Kono, M. Pyruvate kinase M2 is requisite for Th1 and Th17 differentiation / M. Kono [et al.] // JCI insight. – 2019. – Vol. 4. – № 12. – P. e127395. DOI: 10.1172/jci.insight.127395.
108. Kubo, M. The role of IL-4 derived from follicular helper T (TFH) cells and type 2 helper T (TH2) cells / Kubo M. // International immunology. – 2021. – Vol. 33. – № 12. – P. 717–722. DOI: 10.1093/intimm/dxab080.
109. Kutumova, E. Model composition through model reduction: a combined model of CD95 and NF- κ B signaling pathways / E. Kutumova, A. Zinovyev, R. Sharipov [et al.] // BMC Syst Biol. – 2013. – Vol. 7. – P. 13 (2013). DOI: 10.1186/1752-0509-7-13.
110. Kwon, B. The two faces of IL-2: a key driver of CD8⁺ T-cell exhaustion / B. Kwon // Cellular & molecular immunology. – 2021. – Vol. 18. – № 7. – P. 1641–1643. DOI: 10.1038/s41423-021-00712-w.
111. Lambrecht, B. N. The Cytokines of Asthma / B.N. Lambrecht, H. Hammad, J.V. Fahy // Immunity. – 2019. – Vol. 50. – № 4. – P. 975–991. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.018.
112. Lauterwasser, J. Hexokinases inhibit death receptor-dependent apoptosis on the mitochondria / J. Lauterwasser, F. Fimm-Todt, A. Oelgeklaus // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2021. – Vol. 118. – № 33. – P. e2021175118. DOI: 10.1073/pnas.2021175118.
113. Lazarev, V. F. Glyceraldehyde-3- Phosphate Dehydrogenase is a Multifaceted Therapeutic Target / V. F. Lazarev, I. V. Guzhova, B. A. Margulis, // Pharmaceutics. – 2020. – Vol. 12. – № 5. – P. 416. DOI: 10.3390/pharmaceutics12050416.

114. Le Bourgeois, T. Targeting T cell metabolism for improvement of cancer immunotherapy / T. Le Bourgeois [et al.] // *Front Oncol.* – 2018. – Vol. 8. – P. 139–147. DOI: 10.3389/fonc.2018.00237.
115. Le Gallo, M. CD95/Fas, Non–Apoptotic Signaling Pathways, and Kinases / M. Le Gallo, A. Poissonnier, P. Blanco [et al.] // *Frontiers in immunology.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1216. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01216.
116. Lee, J. U. Association of interleukin–25 levels with development of aspirin induced respiratory diseases / J. U. Lee [et al.] // *Respiratory medicine.* – 2017. – Vol. 123. – P. 71–78. DOI: 10.1016/j.rmed.2016.11.020.
117. Lees, J. R. CD8+ T cells: The past and future of immune regulation / J. R. Lees // *Cellular immunology.* – 2020. – Vol. 357. – P. 104212. DOI: 10.1016/j.cellimm.2020.104212.
118. León, B. Modulating Th2 Cell Immunity for the Treatment of Asthma / B. León, A. Ballesteros–Tato // *Frontiers in immunology.* – 2021. – Vol. 12. – P. 637948. DOI: 10.3389/fimmu.2021.637948.
119. Li, F. Metabolic plasticity and regulation of T cell exhaustion / F. Li, H. Liu, D. Zhang [et al.] // *Immunology.* – 2022. – Vol. 167. – № 4. – P. 482–494. DOI: 10.1111/imm.13575.
120. Li, H. S. HIF–1 α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria / H. S. Li // *Redox biology.* – 2019. – Vol. 25. – P. 101109. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101109.
121. Li, M. Sirt3 modulates fatty acid oxidation and attenuates cisplatin–induced AKI in mice / M. Li, C. M. Li, Z. C. Ye, // *Journal of cellular and molecular medicine.* – 2020. – Vol. 24 № 9. – P. 5109–5121. DOI: 10.1111/jcmm.15148.
122. Li, W., Rewiring Mitochondrial Metabolism for CD8⁺ T Cell Memory Formation and Effective Cancer Immunotherapy / W. Li, L. Zhang // *Frontiers in immunology.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1834. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01834.
123. Liao, Y. The role of cold–inducible RNA binding protein in cell stress response / Y. Liao, L. Tong, L. Tang [et al.] // *International journal of cancer.* – 2017. – Vol. 141 № 11. – P. 2164–2173. DOI: 10.1002/ijc.30833.

124. Liu, S. (2023). The relationship between CD4⁺ T cell glycolysis and their functions / S. Liu [et al.] // Trends in endocrinology and metabolism: TEM. – 2023. – Vol. 34. – № 6, 345–360. DOI: 10.1016/j.tem.2023.03.006.
125. Liu, Y. Biological Properties and the Role of IL–25 in Disease Pathogenesis / Y. Liu // Journal of immunology research. – 2018. – Vol. 1155. – P. 6519465. DOI: 10.1155/2018/6519465.
126. Liu, Z. The Biological Significance and Regulatory Mechanism of c–Myc Binding Protein 1 (MBP–1) / Z. Liu, A. Zhang, L. Zheng [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2018. – Vol. 19. – № 12. – P. 3868. DOI: 10.3390/ijms19123868.
127. Gouw, A. M. The MYC Oncogene Cooperates with Sterol-Regulated Element-Binding Protein to Regulate Lipogenesis Essential for Neoplastic Growth / A. M. Gouw, K. Margulis, N. S. Liu // Cell metabolism. – 2019. – Vol. 30. – № 3. – P. 556–572. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.07.012.
128. Liu, Z., Role of PKM2–Mediated Immunometabolic Reprogramming on Development of Cytokine Storm / Z. Liu, Y. Le, H. Chen [et al.] // Frontiers in immunology. – 2021. – Vol. 12. – P. 748573. DOI: 10.3389/fimmu.2021.748573.
129. Lobo–Silva, D. Balancing the immune response in the brain: IL–10 and its regulation / D. Lobo–Silva [et al.] // Journal of neuroinflammation. – 2016. – Vol. 13. – № 1. – P. 297. DOI: 10.1186/s12974–016–0763–8.
130. Loftus, R. M. Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator / R. M. Loftus, D. K. Finlay // The Journal of biological chemistry. – 2016. – Vol. 291. – № 1. – P. 1–10. DOI: 10.1074/jbc.R115.693903.
131. Long, D. Clinical significance and immunobiology of IL–21 in autoimmunity / D. Long [et al.] // Journal of autoimmunity. – 2019. – Vol. 99. – P. 1–14. DOI: 10.1016/j.jaut.2019.01.013.
132. Loo, T.T. Transcriptional regulation of CD4⁺ T_H cells that mediate tissue inflammation / T.T. Loo, Y. Gao, V. Lazarevic, // Journal of leukocyte biology. – 2018. – Vol. 104. – № 6. – P. 1069–1085. DOI: 10.1002/JLB.1RI0418–152RR.
133. Ma, R. PKM2–regulated STAT3 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via TGF– β 1–induced EMT / R. Ma. Q. Liu. S. Zheng [et al.] //

Journal of cellular biochemistry. – 2019. – Vol. 120. – № 7. – P. 11539–11550. DOI: 10.1002/jcb.28434.

134. MacPherson, S. Understanding lymphocyte metabolism for use in cancer immunotherapy / S. MacPherson, M. Kilgour, J. J. Lum // The FEBS journal. – 2018. – Vol. 285. – № 14. – 2567–2578. DOI: 10.1111/febs.14454.

135. Madden, M. Z. The Complex Integration of T-cell Metabolism and Immunotherapy / M. Z. Madden, J. C. Rathmell // Cancer discovery. – 2021. – Vol. 11. – № 7. – P. 1636–1643. DOI: 10.1158/2159–8290.CD–20–0569.

136. Makowski, L. Immunometabolism: From basic mechanisms to translation / L. Makowski, M. Chaib, J. C. Rathmell // Immunological reviews. – 2020. – Vol. 295. – № 1. – P. 5–14. DOI: 10.1111/imr.12858.

137. Malemud, C. J. Defective T-Cell Apoptosis and T-Regulatory Cell Dysfunction in Rheumatoid Arthritis / C. J. Malemud // Cells. – 2018. – Vol. 7. – № 12. – P. 223. DOI: 10.3390/cells7120223.

138. Mamun, A. A. Hypoxia induces the translocation of glucose transporter 1 to the plasma membrane in vascular endothelial cells / A. A. Mamun [et al.] // The journal of physiological sciences: JPS. – 2020. – Vol. 70. – № 1. – P. 44. DOI: 10.1186/s12576–020–00773–y.

139. Mantani, P. T. Interleukin–25 reduces Th17 cells and inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells / P.T. Mantani [et al.] // Human immunology. – 2018. – Vol. 79. – № 9. – P. 685–692. DOI: 10.1016/j.humimm.2018.06.008.

140. Marchingo, J. M. Quantitative analysis of how Myc controls T cell proteomes and metabolic pathways during T cell activation / J. M. Marchingo, L. V. Sinclair, A. J. Howden [et al.] // eLife. – 2020. – Vol. 9. – P. e53725. DOI: 10.7554/eLife.53725.

141. Marcus, J. M. SIRT3 Regulation Under Cellular Stress: Making Sense of the Ups and Downs / J. M. Marcus, S. A. Andrabi // Frontiers in neuroscience. – 2018. – Vol. 12. – P. 799. DOI: 10.3389/fnins.2018.00799.

142. Masoud, G. N. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy / G. N. Masoud, W. Li // *Acta pharmaceutica Sinica*. – 2015. – Vol. 5. – № 5. – P. 378–389. DOI: 10.1016/j.apsb.2015.05.007.
143. Matsuda, S. Nuclear pyruvate kinase M2 complex serves as a transcriptional coactivator of arylhydrocarbon receptor / S. Matsuda, J. Adachi, M. Ihara [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2016. – Vol. 44. – № 2. – P. 636–647. DOI: 10.1093/nar/gkv967.
144. McGettrick, A. F. The Role of HIF in Immunity and Inflammation / A. F. McGettrick, L. A. J. O'Neill // *Cell metabolism*. – 2020. – Vol. 32. – № 4. – P. 524–536. DOI: 10.1016/j.cmet.2020.08.002.
145. McGovern, J. Forced FoxP3 expression can improve the safety and antigen-specific function of engineered regulatory T cells / J. McGovern, A. Holler, S. Thomas [et al.] // *Journal of autoimmunity*. – 2022. – Vol. 132. – P. 102888. DOI: 10.1016/j.jaut.2022.102888.
146. Mehta, M. M. Hexokinase 2 is dispensable for T cell-dependent immunity / M. M. Mehta, S. E. Weinberg, E. M. Steinert, [et al.] // *Cancer Metab*. – 2018. – Vol. 6. – P. 10. DOI: 10.1186/s40170-018-0184-5.
147. Meng, X. Mechanisms leading to T-cell activation in drug hypersensitivity / X. Meng [et al.] // *Current opinion in allergy and clinical immunology*. – 2018. – Vol. 18. – № 4. – P. 317–324. DOI: 10.1097/ACI.0000000000000458.
148. Menk, A. V. Early TCR Signaling Induces Rapid Aerobic Glycolysis Enabling Distinct Acute T Cell Effector Functions / A. V. Menk, N. E. Scharping., R. S. Moreci [et al.] // *Cell reports*. – 2018. – Vol. 22. – № 6. – P. 1509–1521. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.01.040.
149. Michalek, R. D. The metabolic life and times of a T-cell / R. D. Michalek, J.C. Rathmell // *Immunological reviews*. – 2010. – Vol. 236. – P. 190–202. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00911.x.
150. Mihm, S. Regulation of cytotoxic T-lymphocyte activation by L-lactate and pyruvate / S. Mihm W. Dröge // *Cellular immunology*. – 2015. – Vol. 96. – № 1. – P. 235–240. DOI: 10.1016/0008-8749(85)90355-7.

151. Møller, S. H. Metabolic programs tailor T cell immunity in viral infection, cancer, and aging / S. H. Møller [et al.] // *Cell metabolism*. – 2022. – Vol. 34. – № 3. – 378–395. DOI: 10.1016/j.cmet.2022.02.003.
152. Molon, B. T Cells and Cancer: How Metabolism Shapes Immunity / B. Molon, B. Cali, A. Viola // *Frontiers in immunology*. – 2016. – Vol. 7. – № 20. – P. 1478–1486 DOI: 10.3389/fimmu.2016.00020.
153. Moreno–Fernandez, M. PKM2–dependent metabolic skewing of hepatic Th17 cells regulates pathogenesis of non–alcoholic fatty liver disease / M. E. Moreno–Fernandez, D. A. Giles, J. R. Oates [et al.] // *Cell metabolism*. – 2021. – Vol. 33. – № 6. – P. 1187–1204.e9. DOI: 10.1016/j.cmet.2021.04.018.
154. Moulder, D. E. The Roles of p53 in Mitochondrial Dynamics and Cancer Metabolism: The Pendulum between Survival and Death in Breast Cancer? / D. E. Moulder D. Hatoum, Tay E. [et al.] // *Cancers*, 10(6), 189. DOI: 10.3390/cancers10060189.
155. Murter, B. Control of T lymphocyte fate decisions by PI3K signaling / B. Murter, L. P. Kane // *F1000Research*. – 2020. – Vol. 9. – P. 1171. DOI: 10.12688/f1000research.26928.1.
156. Nakayama, T. Th2 Cells in Health and Disease / T. Nakayama [et al.] // *Annual review of immunology* 2017. – Vol. 35. – P. 53–84. DOI: 10.1146/annurev-immunol-051116-052350.
157. Navas, L.E., NAD⁺ metabolism, stemness, the immune response, and cancer / L. E. Navas, A. Carnero, // *Sig Transduct Target Ther*. – 2021. – Vol. 6. – P. 2. DOI: 10.1038/s41392-020-00354-w.
158. Neeli, P. K. A novel metadherin Δ 7 splice variant enhances triple negative breast cancer aggressiveness by modulating mitochondrial function via NF κ B–SIRT3 axis / P. K. Neeli, P. N. Gollavilli, S. Mallappa [et al.] // *Oncogene*. – 2020. – Vol. 39. – P. 2088–102.
159. Nicoli, F. Naïve CD8⁺ T–Cells Engage a Versatile Metabolic Program Upon Activation in Humans and Differ Energetically From Memory CD8⁺ T–Cells / F. Nicoli,

L. Papagno, J. J. Frere [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 2736. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02736.

160. Noor, S.S. Nutrients Interaction with the Immune System / S. Noor, S. Piscopo, A. Gasmi // *Archives of Razi Institute*. – 2021. – Vol. 76. – № 6. – P. 1579–1588. DOI: 10.22092/ari.2021.356098.1775.

161. Ognibene, M. Immunohistochemical analysis of PDK1, PHD3 and HIF-1 α expression defines the hypoxic status of neuroblastoma tumors / M. Ognibene, D. Cangelosi, M. Morini [et al.] // *PloS one*. – 2017. – Vol. 12. – № 11. – P. e0187206. DOI: 10.1371/journal.pone.0187206.

162. O'Sullivan, D. The metabolic spectrum of memory T cells / D. O'Sullivan // *Immunology and cell biology*. – 2019. – Vol. 97. – № 7. – P. 636–646. DOI: 10.1111/imcb.12274.

163. Otton, R. Diabetes causes marked changes in lymphocyte metabolism / R. Otton, J. R. Mendonça, R. Curi // *The Journal of endocrinology*. – 2002. – Vol. 174. – № 1. – P. 55–61. DOI: 10.1677/joe.0.1740055.

164. Ouyang, W. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation / W. Ouyang, A. O'Garra // *Immunity*. – 2019. – Vol. 50. – P. 871–891. 10.1016/j.immuni.2019.03.020.

165. Ouyang, X. Digoxin Suppresses Pyruvate Kinase M2– Promoted HIF-1 α Transactivation in Steatohepatitis / X. Ouyang, S. N. Han, J. Y. Zhang [et al.] // *Cell metabolism*. – 2018. – Vol. 27. – № 2. – P. 339–350.e3. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.01.007.

166. Ozden, O. SIRT3 deacetylates and increases pyruvate dehydrogenase activity in cancer cells / O. Ozden [et al.] // *Free radical biology & medicine*. – 2014. – Vol. 76. – P. 163–172. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.001.

167. Pajulas, A. The role of IL-9 secreting CD4+ T helper cells in promoting mast cell expansion in pulmonary models of inflammation / A. Pajulas, M.H. Kaplan // *The Journal of Immunology*. – 2020. – Vol. 204. – № 65. – P. 22.

168. Palsson-McDermott, E. M. Pyruvate Kinase M2 Is Required for the Expression of the Immune Checkpoint PD-L1 in Immune Cells and Tumors / E. M.

Palsson–McDermott, L. Dyck, Z. Zaslona [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1300. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01300.

169. Parish, I. A. Chronic viral infection promotes sustained Th1–derived immunoregulatory IL–10 via BLIMP–1 / I. A. Parish., H. D. Marshall, M. M. Staron, [et al.] // *The Journal of clinical investigation*. – 2014. – Vol. 124. – № 8. – P. 3455–3468. DOI: 10.1172/JCI66108.

170. Pawlus, M. R. STAT3 and HIF1 α Cooperatively Activate HIF1 Target Genes in MDA–MB–231 and RCC4 Cells / M. R. Pawlus, L. Wang, C. J. Hu // *Oncogene*. – 2014. – Vol. 33. – № 13. – P. 1670–1679. DOI: 10.1038/onc.2013.115.

171. Pearce, E. L. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence / E. L. Pearce, E. J. Pearce // *Immunity*. – 2013. – Vol. 38. – № 4. – P. 633–643. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.04.005.

172. Phadke, M. Disruption of NAD(+) binding site in glyceraldehyde 3–Phosphate dehydrogenase affects its intranuclear interactions / M. Phadke, N. Krynetskaia, A. Mishra // *World journal of biological chemistry*. – 2015. – Vol. 6. – № 4. – P. 366–378. DOI: 10.4331/wjbc.v6.i4.366.

173. Pompura, S. L. The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T–cell development, stability, and function / S. L. Pompura, M. Dominguez–Villar // *Journal of leukocyte biology*. – 2018. – Vol. 10. – P.349. DOI: 10.1002/JLB.2MIR0817–349R.

174. Potteti H. R. Nrf2 mediates hypoxia–inducible HIF–1 α activation in kidney tubular epithelial cells. *American journal of physiology* / H. R. Potteti [et al.] // *Renal physiology*. – 2021. – Vol. 320. – № 3. – P. 464–474. DOI: 10.1152/ajprenal.00501.2020.

175. Qiao, G. Enolase 1, a Moonlighting Protein, as a Potential Target for Cancer Treatment / G. Qiao. A. Wu. X. Chen [et al.] // *International journal of biological sciences*. – 2021. – Vol. 17. – № 14. – P. 3981–3992. DOI: 10.7150/ijbs.63556.

176. Qin, L. Insights Into the Molecular Mechanisms of T Follicular Helper–Mediated Immunity and Pathology / L. Qin [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1884. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01884.

177. Rabbani, N. Hexokinase–2–Linked Glycolytic Overload and Unscheduled Glycolysis–Driver of Insulin Resistance and Development of Vascular Complications of

Diabetes / N. Rabbani, M. Xue, P. J. Thornalley // International journal of molecular sciences. – 2022. – Vol. 23. – № 4. – P. 2165. DOI: 10.3390/ijms23042165.

178. Rangel Rivera, G. O. Fundamentals of T Cell Metabolism and Strategies to Enhance Cancer Immunotherapy / G. O. Rangel Rivera, H. M. Knochermann, C. J. Dwyer [et al.] // Frontiers in immunology. – 2021 Vol. 12. – P. 645242. DOI: 10.3389/fimmu.2021.645242.

179. Raynor, J. L. Metabolic Control of Memory T–Cell Generation and Stemness / J. L. Raynor, N. M. Chapman, H. Chi, // Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2021. – Vol. 13. – № 6. – P. a037770. DOI: 10.1101/cshperspect.a037770.

180. Rius–Pérez, S. PGC–1 α , Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism / S. Rius–Pérez, I. Torres–Cuevas, I. Millán // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2020. – Vol. 32. – P. 1452696. DOI: 10.1155/2020/1452696.

181. Roberts, D. Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Akting on mitochondria and TORCing to autophagy / D. Roberts, S. Miyamoto // Cell Death Differ. – 2015. – Vol. 22. – P. 248–257. DOI: 10.1038/cdd.2014.173.

182. Roy, S. Metabolic Checkpoints in Differentiation of Helper T Cells in Tissue Inflammation / S. Roy, Z. A. Rizvi, A. Awasthi // Frontiers in immunology. – 2019. – Vol. 9. – P. 3036. DOI: 10.3389/fimmu.2018.03036.

183. Sánchez–García, F. J. The Role of Tricarboxylic Acid Cycle Metabolites in Viral Infections / F. J. Sánchez–García // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2021. – Vol. 11. – P. 725043. DOI: 10.3389/fcimb.2021.725043.

184. Saraiva, M. Biology and therapeutic potential of interleukin–10 / M. Saraiva, P. Vieira, A. O'Garra // The Journal of experimental medicine. – 2020. – Vol. 217. – № 1. – P. e20190418. DOI: 10.1084/jem.20190418.

185. Saravia, J. Signaling networks in immunometabolism / J. Saravia, J. L. Raynor, N. M. Chapman [et al.] // Cell research. – 2020. – Vol. 30 № 4. – P. 328–342. DOI: 10.1038/s41422–020–0301–1.

186. Schneider–Crease, I. A. Helminth infection is associated with dampened cytokine responses to viral and bacterial stimulations in Tsimane forager–horticulturalists

/ I. A. Schneider–Crease // *EVolution, medicine, and public health*. – 2021. – Vol. 9. – № 1. – P. 349–359. DOI: 10.1093/emph/eoab035.

187. Schoeniger, A. How Do Hexokinases Inhibit Receptor–Mediated Apoptosis? / A. Schoeniger, P. Wolf, F. Edlich, // *Biology*. – 2022. – Vol. 11. – № 3. – P. 412. DOI: 10.3390/biology11030412.

188. Schormann, N. An overview of structure, function, and regulation of pyruvate kinases / N. Schormann, K. L. Hayden, P. Lee [et al.] // *Protein science : a publication of the Protein Society*. – 2019. – Vol. 28. – № 10. – P. 1771–1784. DOI: 10.1002/pro.3691.

189. Schwartzberg–Bar–Yoseph, F. The tumor suppressor p53 down–regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression / F. Schwartzberg–Bar–Yoseph, M. Armoni, E. Karnieli, // *Cancer research*. – 2004. – Vol. 64. – № 7. – 2627–2633. DOI: 10.1158/0008–5472.can–03–0846.

190. Sedoris, K. C. Hypoxia induces differential translation of enolase/MBP–1 / K. C. Sedoris, S. D. Thomas, D. M. Miller, // *BMC cancer*. – 2010. – Vol. 10. – P. 157. DOI: 10.1186/1471–2407–10–157.

191. Seki, S. M. Exploring Non–Metabolic Functions of Glycolytic Enzymes in Immunity / S.M. Seki, A. Gaultier // *Frontiers in immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1549. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01549.

192. Semba, H. HIF–1 α –PDK1 axis–induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity / H. Semba [et al.] // *Nature communications*. – 2016. – Vol. 7. – P. 11635. DOI: 10.1038/ncomms11635.

193. Shah, K. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. / K. Shah [et al.] // *Signal transduction and targeted therapy*. – 2021. – Vol. 6. – Vol. № 1. – P. 412. DOI: 10.1038/s41392–021–00823–w.

194. Shang, J. NAD⁺–consuming enzymes in immune defense against viral infection / J Shang, M. R. Smith, A. Anmangandla // *The Biochemical journal*. – 2021. – Vol. 478. – № 2. – P. 4071–4092. DOI: 10.1042/BCJ20210181.

195. Shen, C. R. The fate of regulatory T cells: survival or apoptosis / C. R. Shen, W. C. Yang, H. W. Chen, // *Cell Mol Immunol.* – 2014. – Vol. **11**. – P. 11–13. DOI: 10.1038/cmi.2013.49.
196. Shi, H. Metabolic Control of Treg Cell Stability, Plasticity, and Tissue-Specific Heterogeneity / H. Shi, H. Chi // *Frontiers in immunology.* – 2019. – Vol. 10. – P. 2716. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02716.
197. Shinde, S. B. Review of the systems biology of the immune system using agent-based models / S. B. Shinde, M. P. Kurhekar // *IET systems biology.* – 2018. – Vol. 12. – № 3. – P. 83–92. DOI: 10.1049/iet-syb.2017.0073.
198. Silva, S. L. IL-7-Induced Proliferation of Human Naive CD4 T-Cells Relies on Continued Thymic Activity / S. L. Silva, A. S. Albuquerque, P. Matoso, // *Frontiers in immunology.* – 2017. – Vol. 8. – P. 20. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00020.
199. Slack, M. T cell metabolic reprogramming and plasticity / M. Slack, T. Wang, R. Wang // *Molecular immunology.* – 2015. – Vol. 68. – 2. – P. 507–512. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.07.036.
200. Smith-Garvin, J. E. T cell activation / J. E. Smith-Garvin, G. A. Koretzky, M. S. Jordan, // *Annual review of immunology.* – 2009. – Vol. 27. – P. 591–619. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706.
201. Snaebjornsson, M. T., Non-canonical functions of enzymes facilitate cross-talk between cell metabolic and regulatory pathways / M. T. Snaebjornsson, A. Schulze // *Exp Mol Med.* – 2018. – Vol. **50**. – P. 1–16. DOI: 10.1038/s12276-018-0065-6.
202. Song, J. Adenosine triphosphate energy-independently controls protein homeostasis with unique structure and diverse mechanisms / J. Song // *Protein Sci.* – 2021. – Vol. 7. – P. 1277–1293. DOI: 10.1002/pro.4079.
203. Soto-Herederó, G. Glycolysis – a Key Player in the Inflammatory Response / G. Soto-Herederó, M.M. Gómez de las Heras, E. Gabandé-Rodríguez // *FEBS.* – 2020. – Vol. 287. – P. 3350–3369. DOI: 10.1111/febs.15327.
204. Spetz, J. T Cells and Regulated Cell Death: Kill or Be Killed / J. Spetz, A. G. Presser, K. A. Sarosiek, // *International review of cell and molecular biology.* – 2019. – Vol. 342. – P. 27–71. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2018.07.004.

205. Spiljar, M. Metabolic regulation and function of T helper cells in neuroinflammation / M. Spiljar, V. K. Kuchroo, // *Seminars in immunopathology*. – 2022. Vol. 44. – № 5. – P 581–598. DOI: 10.1007/s00281-022-00959-z
206. Stark, J. M. The Metabolic Requirements of Th2 Cell Differentiation / J. M. Stark, C. A. Tibbitt, J. M. Coquet // *Frontiers in immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 2318. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02318.
207. Stojić–Vukanić, Z. GM–CSF– Producing Th Cells in Rats Sensitive and Resistant to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis / Z. Stojić–Vukanić // *PLoS one*. – 2016. – Vol. 11. – № 11. – P. e0166498. DOI: 10.1371/journal.pone.0166498.
208. Su, F. CIRBP Ameliorates Neuronal Amyloid Toxicity via Antioxidative and Antiapoptotic Pathways in Primary Cortical Neurons / F. Su, S. Yang, H. Wang [et al.] // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2020. – P. 2786139. DOI: 10.1155/2020/2786139.
209. Sun, Y. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis / Y. Sun [et al.] // *Journal of receptor and signal transduction research*. – 2015. – Vol. 35. – № 6. – P. 600–604. DOI: 10.3109/10799893.2015.1030412.
210. Suzuki, N. Regulation of hypoxia–inducible gene expression after HIF activation / N. Suzuki [et al.] // *Experimental cell research*. – 2017. – Vol. 356. – № 2. – P. 182–186. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.03.013.
211. Talreja, J. HIF–1 α regulates IL–1 β and IL–17 in sarcoidosis / J. Talreja, H. Talwar, C. Bauerfeld // *eLife*. – 2019. – Vol. 8. – P. e44519. DOI: 10.7554/eLife.44519.
212. Tao, J. H. Hypoxia–inducible factors in T lymphocyte differentiation and function. A review in the theme: cellular responses to hypoxia / J. H. Tao, J. Barbi, F. Pan // *American journal of physiology. Cell physiology*. – 2015. – Vol. 309. – № 9. – P. 580–589. DOI: 10.1152/ajpcell.00204.2015.
213. Taylor C. T. The effect of HIF on metabolism and immunity / C. T. Taylor, C. C. Scholz, // *Nat Rev Nephrol*. – 2022. Vol. 18. – P. 573–587. DOI: 10.1038/s41581-022-00587-8.

214. Thaker, Y. R. TCR and CD28 activate the transcription factor NF- κ B in T-cells via distinct adaptor signaling complexes / Thaker Y. R. [et al.] // Immunology letters. – 2015. – Vol. 163(1). – P. 113–119. DOI: 10.1016/j.imlet.2014.10.020.

215. Toubai, T. Mitochondrial Deacetylase SIRT3 Plays an Important Role in Donor T Cell Responses after Experimental Allogeneic Hematopoietic Transplantation / T. Toubai [et al.] // Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950). – 2018. – Vol. 201. – № 11. – P. 3443–3455. DOI: 10.4049/jimmunol.1800148.

216. Trebak, M. Calcium signalling in T cells. Nature reviews / M. Trebak, J. P. Kinet // Immunology. – 2019. – Vol. 19 № 3. – P. 154–169. DOI: 10.1038/s41577-018-0110-7.

217. Trefts, E. AMPK: restoring metabolic homeostasis over space and time / E. Trefts, R.J. Shaw // Molecular cell. – 2021. – Vol. 81. – № 18. – P. 3677–3690. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.08.015.

218. Tuo, Z. HK3 is correlated with immune infiltrates and predicts response to immunotherapy in non-small cell lung cancer / Z. Tuo, X. Zheng, Y. Zong [et al.] // Clinical and translational medicine. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 319–330. DOI: 10.1002/ctm2.6.

219. Turner, S. J. CD8+ T-Cell Memory: The Why, the When, and the How / S. J. Turner [et al.] // Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2021. – Vol. 13. – 5. – P. a038661. DOI: 10.1101/cshperspect.a038661.

220. Vandana, K. Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation by IL-2—A Balancing Act / K. Vandana, S. Schluns // Front. Immunol. – 2018. – Vol. 2 P. 987 DOI: 10.3389/fimmu.2018.02987.

221. Varanasi, S. K. Hexokinase II may be dispensable for CD4 T cell responses against a virus infection / S. K. Varanasi, U. Jaggi, N. Hay, [et al.] // PloS one. – 2018. – Vol. 13. – № 1. – P. e0191533. DOI: 10.1371/journal.pone.0191533.

222. Veliça, P. Modified Hypoxia-Inducible Factor Expression in CD8+ T Cells Increases Antitumor Efficacy / P. Veliça [et al.] // Cancer immunology research. – 2021. – Vol. 9. – 4. – P. 401–414. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-20-0561.

223. Voss, K. A guide to interrogating immunometabolism / K. Voss, H. S. Hong, J. E. Bader [et al.] // *Nat Rev Immunol.* – 2021. – Vol. 21. – P. 637–652 (2021). DOI: 10.1038/s41577-021-00529-8.
224. Walker, J. A. TH2 cell development and function / J.A. Walker, A. McKenzie // *Nature reviews. Immunology.* – 2018. – Vol. 18. – № 2. – P. 121–133. DOI: 10.1038/nri.2017.118.
225. Wan, J. IL-9 and IL-9- Producing cells in tumor immunity. *Cell communication and signaling* / J. Wan [et al.] // *CCS 2020.* – Vol. 18. – № 1. – P. 50. DOI: 10.1186/s12964-020-00538-5.
226. Wang, T. SENP1-Sirt3 Signaling Controls Mitochondrial Protein Acetylation and Metabolism / T. Wang [et al.] // *Molecular cell.* – 2020. – Vol. 75. – № 4. – P. 823–834.e5. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.06.008.
227. Wang, Y. The Role of Mitochondria in the Immune Response in Critical Illness / Y. Wang, A.S. McLean // *Critical care (London, England).* – 2022. – Vol. 26. – № 1. – P. 80. DOI: 10.1186/s13054-022-03908-2.
228. Weng C. Y. Immuno-Metabolism: The Role of Cancer Niche in Immune Checkpoint Inhibitor Resistance / C. Y. Weng [et al.] // *International journal of molecular sciences.* – 2021. – Vol. 22. – № 3. – P. 1258. DOI: 10.3390/ijms22031258.
229. Wherry, E. J. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion / E. J Wherry, M. Kurachi // *Nature reviews. Immunology.* – 2015. – Vol. 15. – № 8. – P. 486–499. DOI: 10.1038/nri3862.
230. White, M. R. The sweet side of RNA regulation: glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase as a noncanonical RNA-binding protein / M. R. White, E. D. Garcin, // *Wiley interdisciplinary reviews. RNA.* – 2016. – Vol. 7. – № 1. – P. 53–70. DOI: 10.1002/wrna.1315.
231. Wik, J. A. T Cell Metabolism in Infection / J. A. Wik, B. S. Skålhegg, // *Frontiers in immunology.* – 2022. – Vol. 13. – P. 840610. DOI: 10.3389/fimmu.2022.840610.
232. Williams, N. C. A Role for the Krebs Cycle Intermediate Citrate in Metabolic Reprogramming in Innate Immunity and Inflammation / N. C. Williams, L.

O'Neill // *Frontiers in immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 141. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00141.

233. Wolf, A. J. Hexokinase Is an Innate Immune Receptor for the Detection of Bacterial Peptidoglycan / A. J. Wolf, C. N Reyes., W. Liang. // *Cell*. – 2006. – Vol. 166. – № 3. – P. 624–636. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.076/

234. Wu, N. Alpha-KetoGLUTarate: Physiological Functions and Applications / N. Wu [et al.] // *Biomolecules & therapeutics*. – 2016. – Vol. 24. – № – P. 1–8. DOI: 10.4062/biomolther.2015.078.

235. Xia, C. Redox-responsive nanoassembly restrained myeloid-derived suppressor cells recruitment through autophagy-involved lactate dehydrogenase A silencing for enhanced cancer immunochemotherapy / C. Xia, M. Li, G. Ran [et al.] // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2021. – Vol. 335. – P. 557–574. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.05.034.

236. Xiang, H. C. AMPK activation attenuates inflammatory pain through inhibiting NF- κ B activation and IL-1 β expression / H. C. Xiang, L. X. Lin, X. F. Hu [et al.] // *Journal of neuroinflammation*. – 2019. – Vol. 16. – № 1. – P. 34. DOI: 10.1186/s12974-019-1411-x.

237. Xu, T. Metabolic control of T_H17 and induced T_{reg} cell balance by an epigenetic mechanism / Xu, T., Stewart, K., Wang, X. et al. // *Nature*. – 2017. – Vol. 548. – P. 228–233.

238. Xu, W. Peeking under the Hood of Naive T Cells / W. Xu, J. D. Powell // *Cell metabolism*. – 2018. – Vol. 28. – № 6. – P. 801–802. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.11.008.

239. Yamaguchi, R. Roles of myeloperoxidase and GAPDH in interferon-gamma production of GM-CSF-dependent macrophages / R. Yamaguchi, T. Yamamoto, A. Sakamoto [et al.] // *Heliyon*. – 2016. – Vol. 2. – № 2. – P. e00080. DOI: 10.1016/j.heliyon.2016.e00080.

240. Yang, K. Regulation of Treg Cell Metabolism and Function in Non-Lymphoid Tissues / K. Yang // *Frontiers in immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 909705. DOI: 10.3389/fimmu.2022.909705.

241. Yang, Z. Z. Expression of LAG-3 defines exhaustion of intratumoral PD-1+ T cells and correlates with poor outcome in follicular lymphoma / Z. Z. Yang, H. J. Kim, J. C. Villasboas [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – № 37. – P. 61425–61439. DOI: 10.18632/oncotarget.18251.

242. Yfantis, A. Transcriptional Response to Hypoxia: The Role of HIF-1-Associated Co-Regulators / A. Yfantis, I. Mylonis, G. Chachami [et al.] // *Cells*. – 2023. – Vol. 12. № 5. – P. 798. DOI: 10.3390/cells12050798 .

243. Yu, W., Loss of SIRT3 Provides Growth Advantage for B Cell Malignancies / W. Yu, R.A. Denu, K. Krautkramer [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2016. – Vol. 291. – P. 3268–3279.

244. Zamaraeva, M. Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase / M. Zamaraeva, R. Sabirov, E. Maeno [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2005. – Vol. 12. – P. 1390–1397. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401661.

245. Zbigniew Z. Cytokine-like Roles for Metabolites in Immunity / Z. Zbigniew, A.J. Luke A.J // *Molecular Cell*. – 2020. – Vol. 78(5). – P 814–823.

246. Zhang, F. A cold-inducible RNA-binding protein (CIRP)-derived peptide attenuates inflammation and organ injury in septic mice / F. Zhang, M. Brenner, W. L. Yang [et al.] // *Sci Rep*. – 2018. – Vol. 8. P. 3052.

247. Zhang, J. High glucose induces apoptosis of HUVECs in a mitochondria-dependent manner by suppressing hexokinase 2 expression / J. Zhang [et al.] // *Experimental and therapeutic medicine*. – 2019. – Vol. 18. – № 1. – 621–629. DOI: 10.3892/etm.2019.7609.

248. Zhang, J. Mitochondrial Sirtuin 3: New emerging biological function and therapeutic target / J. Zhang, H. Xiang, J. Liu [et al.] // *Theranostics*. – 2020. – Vol. 10. – № 18. – P. 8315–8342. DOI: 10.7150/thno.45922.

249. Zhang, N. CD8 (+) T cells: foot soldiers of the immune system / N. Zhang, M. J. Bevan, // *Immunity*. – 2011. – Vol. 35. – № 2. – P. 161–168. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.07.010.

250. Zhang, Z. PKM2, function and expression and regulation / Z. Zhang, X. Deng, Y. Liu [et al.] // Cell & bioscience. – 2019. – Vol. 9. – P. 52 DOI: 10.1186/s13578-019-0317-8.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМФ	–	аденозинмонофосфат
АТФ	–	аденозинтрифосфат
АФК	–	активные формы кислорода
ГТФ	–	гуанозинтрифосфат
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛДГ	–	лактатдегидрогеназа
мРНК	–	матричная рибонуклеиновая кислота
НАД+	–	никотинамидадениндинуклеотид
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
цАМФ	–	циклический аденинмонофосфат
AhR	–	рецептор ароматических углеводов
akt	–	протеинкиназа В
ALD	–	альдолаза
АМРК	–	АМФ-активируемая протеинкиназа
ANGII	–	ангиотензин 2
BATF	–	Фактор транскрипции, активирующий В-клетки
Bax	–	bcl-2-подобный белок 4
Bcl-2	–	белок В-клеточной лимфомы 2
Blimp-1	–	индуцируемый В-лимфоцитами белок созревания 1
CBP	–	CREB-связывающий белок
CCR7	–	C-C-рецептор хемокина 7
CD	–	кластер дифференцировки
CIRP	–	индуцируемый холодом РНК-связывающий белок
CXCR	–	хемокиновый рецептор
c-Myc	–	протоонкогенный белок Мус
eIF-4E	–	фактор трансляции эукариот 4E
Epo1	–	енолаза 1
ERK	–	киназа регулируемая внеклеточными сигналами
FIH	–	фактор ингибирующий HIF
FOX	–	белок Форкхеда
GAPDH	–	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
GATA-3	–	GATA связывающий белок 3
GLUT	–	глюкозный транспортер
GM-CSF	–	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
HDAC	–	Гистондеацетилаза 9

HIF-1 α	– индуцируемый гипоксией фактор 1 α
HLADR	– человеческий лейкоцитарный антиген locus DR
HREs	– HIF-чувствительные элементы
IFN γ	– интерферон γ
IgA	– иммуноглобулин А
IgE	– иммуноглобулин Е
IgG	– иммуноглобулин G
IL	– интерлейкин
IL5R	– рецептор интерлейкина 5
LAG-3	– ген активации лимфоцитов 3
MAPK	– митоген-активируемая протеинкиназа
MBP-1	– белок-1, связывающий промотор с-тис
MCT	– монокарбоксилатный транспортер
MitoHK-II	– митохондриальная гексокиназа 2
mTOR	– мишень рапамицина млекопитающих
NF- κ B	– ядерный фактор κ B
NK	– естественный киллер
OXPPOS	– окислительное фосфорилирование
p70S6K	– Рибосомальная протеинкиназа S6 бета-1
PD	– пируватдегидрогеназа
PDK	– киназа пируватдегидрогеназы
PFK	– фосфофруктокиназа
PGC-1 α	– коактиватор 1-альфа-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом, гамма
PHD	– домен пролингидроксилазы
PI3K	– Фосфоинозитид-3-киназа
PKC	– протеинкиназа C
PKM	– пируваткиназа
ROR γ T	– Гамма-орфанный рецептор, родственник RAR
SIRT3	– сиртуин 3
SOD	– супероксид дисмутаза
STAT	– передатчик сигнала и активатор транскрипции
T-bet	– T-Box транскрипционный фактор
T _c	– фолликулярная Т-клетка
TCA	– цикл трикарбоновых кислот
T _{cm}	– центральная клетка памяти
TCR	– Т-клеточный рецептор
Teff	– Т-эффекторные клетки

Tem	–	периферическая клетка памяти
Tfh	–	фолликулярная Т-клетка
TGF- β	–	трансформирующий фактор роста β
Th	–	Т-хелпер
TIM-3	–	Т-клеточный иммуноглобулиновый и муциновый домен 3
TLR	–	толл-подобный рецептор
TNF α	–	фактор некроза опухоли α
Treg	–	Т-регуляторная клетка
TRP	–	транзистный рецептор потенциала
VCAM-1	–	васкулярная молекула клеточной адгезии 1
VHL	–	белок Фон Хиппель-Линдау
SP1	–	специфический белок 1
NRF2	–	Ядерный фактор 2-родственный эритроидному фактору 2