

Метаболизм популяций лимфоцитов у здоровых детей и пациентов с иммунозависимыми заболеваниями

SCO — краткое сообщение

<https://doi.org/10.53529/2500-1175-2023-2-50-53>**С. В. Петричук, О. В. Курбатова, Д. Г. Купцова, Т. В. Радыгина, Е. В. Фрейдлин**

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, г. Москва, 119991, Ломоносовский пр., 2, стр. 1, Россия

Ключевые слова: иммунометаболизм, лимфоциты, проточная цитометрия, митохондриальные ферменты, дети, воспалительные заболевания кишечника, псориаз.**Для цитирования:** Петричук СВ, Курбатова ОВ, Купцова ДГ, Радыгина ТВ, Фрейдлин ЕВ. Метаболизм популяций лимфоцитов у здоровых детей и пациентов с иммунозависимыми заболеваниями. *Аллергология и иммунология в педиатрии*. 2023; 2: 50–53. <https://doi.org/10.53529/2500-1175-2023-2-50-53>

Metabolism of lymphocyte populations in healthy children and patients with immune-dependent diseases

<https://doi.org/10.53529/2500-1175-2023-2-50-53>**S. V. Petrichuk, O. V. Kurbatova, D. G. Kuptsova, T. V. Radygina, E. V. Freidlin**

National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, 119296, Lomonosovsky prospect, 2, building 1, Russia

Keywords: immuno metabolism, lymphocytes, flow cytometry, mitochondrial enzymes, children, inflammatory bowel diseases, psoriasis.**For citation:** Petrichuk SV, Kurbatova OV, Kuptsova DG, Radygina TV, Freidlin EV. Metabolism of lymphocyte populations in healthy children and patients with immune-dependent diseases. *Allergology and immunology in pediatrics*. 2023; 2: 50–53. <https://doi.org/10.53529/2500-1175-2023-2-50-53>

Иммунометаболизм (ИМ) — новая область исследования процессов метаболизма в клетках врожденного и адаптивного иммунитета. Процессы метаболического перепрограммирования анаэробного гликолиза, окислительного фосфорилирования (ОХРНOS) и синтеза метаболитов при активации иммунных клеток имеют важное значение для регуляции гомеостаза, активации, пролиферации и дифференцировки клеток [1]. Метаболические изменения в ответ на различные стимулирующие сигналы имеют решающее значение при инфекции, воспалении, раке, аутоиммунных заболеваниях и метаболических нарушениях [1]. Известно, что каждый этап иммунного ответа характеризуется определенным метаболическим профилем Т- и В-лимфоцитов [2, 3]. В наивных Т-клетках преобладают процессы ОХРНOS, в пролиферирующих клетках преобладают процессы гликолиза и глутаминолиза. Дифференцировка Т-лимфоцитов связана с активацией разных метаболических путей. Для Th1-, Th2- и Th17-клеток — это гликолиз, а для регуляторных Т-клеток (Treg) — цикл окис-

ления жирных кислот и ОХРНOS [2, 4]. Для оценки метаболических процессов в клетках используют различные методы: проточную цитометрию, масс-спектрометрию, технологию Seahorse и др. [5]. Возникает необходимость разработки диагностических методов оценки метаболизма лимфоцитов в клинической практике для оценки состояния пациентов с иммунозависимыми (ИЗЗ) и метаболическими заболеваниями.

Цель работы — оценить активность митохондриальных дегидрогеназ в основных и малых популяциях лимфоцитов здоровых детей и у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями.

Материалы и методы. Обследовано 96 здоровых детей, 30 детей с атопическим дерматитом (АтД) тяжелого течения, 140 пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК), 210 детей с вульгарным псориазом в возрасте от 6 до 18 лет. Тяжесть заболевания у детей с ВЗК оценивали по индексам PCDAI и PUCAI, с псориазом — PASI. Дети с ВЗК и псориазом обследовали до и на фоне биологической терапии: для ВЗК — анти-TNF препараты (инфликсимаб, ада-

лимумаб), для псориаза — анти-TNF (этанерцепт, адалимумаб) и анти-IL12/23 (устекинумаб). Исследование одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 6 от 11.06.2019), для всех детей было получено письменное информированное согласие родителей.

В популяциях лимфоцитов определяли активность митохондриальных дегидрогеназ: сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ) иммуноцитохимическим (ИЦХ) методом с использованием проточной цитометрии. СДГ — основной фермент цикла Кребса и II этапа ОХРНOS, прочно связанный с внутренней мембраной митохондрий. В цикле трикарбоновых кислот СДГ катализирует окисление янтарной кислоты дофумаровой и позволяет с высокой степенью достоверности судить о функциональной активности митохондрий. Сопряженность гликолиза и цикла Кребса определяли по активности ГФДГ — фермента, отражающего работу глицерофосфатного челночного механизма по транспорту электрон-эквивалентов из цитоплазмы в митохондрии, а также обмен фосфолипидов. ИЦХ метод объединяет иммуфенотипирование лимфоцитов и количественный цитохимический анализ и позволяет определить активность митохондриальных ферментов в выделенных популяциях лимфоцитов [6]. Реакция проводится на пермеабиллизированных клетках лимфоконцентрата. Для фиксации и пермеабиллизации клеток использовали набор Cytofix/Cytoperm (BD, США). Определение активности ферментов проводили согласно рекомендациям разработчиков с использованием наборов для определения СДГ и ГФДГ (НИЦ «Курчатовский институт»-ИРЕА, Россия). Активность ферментов оценивали по соотношению коэффициента бокового светорассеяния (SSC) после и до проведения реакции, умноженного на 100. Активность дегидрогеназ определяли в следующих популяциях лимфоцитов в регионе CD45⁺: Т-лимфоциты (CD3⁺), В-лимфоциты (CD3⁻CD19⁺), НК-клетки (CD3⁻CD16⁺CD56⁺), Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺), цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8⁺), активированные Т-лимфоциты (CD3⁺HLA-DR⁺), Th17-клетки (Th17, CD3⁺CD4⁺CD161⁺), регуляторные Т-лимфоциты (Treg, CD3⁺CD4⁺CD127^{low}), активированные Т-хелперы (Thact — CD3⁺CD4⁺CD127^{high}),

Th2-лимфоциты (CD3⁺CD4⁺CD294⁺), В1-лимфоциты (CD3⁻CD19⁺CD5⁺), В2-лимфоциты (CD3⁻CD19⁺CD5⁻). Исследование выполняли на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 с использованием моноклональных антител производства BeckmanCoulter (США). Статистические расчеты проводили с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). Описательная статистика представлена в виде Me [Q_{0,25}; Q_{0,75}]. Различия считали статистически значимыми при p < 0,05.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований получено, что активность ферментов зависела от популяции клеток и у пациентов с ИЗЗ отражала тяжесть состояния, фазу заболевания и эффективность проводимой терапии. У здоровых детей наибольшая активность СДГ выявлена в популяциях Т-лимфоцитов и составляла 193 [183; 201] у.е. (CD4 — 192 [181; 202]; CD8 — 198 [185–205]), наименьшая — в популяции В-лимфоцитов (149 [138; 160]), в популяции НК-клеток — 182 [174; 198] у.е. Анализ активности СДГ в малых популяциях выявил наибольшую активность в популяции Treg — 203 [189; 213] у.е., наименьшую в популяции В2-лимфоцитов — 145 [134; 156] у.е. Получено, что активность фермента ГФДГ, по которому косвенно можно судить об интенсивности гликолиза в клетках, ниже активности СДГ во всех основных популяциях лимфоцитов, соотношение ферментов ГФДГ/СДГ для Т-лимфоцитов составило 0,78 [0,77; 0,87], для В-лимфоцитов — 0,92 [0,91; 0,95], для НК-клеток — 0,86 [0,85; 0,96]. Наибольший уровень активности ГФДГ выявлен в популяции НК-клеток (175 [148; 183]), который значимо выше, чем в В-лимфоцитах (152 [137; 156]; p = 0,002). Таким образом, полученные нами результаты у здоровых детей подтверждают известные данные [7, 8] о более высоком уровне ОХРНOS в Т-клетках по сравнению с В-лимфоцитами (p = 0,000) и НК-клетками (p = 0,000), при этом в В-клетках активность СДГ достоверно ниже, чем в НК-клетках (p = 0,000). Соотношение ГФДГ/СДГ показывает, что доля гликолиза в НК-клетках и В-лимфоцитах выше, чем в популяции Т-лимфоцитов.

При оценке активности дегидрогеназ в популяциях лимфоцитов у детей с АтД получены существенные отличия состояний «обострение-ремиссия». При обострении заболевания активность СДГ значимо выше, чем в ремиссии,

причем степень повышения зависела от популяции лимфоцитов. Активность СДГ в популяции Т-лимфоцитов в обострении составляла 211 [208; 219], в ремиссии заболевания — 182 [171; 185] ($p=0,000$); в обострении в В-лимфоцитах: 165 [157; 175] против 142 [137; 146] в ремиссии заболевания ($p=0,000$), в обострении в НК-клетках: 203 [190; 210] против 172 [157; 182] в ремиссии заболевания ($p=0,000$). Сравнение показателей активности СДГ у детей с АтД и здоровых показало, что у детей с АтД в стадии обострения показатели достоверно выше по всех популяциях, за исключением Treg. В ремиссии заболевания активность СДГ в субпопуляциях Т-лимфоцитов и в НК-клетках значимо ниже, а в популяции В-лимфоцитов не отличалась от показателей здоровых детей.

Длительный воспалительный процесс у детей с ВЗК приводит к значимому снижению СДГ в Т-лимфоцитах, цитотоксических Т-лимфоцитах, в В- и НК-клетках как в обострении, так и в ремиссии заболевания относительно нормы. Степень снижения СДГ увеличивалась с длительностью заболевания. Активность ГФДГ в основных популяциях лимфоцитов у детей с ВЗК не отличалась от нормативных значений. Получено также, что группа пациентов со стойким положительным ответом на биологическую терапию характеризовалась исходно более высокой активностью СДГ в популяции Treg по сравнению с пациентами, имеющими нестабильный эффект анти-TNF терапии (211 [195; 220] против 198 [186; 210], $p=0,002$). Проведенный ROC-анализ для активности СДГ в популяции Treg показал отличное качество прогностической разделительной модели (AUC 0,820) при пороговом значении СДГ 207 у.е. (чувствительность 67 %, специфичность 88 %).

У детей с вульгарным псориазом выявлено достоверное снижение активности СДГ ($p=0,002$) и ГФДГ ($p=0,007$) в общей популя-

ции лимфоцитов относительно уровня здоровых детей. Снижение СДГ наблюдалось во всех популяциях, за исключением активированных Т-хелперов и В2-лимфоцитов, а снижение активности ГФДГ — в В-лимфоцитах и в НК-клетках. Проведенные исследования показали, что уровень активности ферментов отражает эффективность проводимого лечения. Так, у детей с псориазом на биологической терапии при достижении PASI 75 (хороший эффект) относительно детей с недостаточным эффектом выявлены более высокие уровни активности СДГ в Treg (197 [186; 217] против 188 [178; 201], $p=0,037$) и ГФДГ в Treg (178 [176; 187] против 173 [150; 177], $p=0,031$), а также активности ГФДГ в Т-лимфоцитах (170 [162; 176] против 159 [142; 169], $p=0,001$).

Таким образом, популяции лимфоцитов характеризуются разной активностью митохондриальных дегидрогеназ как у здоровых детей, так и у пациентов с ИЗЗ. Наибольшая активность СДГ выявлена в популяциях Т-лимфоцитов и Treg, наименьшая — в В-лимфоцитах. В популяции НК-клеток получен наибольший уровень активности ГФДГ. Метаболический профиль лимфоцитов отражает тяжесть состояния и эффективность проводимой терапии. Выявлено, что метаболизм Treg является информативным параметром для оценки и прогноза эффективности биологической терапии у детей с ВЗК и псориазом.

Заключение. Применение проточной цитометрии позволило оценить активность митохондриальных дегидрогеназ СДГ и ГФДГ в популяциях лимфоцитов. Интенсивность метаболизма лимфоцитов отражает активность воспалительного процесса и эффективность проводимой терапии у детей с иммунозависимыми заболеваниями.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Chou WC, Rampanelli E, Li X, Ting JP. Impact of intracellular innate immune receptors on immunometabolism. *Cell Mol Immunol.* 2022; 19 (3): 337–351. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00780-y>.
2. Geltink RIK, Kyle RL, Pearce EL. Unraveling the Complex Interplay Between T Cell Metabolism and Function. *Annu Rev Immunol.* 2018; 36: 461–488. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053019>.
3. Fu Y, Wang L, Yu B, Xu D, Chu Y. Immunometabolism shapes B cell fate and functions. *Immunology.* 2022; 166 (4): 444–457. <https://doi.org/10.1111/imm.13499>.
4. Будихина АС, Пашенков МВ. Роль гликолиза в иммунном ответе. *Иммунология.* 2021; 42 (1): 5–20. [Budikhina AS, Pashenkov MV. The role of glycolysis in immune response. *Immunologiya.* 2021; 42 (1): 5–20. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-1-5-20>.

5. Purohit V, Wagner A, Yosef N, Kuchroo VK. Systems-based approaches to study immunometabolism. *Cell Mol Immunol.* 2022; 19 (3): 409–420. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00783-9>.
6. Петричук СВ, Измайлова ТД, Радыгина ТВ. Способ измерения митохондриальной активности лимфоцитов // Патент на изобретение RU 2302635 С1, 10.07.2007. Заявка № 2005141145/15 от 28.12.2005. [Petrichuk SV, Izmailova TD, Radygina TV. Method for measuring the mitochondrial activity of lymphocytes // Patent for invention RU 2302635 C1, 10.07.2007. Application No. 2005141145/15 dated 12/28/2005. (In Russ.)].
7. Vivas-García Y, Efeyan A. The metabolic plasticity of B cells. *Front Mol Biosci.* 2022; 9: 991188. Published 2022 Sep 23. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.991188>.
8. Li F, Liu H, Zhang D, Ma Y, Zhu B. Metabolic plasticity and regulation of T cell exhaustion. *Immunology.* 2022; 167 (4): 482–494. <https://doi.org/10.1111/imm.13575>.