

УДК 612.112.94:577.121.7

DOI: 10.37482/2687-1491-Z155

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА НА ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

С.Д. Круглов* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4085-409X>
О.В. Зубаткина* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5039-2220>
А.В. Самодова* ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9835-8083>

*Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаверова
Уральского отделения Российской академии наук
(г. Архангельск)

Метаболическая активность оказывает существенное влияние на дифференцировку, пролиферацию и функционирование Т-клеток. Различные субпопуляции лимфоцитов в разной степени используют гликолиз и митохондриальный метаболизм, основными регуляторами которых являются индуцируемый гипоксией фактор 1-альфа (HIF-1 α) и сиртуин 3 (SIRT3) соответственно. **Цель исследования** – выявить характер изменений популяционного состава лимфоцитов периферической крови человека в зависимости от уровней внутриклеточных регуляторов метаболизма SIRT3 и HIF-1 α . **Материалы и методы.** Обследовано 227 жителей г. Архангельска и Архангельской области, средний возраст которых составил 42 \pm 11 лет. Абсолютное содержание лимфоцитов в венозной крови определялось на гематологическом анализаторе Sysmex XS 500i, содержание фенотипов CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD10⁺, CD25⁺, CD95⁺ – методом непрямой иммунопероксидазной реакции. Внутриклеточное содержание аденозинтрифосфата (АТФ) было измерено биоломинесцентным методом с использованием люциферазы. Концентрации HIF-1 α и SIRT3 измерялись в лизате лимфоцитов при помощи иммуноферментного анализа. Для разделения общей выборки на группы по содержанию SIRT3 и HIF-1 α применялся кластерный анализ (метод *k*-средних). **Результаты.** Внутриклеточная концентрация SIRT3 и HIF-1 α изменялась согласованно с внутриклеточной концентрацией АТФ. Установлено, что в группе с высокой концентрацией HIF-1 α удельный вес CD4⁺, CD8⁺, CD10⁺, CD25⁺-лимфоцитов был выше, чем в группе с высокой концентрацией SIRT3, в которой выше был удельный вес CD95⁺-лимфоцитов. Таким образом, содержание внутриклеточных регуляторов метаболизма, координирующих работу путей наработки АТФ в клетке – окислительное фосфорилирование (SIRT3) и гликолиз (HIF-1 α), влияет на популяционный состав лимфоцитов и поэтому важно для оценки иммунного реагирования.

Ключевые слова: индуцируемый гипоксией фактор 1-альфа, сиртуин 3, аденозинтрифосфат (АТФ), клеточный иммунитет, популяции лимфоцитов, иммунометаболизм.

Ответственный за переписку: Круглов Сергей Дмитриевич, адрес: 163000, г. Архангельск, просп. Ломоносова, д. 249; e-mail: stees67@yandex.ru

Для цитирования: Круглов С.Д., Зубаткина О.В., Самодова А.В. Влияние внутриклеточной регуляции метаболизма на популяционный состав лимфоцитов периферической крови человека // Журн. мед.-биол. исследований. 2023. Т. 11, № 3. С. 292–301. DOI: 10.37482/2687-1491-Z155

Деятельность иммунных клеток как в состоянии покоя, так и при активации контролируется сложной сетью сигналов, задействующих различные интерлейкины, в частности IL-7, необходимый для выживания наивных Т-клеток, и мембранные рецепторы, например TCR (Т-клеточный рецептор), при взаимодействии с которым происходит активация иммунного ответа [1–3]. Помимо этого, субстраты и метаболиты также являются важными регуляторами функций иммунных клеток. Динамическое и двунаправленное взаимодействие между регулируемыми иммунный ответ факторами и метаболизмом способствует эффективному развитию реакций адаптивного иммунитета [4].

Различные состояния Т-клеток требуют реализации метаболических программ, обеспечивающих их функциональные потребности. Переход между состояниями покоя и активации сопровождается перепрограммированием клеточного метаболизма. Наивные Т-клетки быстро перестраивают метаболизм после активации, чтобы удовлетворить возросшие потребности в энергии, связанные с пролиферацией и дифференцировкой. Активированные Т-клетки реализуют одну из множества функциональных программ, каждая из которых требует определенных биохимических перестроек – в частности, повышается экспрессия генов, связанных с гликолизом, глутаминолизом, включая гены белков-транспортёров веществ, таких как глюкоза и аминокислоты [1, 5].

Одним из регуляторов гликолиза является индуцируемый гипоксией фактор 1 (HIF-1) [6]. Этот фактор транскрипции играет важную роль в клеточном ответе на низкий уровень кислорода [7]. Однако при нормоксии в связи с особенностями метаболизма лимфоцитов может происходить стабилизация его альфа-субъединицы (HIF-1 α), что способствует регуляции HIF-1 экспрессии генов, отвечающих за функционирование активированных Т-клеток [8].

Сиртуин 3 (SIRT3) представляет собой деацетилазу, локализующуюся преимущественно в митохондриальном матриксе и играющую значимую роль в регуляции работы митохондрий [9]. SIRT3 способствует функционированию цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) посредством по-

вышения выработки ацетил-коэнзима А и других метаболитов ЦТК. Так, деацетилирование с помощью SIRT3 пируватдегидрогеназного комплекса позволяет пирувату активнее метаболитизироваться в ацетил-коэнзим А, что приводит к увеличению поглощения клеткой глюкозы за счет активации протеинкиназы В (Akt) [10, 11]. Также SIRT3 способствует активации бета-окисления жирных кислот [12], а деацетилирование SIRT3 глутаматдегидрогеназы усиливает утилизацию аминокислот [13]. Кроме того, воздействие SIRT3 на субъединицы комплексов I–IV окислительной дыхательной цепи стимулирует окислительное фосфорилирование (ОХРНОС) [10].

В настоящее время большой интерес для исследователей представляет изучение влияния на метаболизм лимфоцитов регуляторных белков, которые координируют работу таких метаболических путей, как гликолиз и ОХРНОС в митохондриях, имеющие очень большое значение для различных субпопуляций лимфоцитов [14, 15].

Целью нашего исследования было выявить характер изменений популяционного состава лимфоцитов периферической крови человека в зависимости от уровней внутриклеточных регуляторов метаболизма SIRT3 и HIF-1 α .

Материалы и методы. В исследовании приняли участие волонтеры, проживающие в г. Архангельске и Архангельской области. Перед проведением исследования от каждого участника было получено добровольное информированное согласие. Средний возраст обследуемых составил 42 \pm 11 лет.

Концентрация АТФ была измерена у 104 чел., SIRT3 – у 55 чел. и HIF-1 α – у 68 чел. Для этого утром натощак отбиралась венозная кровь из локтевой вены. Измерение абсолютного содержания лимфоцитов в венозной крови выполнялось на автоматическом гематологическом анализаторе Sysmex XS-500i (Япония), содержание фенотипов CD4⁺, CD8⁺, CD95⁺, CD3⁺, CD10⁺, CD25⁺ устанавливалось методом непрямой иммунопероксидазной реакции с использованием реагентов производства ООО «Сорбент» (ПФ). SIRT3 и HIF-1 α определялись в лизате лимфоцитов. Для получения лизата лимфоцитарная взвесь с предварительно измеренной на анализаторе Sysmex

XS-500i концентрацией клеток обрабатывалась лизирующим раствором производства компании Cloud-Clone (США). Измерение концентрации SIRT3 и HIF-1 α проводилось при помощи иммуноферментного анализа, использовались наборы компании Cloud-Clone.

Статистическая обработка полученной информации осуществлялась в пакетах программ Statistica 11.0 (StatSoft, США), MS Excel 2016. Сравнение распределения данных с нормальным выполнялось при помощи критерия Шапиро–Уилка. Распределения результатов оказались сходны с нормальным, поэтому для описания данных производилось вычисление

среднего значения (M) и стандартного отклонения (SD). Кластерный анализ (метод k -средних) использовался для разделения общей выборки на группы. Сравнение количественных значений между группами осуществлялось с использованием t -критерия Стьюдента. Различия считались статистически достоверными при уровне значимости t -критерия $p < 0,05$.

Результаты. Обследуемые лица с измеренными внутриклеточными концентрациями HIF-1 α и SIRT3 были разделены методом k -средних кластерного анализа на статистически значимо различающиеся по изучаемым показателям группы (табл. 1, 2).

Таблица 1

СРАВНЕНИЕ ПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛЮДЕЙ ПРИ РАЗНОМ ВНУТРИКЛЕТОЧНОМ СОДЕРЖАНИИ SIRT3, $M \pm SD$
COMPARISON OF THE POPULATION COMPOSITION OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES WITH DIFFERENT INTRACELLULAR SIRT3 CONTENT, $M \pm SD$

Показатель	Кластер 1 ($n = 28$)	Кластер 2 ($n = 27$)	p
SIRT3, нг/10 ⁶ кл.	0,35 \pm 0,22	0,54 \pm 0,38	0,0411
Лимфоциты, 10 ⁶ кл./мл	2,53 \pm 0,46	1,64 \pm 0,32	<0,0001
CD3 ⁺ , 10 ⁶ кл./мл	1,76 \pm 0,29	1,10 \pm 0,22	<0,0001
CD4 ⁺ , 10 ⁶ кл./мл	0,77 \pm 0,24	0,48 \pm 0,16	<0,0001
CD8 ⁺ , 10 ⁶ кл./мл	0,76 \pm 0,28	0,44 \pm 0,17	<0,0001
CD10 ⁺ , 10 ⁶ кл./мл	0,76 \pm 0,32	0,45 \pm 0,16	<0,0001
CD25 ⁺ , 10 ⁶ кл./мл	0,38 \pm 0,11	0,22 \pm 0,06	<0,0001
CD95 ⁺ , 10 ⁶ кл./мл	0,78 \pm 0,30	0,58 \pm 0,20	0,0037

Таблица 2

СРАВНЕНИЕ ПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛЮДЕЙ ПРИ РАЗНОМ ВНУТРИКЛЕТОЧНОМ СОДЕРЖАНИИ HIF-1 α , $M \pm SD$
COMPARISON OF THE POPULATION COMPOSITION OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES WITH DIFFERENT INTRACELLULAR HIF-1 α CONTENT, $M \pm SD$

Показатель	Кластер 1 ($n = 43$)	Кластер 2 ($n = 25$)	p
HIF-1 α , нг/10 ⁶ кл.	1,18 \pm 0,35	3,02 \pm 1,37	<0,0001
Лимфоциты, 10 ⁶ кл./мл	2,22 \pm 0,63	1,61 \pm 0,48	0,0009
CD3 ⁺ , 10 ⁶ кл./мл	1,48 \pm 0,42	1,05 \pm 0,33	0,0005
CD4 ⁺ , 10 ⁶ кл./мл	0,77 \pm 0,25	0,53 \pm 0,17	0,0008
CD8 ⁺ , 10 ⁶ кл./мл	0,71 \pm 0,24	0,48 \pm 0,18	0,0006
CD10 ⁺ , 10 ⁶ кл./мл	0,79 \pm 0,28	0,51 \pm 0,20	0,0004
CD25 ⁺ , 10 ⁶ кл./мл	0,33 \pm 0,13	0,22 \pm 0,05	0,0011
CD95 ⁺ , 10 ⁶ кл./мл	0,80 \pm 0,28	0,47 \pm 0,20	0,0058

Из данных таблиц можно увидеть, что для обоих регуляторов направленность изменений как абсолютного содержания лимфоцитов, так и всех фенотипов имеет сходный характер. В группах с более высокими концентрациями регуляторных белков (как SIRT3, так и HIF-1 α) все измеренные иммунные показатели оказались статистически значимо ниже. Кроме того, изменение содержания SIRT3 и HIF-1 α прямо соотносилось с концентрацией АТФ в лимфоцитах. Для визуализации взаимоотношенности уровня АТФ и содержания регуляторных белков была построена комбинированная диаграмма (рис. 1), которая показывает, что высокий уровень АТФ наблюдается при более высоких концентрациях обоих регуляторов.

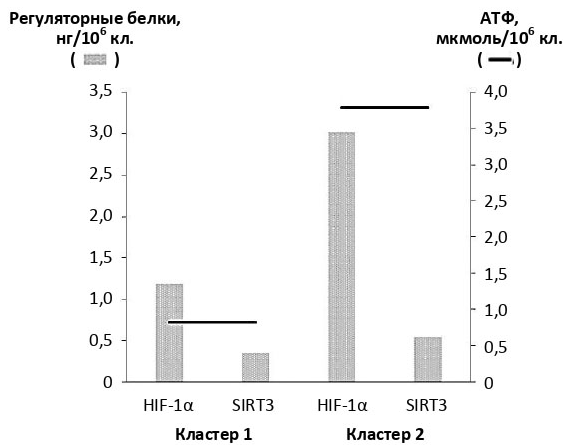


Рис. 1. Взаимобусловленность уровня АТФ и концентраций регуляторных белков (HIF-1 α и SIRT3) в лимфоцитах периферической крови обследованных людей

Fig. 1. Interdependence of ATP level and regulatory proteins (HIF-1 α and SIRT3) concentrations in peripheral blood lymphocytes of the examined people

Увеличение внутриклеточной концентрации АТФ и белков, регулирующих пути его наработки, отражает повышение активности лимфоцитарного метаболизма. Известно, что HIF-1 α и SIRT3 регулируют гликолиз (быстрый, но малоэффективный по продукции

АТФ путь метаболизма) и OXPHOS (медленный, но высокоэффективный путь наработки АТФ) соответственно, поэтому представляется важным сравнение популяционного состава лимфоцитов в зависимости от активности каждого из этих регуляторных белков. Для выявления внутригрупповых различий был проанализирован удельный вес измененных популяций лимфоцитов. При сравнении использовался метод математического потенцирования с вычислением обратного натурального логарифма отношения концентрации CD3⁺ к концентрациям остальных определяемых фенотипов. Различие в популяционном составе лимфоцитов в зависимости от того, концентрация какого из внутриклеточных регуляторов (HIF-1 α или SIRT3) была выше, и, соответственно, от активности путей гликолиза или OXPHOS проиллюстрировано на рис. 2.

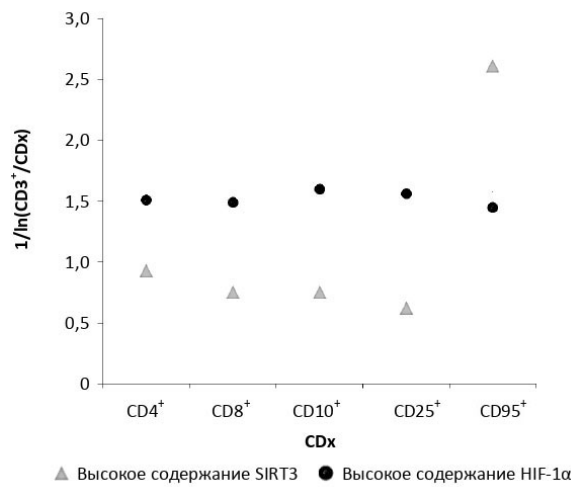


Рис. 2. Особенности популяционного состава лимфоцитов в периферической крови людей с высоким внутриклеточным содержанием SIRT3 или HIF-1 α : 1/ln(CD3⁺/CDx) – обратный натуральный логарифм отношения концентрации CD3⁺ к концентрациям остальных определяемых фенотипов лимфоцитов; различия между группами статистически значимы во всех случаях ($p < 0,05$)

Fig. 2. Population composition of human peripheral blood lymphocytes with high intracellular concentrations of SIRT3 or HIF-1 α

Из *рис. 2* следует, что в группе с высокой концентрацией SIRT3 удельный вес лимфоцитов с дифференцировочными антигенами CD4⁺ (Т-хелперы), CD8⁺ (цитотоксические Т-клетки) и CD10⁺ (готовые к пролиферации клетки) оказался статистически значимо ниже, в то время как удельный вес лимфоцитов, меченных к апоптозу (CD95⁺), – выше, чем в группе, имеющей высокую концентрацию HIF-1 α . Также достоверны различия в удельном весе лимфоцитов с маркером клеточной активации CD25 – он оказался больше в группе с высокой концентрацией HIF-1 α .

Обсуждение. Различные субпопуляции Т-клеток используют разные метаболические пути для поддержания своей функциональной активности [5]. Наивные Т-клетки полагаются на OXPHOS для сохранения жизнеспособности в состоянии покоя [16, 17]. После активации наивные Т-клетки переходят от окисления глюкозы через OXPHOS к преимущественному использованию аэробного гликолиза и окислению глутамину [18].

HIF-1 α влияет на дифференцировку и функционирование различных субпопуляций Т-клеток в условиях нормоксии [19]. При достаточном содержании кислорода в микроокружении клетки активация экспрессии HIF-1 α происходит под действием белка-передатчика сигнала и активатора транскрипции 3 (STAT3), который может напрямую связываться с промотором HIF-1 α [20]. В свою очередь, активация STAT3 происходит под действием IL-2 через его рецептор CD25 [21]. Субпопуляции CD4⁺-лимфоцитов Th1, Th2, Th17 и Treg имеют различную гликолитическую активность [22]. Для Th17 характерна наибольшая индукция гликолиза, а для Treg – наименьшая. HIF-1 α непосредственно участвует в дифференцировке Th17 путем транскрипционной активации гамма-орфанного рецептора, родственного рецептору ретиноевой кислоты и являющегося ключевым фактором для развития Th17 [23]. HIF-1 α необходим для увеличения активности гликолиза в цитотоксических Т-клетках после стимуляции TCR и способствует экспрессии

многих факторов, задействованных в дифференцировке эффекторных лимфоцитов CD8⁺ [24]. 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. При этом HIF-1 α может непосредственно регулировать экспрессию мембранного белка CD10 [25]. В данном исследовании было установлено, что в группе с более высоким содержанием HIF-1 α удельный вес CD4⁺, CD8⁺, CD10⁺ и CD25⁺-лимфоцитов статистически значимо выше, чем в группе с более высоким содержанием SIRT3.

Дифференцировка в Treg-клетки происходит при активации OXPHOS. SIRT3-положительная регуляция митохондриальной активности прямо связана с супрессивным действием Treg-клеток [3]. Также SIRT3 за счет деацетилирования супероксиддисмутазы 2 может снижать активность выработки активных форм кислорода [26]. Уменьшение концентрации активных форм кислорода приводит к снижению пролиферативной активности лимфоцитов и их эффекторных функций [27].

Повышение активности митохондриального метаболизма характерно для CD95⁺-клеток, меченных к апоптозу. CD95 может инициировать два первичных сигнальных пути. Один из них активирует апоптоз. Программируемая клеточная смерть является весьма энергетически затратным процессом. Показано, что в апоптующих клетках концентрация АТФ поддерживается на высоком уровне, при этом происходит ингибирование гликолиза посредством стимуляции экспрессии проапоптического белка p53. Белок p53 негативно регулирует экспрессию гексокиназы и снижает захват глюкозы путем подавления экспрессии белка-переносчика глюкозы GLUT1. Активность OXPHOS повышается за счет увеличения экспрессии белка сборки цитохром-С-оксидазы – фермента цепи переноса электронов митохондрий [28]. Другой путь способствует неапоптическому Fas-опосредованному сигнальному каскаду. Fas-

опосредованная передача запускает сигнальный каскад митоген-активируемой протеинкиназы, что приводит к усилению экспрессии нуклеарного фактора каппа В (NF-κB) [29]. В свою очередь, NF-κB связывается с промотором SIRT3, усиливая его экспрессию [30]. Полученные нами результаты показывают, что в группе с более высоким содержанием SIRT3 удельный вес меченных к апоптозу (CD95⁺) клеток был выше, чем в группе с более высоким содержанием HIF-1α. При этом удельный вес клеток с высокой гликолитической активностью (CD4⁺, CD8⁺, CD10⁺) оказался ниже.

Итак, для развития и поддержания функциональной активности Т-клеток большое значение имеет активность гликолиза и митохондриального метаболизма. Регуляция активности ферментов, задействованных в этих метаболических путях, происходит за счет контроля экспрессии генов и посттрансляционной модификации. В частности, HIF-1α контролирует экспрессию генов всех ферментов гликолитического пути, SIRT3 посредством деацетилирования ключевых ферментов способен увеличивать активность ЦТК, бета-окисления жирных кислот и комплексов цепи переноса электронов. Результаты проведенного исследования

показывают, что популяционный состав лимфоцитов может меняться при изменении концентраций белков, регулирующих метаболизм лимфоцитов. В группах с более высокой концентрацией HIF-1α, обуславливающей более активное использование гликолиза, наблюдается увеличение содержания пролиферирующих (CD10⁺), хелперных (CD4⁺), цитотоксических (CD8⁺) и активированных (CD25⁺) клеток, что способствует активации клеточно-опосредованного иммунного ответа. В то же время повышение концентрации регулятора митохондриального метаболизма SIRT3 приводит к увеличению количества меченных к апоптозу клеток с рецептором CD95, что может говорить о сдерживании иммунного реагирования.

Оценка метаболической активности лимфоцитов является перспективным направлением для исследования функционирования системы адаптивного иммунитета. Определение внутриклеточного содержания регуляторных белков, отражающих активность гликолиза и митохондриального метаболизма, может способствовать выявлению вероятных нарушений на этапе иммунного реагирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Chapman N.M., Chi H. Metabolic Adaptation of Lymphocytes in Immunity and Disease // *Immunity*. 2022. Vol. 55, № 1. P. 14–30. DOI: [10.1016/j.immuni.2021.12.012](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.12.012)
2. Huang H.-Y., Luther S.A. Expression and Function of Interleukin-7 in Secondary and Tertiary Lymphoid Organs // *Semin. Immunol.* 2012. Vol. 24, № 3. P. 175–189. DOI: [10.1016/j.smim.2012.02.008](https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.02.008)
3. Kumar B.V., Connors T.J., Farber D.L. Human T Cell Development, Localization, and Function Throughout Life // *Immunity*. 2018. Vol. 48, № 2. P. 202–213. DOI: [10.1016/j.immuni.2018.01.007](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007)
4. Chapman N.M., Boothby M.R., Chi H. Metabolic Coordination of T Cell Quiescence and Activation // *Nat. Rev. Immunol.* 2020. Vol. 20. P. 55–70. DOI: [10.1038/s41577-019-0203-y](https://doi.org/10.1038/s41577-019-0203-y)
5. Shyer J.A., Flavell R.A., Bailis W. Metabolic Signaling in T Cells // *Cell Res.* 2020. Vol. 30, № 8. P. 649–659. DOI: [10.1038/s41422-020-0379-5](https://doi.org/10.1038/s41422-020-0379-5)
6. Kierans S.J., Taylor C.T. Regulation of Glycolysis by the Hypoxia-Inducible Factor (HIF): Implications for Cellular Physiology // *J. Physiol.* 2021. Vol. 599, № 1. P. 23–37. DOI: [10.1113/JP280572](https://doi.org/10.1113/JP280572)
7. Anne F., McGettrick L., O'Neill L.A.J. The Role of HIF in Immunity and Inflammation // *Cell Metab.* 2020. Vol. 32, № 4. P. 524–536. DOI: [10.1016/j.cmet.2020.08.002](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.08.002)
8. Cho S.H., Raybuck A.L., Blagih J., Kemboi E., Haase V.H., Jones R.G., Boothby M.R. Hypoxia-Inducible Factors in CD4⁺ T Cells Promote Metabolism, Switch Cytokine Secretion, and T Cell Help in Humoral Immunity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019. Vol. 116, № 18. P. 8975–8984. DOI: [10.1073/pnas.1811702116](https://doi.org/10.1073/pnas.1811702116)

9. Marcus J.M., Andrabi S.A. SIRT3 Regulation Under Cellular Stress: Making Sense of the Ups and Downs // *Front. Neurosci.* 2018. Vol. 12. Art. № 799. DOI: [10.3389/fnins.2018.00799](https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00799)
10. Ozden O., Park S.-H., Wagner B.A., Song H.Y., Zhu Y., Vassilopoulos A., Jung B., Buettner G.R., Gius D. SIRT3 Deacetylates and Increases Pyruvate Dehydrogenase Activity in Cancer Cells // *Free Radic. Biol. Med.* 2014. Vol. 76. P. 163–172. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.001](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.001)
11. Pillai V.B., Sundaresan N.R., Gupta M.P. Regulation of Akt Signaling by Sirtuins: Its Implication in Cardiac Hypertrophy and Aging // *Circ. Res.* 2014. Vol. 114, № 2. P. 368–378. DOI: [10.1161/CIRCRESAHA.113.300536](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300536)
12. Wang G., Fu X.-L., Wang J.-J., Guan R., Sun Y., Tony To S.-S. Inhibition of Glycolytic Metabolism in Glioblastoma Cells by Pt3glc Combined with PI3K Inhibitor via SIRT3-Mediated Mitochondrial and PI3K/Akt-MAPK Pathway // *J. Cell. Physiol.* 2019. Vol. 234, № 5. P. 5888–5903. DOI: [10.1002/jcp.26474](https://doi.org/10.1002/jcp.26474)
13. Fu X., Li K., Niu Y., Lin Q., Liang H., Luo X., Liu L., Li N. The mTOR/PGC-1 α /SIRT3 Pathway Drives Reductive Glutamine Metabolism to Reduce Oxidative Stress Caused by ISKNV in CPB Cells // *Microbiol. Spectr.* 2022. Vol. 10, № 1. Art. № e0231021. DOI: [10.1128/spectrum.02310-21](https://doi.org/10.1128/spectrum.02310-21)
14. Steinert E.M., Vasan K., Chandel N.S. Mitochondrial Metabolism Regulation of T Cell-Mediated Immunity // *Annu. Rev. Immunol.* 2021. Vol. 39. P. 395–416. DOI: [10.1146/annurev-immunol-101819-082015](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101819-082015)
15. Almeida L., Lochner M., Berod L., Sparwasser T. Metabolic Pathways in T Cell Activation and Lineage Differentiation // *Semin. Immunol.* 2016. Vol. 28, № 5. P. 514–524. DOI: [10.1016/j.smim.2016.10.009](https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.10.009)
16. van der Windt G.J.W., Pearce E.L. Metabolic Switching and Fuel Choice During T-Cell Differentiation and Memory Development // *Immunol. Rev.* 2012. Vol. 249, № 1. P. 27–42. DOI: [10.1111/j.1600-065X.2012.01150.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01150.x)
17. Madden M.Z., Rathmell J.C. The Complex Integration of T-Cell Metabolism and Immunotherapy // *Cancer Discov.* 2021. Vol. 11, № 7. P. 1636–1643. DOI: [10.1158/2159-8290.CD-20-0569](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0569)
18. Tao J.-H., Barbi J., Pan F. Hypoxia-Inducible Factors in T Lymphocyte Differentiation and Function. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2015. Vol. 309, № 9. P. C580–C589. DOI: [10.1152/ajpcell.00204.2015](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00204.2015)
19. Pawlus M.R., Wang L., Hu C.-J. STAT3 and HIF1 α Cooperatively Activate HIF1 Target Genes in MDA-MB-231 and RCC4 Cells // *Oncogene.* 2014. Vol. 33, № 13. P. 1670–1679. DOI: [10.1038/onc.2013.115](https://doi.org/10.1038/onc.2013.115)
20. Dikalova A.E., Itani H.A., Nazarewicz R.R., McMaster W.G., Flynn C.R., Uzhachenko R., Fessel J.P., Gamboa J.L., Harrison D.G., Dikalov S.I. Sirt3 Impairment and SOD2 Hyperacetylation in Vascular Oxidative Stress and Hypertension // *Circ. Res.* 2017. Vol. 121, № 5. P. 564–574. DOI: [10.1161/CIRCRESAHA.117.310933](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310933)
21. Soto-Herederó G., Gómez de las Heras M.M., Gabandé-Rodríguez E., Oller J., Mittelbrunn M. Glycolysis – a Key Player in the Inflammatory Response // *FEBS J.* 2020. Vol. 287, № 16. P. 3350–3369. DOI: [10.1111/febs.15327](https://doi.org/10.1111/febs.15327)
22. Dang E.V., Barbi J., Yang H.-Y. Control of T_H17/T_{reg} Balance by Hypoxia-Inducible Factor 1 // *Cell.* 2011. Vol. 146, № 5. P. 772–784. DOI: [10.1016/j.cell.2011.07.033](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.033)
23. Veliça P., Cunha P.P., Vojnovic N., Foskolou I.P., Bargiela D., Gojkovic M., Rundqvist H., Johnson R.S. Modified Hypoxia-Inducible Factor Expression in CD8⁺ T Cells Increases Antitumor Efficacy // *Cancer Immunol. Res.* 2021. Vol. 9, № 4. P. 401–414. DOI: [10.1158/2326-6066.CIR-20-0561](https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-20-0561)
24. Biswas S., Troy H., Leek R., Chung Y.-L., Li J.-L., Raval R.R., Turley H., Gatter K., Pezzella F., Griffiths J.R., Stubbs M., Harris A.L. Effects of HIF-1 α and HIF-2 α on Growth and Metabolism of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma 786-0 Xenografts // *J. Oncol.* 2010. Vol. 2010. Art. № 757908. DOI: [10.1155/2010/757908](https://doi.org/10.1155/2010/757908)
25. Yu W., Denu R.A., Krautkramer K.A., Grindle K.M., Yang D.T., Asimakopoulos F., Hematti P., Denu J.M. Loss of SIRT3 Provides Growth Advantage for B Cell Malignancies // *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291, № 7. P. 3268–3279. DOI: [10.1074/jbc.M115.702076](https://doi.org/10.1074/jbc.M115.702076)
26. Zamaraeva M.V., Sabirov R.Z., Maeno E., Ando-Akatsuka Y., Bessonova S.V., Okada Y. Cells Die with Increased Cytosolic ATP During Apoptosis: A Bioluminescence Study with Intracellular Luciferase // *Cell Death Differ.* 2005. Vol. 12, № 11. P. 1390–1397. DOI: [10.1038/sj.cdd.4401661](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401661)
27. Yarosz E.L., Chang C.-H. The Role of Reactive Oxygen Species in Regulating T Cell-Mediated Immunity and Disease // *Immune Netw.* 2018. Vol. 18, № 1. Art. № e14. DOI: [10.4110/in.2018.18.e14](https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e14)
28. Matsuura K., Canfield K., Feng W., Kurokawa M. Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer // *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 2016. Vol. 327. P. 43–87. DOI: [10.1016/bs.ircmb.2016.06.006](https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.06.006)

29. Williams J.W., Ferreira C.M., Blaine K.M., Rayon C., Velázquez F., Tong J., Peter M.E., Sperling A.I. Non-Apoptotic Fas (CD95) Signaling on T Cells Regulates the Resolution of Th2-Mediated Inflammation // *Front. Immunol.* 2018. Vol. 9. Art. № 2521. DOI: [10.3389/fimmu.2018.02521](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02521)

30. Neeli P.K., Gollavilli P.N., Mallappa S., Hari S.G., Kotamraju S. A Novel Metadherin δ 7 Splice Variant Enhances Triple Negative Breast Cancer Aggressiveness by Modulating Mitochondrial Function via NF κ B-SIRT3 Axis // *Oncogene.* 2020. Vol. 39, № 10. P. 2088–2102. DOI: [10.1038/s41388-019-1126-6](https://doi.org/10.1038/s41388-019-1126-6)

References

1. Chapman N.M., Chi H. Metabolic Adaptation of Lymphocytes in Immunity and Disease. *Immunity*, 2022, vol. 55, no. 1, pp. 14–30. DOI: [10.1016/j.immuni.2021.12.012](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.12.012)
2. Huang H.-Y., Luther S.A. Expression and Function of Interleukin-7 in Secondary and Tertiary Lymphoid Organs. *Semin. Immunol.*, 2012, vol. 24, no. 3, pp. 175–189. DOI: [10.1016/j.smim.2012.02.008](https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.02.008)
3. Kumar B.V., Connors T.J., Farber D.L. Human T Cell Development, Localization, and Function Throughout Life. *Immunity*, 2018, vol. 48, no. 2, pp. 202–213. DOI: [10.1016/j.immuni.2018.01.007](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007)
4. Chapman N.M., Boothby M.R., Chi H. Metabolic Coordination of T Cell Quiescence and Activation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, vol. 20, pp. 55–70. DOI: [10.1038/s41577-019-0203-y](https://doi.org/10.1038/s41577-019-0203-y)
5. Shyer J.A., Flavell R.A., Bailis W. Metabolic Signaling in T Cells. *Cell Res.*, 2020, vol. 30, no. 8, pp. 649–659. DOI: [10.1038/s41422-020-0379-5](https://doi.org/10.1038/s41422-020-0379-5)
6. Kierans S.J., Taylor C.T. Regulation of Glycolysis by the Hypoxia-Inducible Factor (HIF): Implications for Cellular Physiology. *J. Physiol.*, 2021, vol. 599, no. 1, pp. 23–37. DOI: [10.1113/JP280572](https://doi.org/10.1113/JP280572)
7. Anne F., McGettrick L., O'Neill L.A.J. The Role of HIF in Immunity and Inflammation. *Cell Metab.*, 2020, vol. 32, no. 4, pp. 524–536. DOI: [10.1016/j.cmet.2020.08.002](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.08.002)
8. Cho S.H., Raybuck A.L., Blagih J., Kemboi E., Haase V.H., Jones R.G., Boothby M.R. Hypoxia-Inducible Factors in CD4⁺ T Cells Promote Metabolism, Switch Cytokine Secretion, and T Cell Help in Humoral Immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2019, vol. 116, no. 18, pp. 8975–8984. DOI: [10.1073/pnas.1811702116](https://doi.org/10.1073/pnas.1811702116)
9. Marcus J.M., Andrabi S.A. SIRT3 Regulation Under Cellular Stress: Making Sense of the Ups and Downs. *Front. Neurosci.*, 2018, vol. 12. Art. no. 799. DOI: [10.3389/fnins.2018.00799](https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00799)
10. Ozden O., Park S.-H., Wagner B.A., Song H.Y., Zhu Y., Vassilopoulos A., Jung B., Buettner G.R., Gius D. SIRT3 Deacetylates and Increases Pyruvate Dehydrogenase Activity in Cancer Cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2014, vol. 76, pp. 163–172. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.001](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.001)
11. Pillai V.B., Sundaresan N.R., Gupta M.P. Regulation of Akt Signaling by Sirtuins: Its Implication in Cardiac Hypertrophy and Aging. *Circ. Res.*, 2014, vol. 114, no. 2, pp. 368–378. DOI: [10.1161/CIRCRESAHA.113.300536](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300536)
12. Wang G., Fu X.-L., Wang J.-J., Guan R., Sun Y., Tony To S.-S. Inhibition of Glycolytic Metabolism in Glioblastoma Cells by Pt3glc Combined with PI3K Inhibitor via SIRT3-Mediated Mitochondrial and PI3K/Akt-MAPK Pathway. *J. Cell. Physiol.*, 2019, vol. 234, no. 5, pp. 5888–5903. DOI: [10.1002/jcp.26474](https://doi.org/10.1002/jcp.26474)
13. Fu X., Li K., Niu Y., Lin Q., Liang H., Luo X., Liu L., Li N. The mTOR/PGC-1 α /SIRT3 Pathway Drives Reductive Glutamine Metabolism to Reduce Oxidative Stress Caused by ISKNV in CPB Cells. *Microbiol. Spectr.*, 2022, vol. 10, no. 1. Art. no. e0231021. DOI: [10.1128/spectrum.02310-21](https://doi.org/10.1128/spectrum.02310-21)
14. Steinert E.M., Vasan K., Chandel N.S. Mitochondrial Metabolism Regulation of T Cell-Mediated Immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2021, vol. 39, pp. 395–416. DOI: [10.1146/annurev-immunol-101819-082015](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101819-082015)
15. Almeida L., Lochner M., Berod L., Sparwasser T. Metabolic Pathways in T Cell Activation and Lineage Differentiation. *Semin. Immunol.*, 2016, vol. 28, no. 5, pp. 514–524. DOI: [10.1016/j.smim.2016.10.009](https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.10.009)
16. van der Windt G.J.W., Pearce E.L. Metabolic Switching and Fuel Choice During T-Cell Differentiation and Memory Development. *Immunol. Rev.*, 2012, vol. 249, no. 1, pp. 27–42. DOI: [10.1111/j.1600-065X.2012.01150.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01150.x)
17. Madden M.Z., Rathmell J.C. The Complex Integration of T-Cell Metabolism and Immunotherapy. *Cancer Discov.*, 2021, vol. 11, no. 7, pp. 1636–1643. DOI: [10.1158/2159-8290.CD-20-0569](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0569)
18. Tao J.-H., Barbi J., Pan F. Hypoxia-Inducible Factors in T Lymphocyte Differentiation and Function. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2015, vol. 309, no. 9, pp. C580–C589. DOI: [10.1152/ajpcell.00204.2015](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00204.2015)

19. Pawlus M.R., Wang L., Hu C.-J. STAT3 and HIF1 α Cooperatively Activate HIF1 Target Genes in MDA-MB-231 and RCC4 Cells. *Oncogene*, 2014, vol. 33, no. 13, pp. 1670–1679. DOI: [10.1038/onc.2013.115](https://doi.org/10.1038/onc.2013.115)
20. Dikalova A.E., Itani H.A., Nazarewicz R.R., McMaster W.G., Flynn C.R., Uzhachenko R., Fessel J.P., Gamboa J.L., Harrison D.G., Dikalov S.I. Sirt3 Impairment and SOD2 Hyperacetylation in Vascular Oxidative Stress and Hypertension. *Circ. Res.*, 2017, vol. 121, no. 5, pp. 564–574. DOI: [10.1161/CIRCRESAHA.117.310933](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310933)
21. Soto-Herederо G., Gómez de las Heras M.M., Gabandé-Rodríguez E., Oller J., Mittelbrunn M. Glycolysis – a Key Player in the Inflammatory Response. *FEBS J.*, 2020, vol. 287, no. 16, pp. 3350–3369. DOI: [10.1111/febs.15327](https://doi.org/10.1111/febs.15327)
22. Dang E.V., Barbi J., Yang H.-Y., Jinasena D., Yu H., Zheng Y., Bordman Z., Fu J., Kim Y., Yen H.-R., Luo W., Zeller K., Shimoda L., Topalian S.L., Semenza G.L., Dang C.V., Pardoll D.M., Pan F. Control of T_H17/T_{reg} Balance by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cell*, 2011, vol. 146, no. 5, pp. 772–784. DOI: [10.1016/j.cell.2011.07.033](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.033)
23. Veliça P., Cunha P.P., Vojnovic N., Foskolou I.P., Bargiela D., Gojkovic M., Rundqvist H., Johnson R.S. Modified Hypoxia-Inducible Factor Expression in CD8⁺ T Cells Increases Antitumor Efficacy. *Cancer Immunol. Res.*, 2021, vol. 9, no. 4, pp. 401–414. DOI: [10.1158/2326-6066.CIR-20-0561](https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-20-0561)
24. Biswas S., Troy H., Leek R., Chung Y.-L., Li J.-L., Raval R.R., Turley H., Gatter K., Pezzella F., Griffiths J.R., Stubbs M., Harris A.L. Effects of HIF-1 α and HIF2 α on Growth and Metabolism of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma 786-0 Xenografts. *J. Oncol.*, 2010, vol. 2010. Art. no. 757908. DOI: [10.1155/2010/757908](https://doi.org/10.1155/2010/757908)
25. Yu W., Denu R.A., Krautkramer K.A., Grindle K.M., Yang D.T., Asimakopoulos F., Hematti P., Denu J.M. Loss of SIRT3 Provides Growth Advantage for B Cell Malignancies. *J. Biol. Chem.*, 2016, vol. 291, no. 7, pp. 3268–3279. DOI: [10.1074/jbc.M115.702076](https://doi.org/10.1074/jbc.M115.702076)
26. Zamarayeva M.V., Sabirov R.Z., Maeno E., Ando-Akatsuka Y., Bessonova S.V., Okada Y. Cells Die with Increased Cytosolic ATP During Apoptosis: A Bioluminescence Study with Intracellular Luciferase. *Cell Death Differ.*, 2005, vol. 12, no. 11, pp. 1390–1397. DOI: [10.1038/sj.cdd.4401661](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401661)
27. Yarosz E.L., Chang C.-H. The Role of Reactive Oxygen Species in Regulating T Cell-Mediated Immunity and Disease. *Immune Netw.*, 2018, vol. 18, no. 1. Art. no. e14. DOI: [10.4110/in.2018.18.e14](https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e14)
28. Matsuura K., Canfield K., Feng W., Kurokawa M. Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, 2016, vol. 327, pp. 43–87. DOI: [10.1016/bs.ircmb.2016.06.006](https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.06.006)
29. Williams J.W., Ferreira C.M., Blaine K.M., Rayon C., Velázquez F., Tong J., Peter M.E., Sperling A.I. Non-Apoptotic Fas (CD95) Signaling on T Cells Regulates the Resolution of Th2-Mediated Inflammation. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9. Art. no. 2521. DOI: [10.3389/fimmu.2018.02521](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02521)
30. Neeli P.K., Gollavilli P.N., Mallappa S., Hari S.G., Kotamraju S. A Novel Metadherin δ 7 Splice Variant Enhances Triple Negative Breast Cancer Aggressiveness by Modulating Mitochondrial Function via NF κ B-SIRT3 Axis. *Oncogene*, 2020, vol. 39, no. 10, pp. 2088–2102. DOI: [10.1038/s41388-019-1126-6](https://doi.org/10.1038/s41388-019-1126-6)

DOI: 10.37482/2687-1491-Z155

*Sergey D. Kruglov** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4085-409X>

*Ol'ga V. Zubatkina** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5039-2220>

*Anna V. Samodova** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9835-8083>

*N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research
of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences
(Arkhangelsk, Russian Federation)

INFLUENCE OF INTRACELLULAR REGULATION OF METABOLISM ON THE POPULATION COMPOSITION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

Metabolic activity has a significant impact on the differentiation, proliferation and functioning of T cells. Different lymphocyte subpopulations use, to varying degrees, glycolysis and mitochondrial metabolism, whose main regulators are hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 α) and sirtuin 3 (SIRT3), respectively.

The **purpose** of this paper was to study changes in the population composition of peripheral blood lymphocytes in humans depending on the level of the intracellular metabolic regulators SIRT3 and HIF-1 α . **Materials and methods.** 227 residents of the city of Arkhangelsk and the Arkhangelsk Region were examined (mean age 42 ± 11 years). Absolute lymphocyte count was determined using the Sysmex XS 500i haematology analyser, while CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD10⁺, CD25⁺ and CD95⁺ phenotypes content, by indirect immunoperoxidase reaction. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration was measured using the luciferase bioluminescence method. HIF-1 α and SIRT3 concentrations were measured in lymphocyte lysate using enzyme immunoassay. To divide the total sample into groups according to SIRT3 and HIF-1 α content, *k*-means clustering was utilized. **Results.** Changes in SIRT3 and HIF-1 α intracellular concentrations correlated with ATP concentration. It was found that in the group with high HIF-1 α content, the proportion of CD4⁺, CD8⁺, CD10⁺ and CD25⁺ lymphocytes was greater than in the group with high SIRT3 concentration, which had a greater proportion of CD95⁺ lymphocytes. Thus, the content of intracellular metabolic regulators that regulate ATP production pathways in the cell, i.e. oxidative phosphorylation (SIRT3) and glycolysis (HIF-1 α), affects the population composition of lymphocytes and is therefore important for assessing the immune response.

Keywords: *HIF-1 α , SIRT3, adenosine triphosphate (ATP), cellular immunity, lymphocyte populations, immunometabolism.*

Received 21 November 2022
Accepted 5 May 2023
Published 25 September 2023

Поступила 21.11.2022
Принята 05.05.2023
Опубликована 25.09.2023

Corresponding author: Sergey Kruglov, address: prosp. Lomonosova 249, Arkhangelsk, 163000, Russian Federation; e-mail: stees67@yandex.ru

For citation: Kruglov S.D., Zubatkina O.V., Samodova A.V. Influence of Intracellular Regulation of Metabolism on the Population Composition of Peripheral Blood Lymphocytes. *Journal of Medical and Biological Research*, 2023, vol. 11, no. 3, pp. 292–301. DOI: 10.37482/2687-1491-Z155