

Определение ферментов гликолиза и окислительного фосфорилирования в лимфоцитах у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями

SCO — краткое сообщение

<https://doi.org/10.53529/2500-1175-2023-2-54-56>**Т. В. Радыгина¹, С. В. Петричук¹, О. В. Курбатова¹, Д. Г. Купцова¹, А. С. Потапов^{1,2}**¹ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва, 119296, Ломоносовский пр., 2, стр. 1, Россия² Первый московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия**Ключевые слова:** окислительное фосфорилирование, гликолиз, лимфоциты, иммунозависимые заболевания.**Для цитирования:** Радыгина ТВ, Петричук СВ, Курбатова ОВ, Купцова ДГ, Потапов АС. Определение ферментов гликолиза и окислительного фосфорилирования в лимфоцитах у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями. *Аллергология и иммунология в педиатрии*. 2023; 2: 54–56. <https://doi.org/10.53529/2500-1175-2023-2-54-56>

Determination of enzymes of glycolysis and oxidative phosphorylation in lymphocytes in patients with immuno-dependent diseases

<https://doi.org/10.53529/2500-1175-2023-2-54-56>**T. V. Radygina¹, S. V. Petrichuk¹, O. V. Kurbatova¹, D. G. Kuptsova¹, A. S. Potapov^{1,2}**¹ National Medical Research Center for Children's Health, 2, str. 1, Lomonosovskiy Pr-t, Moscow, 119296, Russia² Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia**Keywords:** oxidative phosphorylation, glycolysis, lymphocytes, immune-dependent diseases.**For citation:** Radygina TV, Petrichuk SV, Kurbatova OV, Kuptsova DG, Potapov AS. Determination of enzymes of glycolysis and oxidative phosphorylation in lymphocytes in patients with immuno-dependent diseases. *Allergology and immunology in pediatrics*. 2023; 2: 54–56. <https://doi.org/10.53529/2500-1175-2023-2-54-56>

Актуальность

Одним из современных направлений иммунологических исследований является изучение метаболического профиля иммунокомпетентных клеток в зависимости от этапа их дифференцировки и пролиферативной активности. Гликолиз и окислительное фосфорилирование (ОХРНOS) — основные метаболические процессы, обеспечивающие образование АТФ в клетках. Гликолиз генерирует АТФ, но также обеспечивает промежуточные метаболиты, необходимые для построения структур клеток. При антигенной стимуляции иммунных наивных клеток и переходе их в эффекторные клетки с активацией пролиферативного процесса происходит переключение метаболизма покоящихся лимфоцитов с ОХРНOS на аэробный гликолиз [1]. В процессе дифференцировки формируются специализированные популяции Т-лимфоцитов с уникальным метаболическим фенотипом. Для всех субпопуляций активированных CD4⁺-клеток характерно усиление гликолиза.

Кроме того, баланс между синтезом жирных кислот и окислением жирных кислот важен для дифференцировки Th17-лимфоцитов и регуляторных Т-лимфоцитов (Treg). При ревматоидном артрите было показано, что ингибирование гликолиза в Т-лимфоцитах с помощью 2-дезоксиглюкозы приводило к снижению воспалительного процесса [2]. У пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) выявлена повышенная экспрессия HIF-2 α , которая активирует процессы гликолиза в клетках слизистой оболочки кишечника и приводит к повреждению тканей [3].

Цель — оценить процессы гликолиза и ОХРНOS в лимфоцитах пациентов с иммунозависимыми заболеваниями в сравнении с условно-здоровыми детьми.

Материалы и методы

Исследование выполнено у 32 условно-здоровых детей и у 25 пациентов с иммунозависимыми заболеваниями (ИЗЗ) (ВЗК — 15, вульгарный псориаз — 10) в обострении заболевания.

Возраст обследованных детей — от 8 до 18 лет. Исследования выполнены мультиплексным методом на проточном флуориметре Bio-Plex™-200 Protein Assay System (Bio-Rad, США) в лизатах мононуклеарных клеток с использованием коммерческого набора Human Oxidative Phosphorylation (OXPHOS) Magnetic Bead Panel (Merck, Германия). Популяции Т- и В-лимфоцитов получали после сортировки общей популяции лимфоцитов на микрофлюидном клеточном сортере SH800 (Sony Biotechnology, Япония). Лизаты мононуклеаров получали по стандартной методике с использованием ингибиторов протеаз и фосфатаз. Детекцию белковых комплексов ОХРНOS, NNT и ферментов гликолиза в лизатах клеток определяли по интенсивности флуоресценции с нормированием на количество белка в пробе (IF). Количественное определение содержания белка проводили с использованием бицинониновой кислоты (BCA protein reaction kit; Sigma, США) по методу Пола Смита. Определяли количество апофермента в комплексах ОХРНOS: НАДФ-убихинон оксидоредуктазы (комплекс I), сукцинат убихинон оксидоредуктазы (комплекс II), убихинон цитохром С оксидоредуктазы (комплекс III), цитохром С оксидазы (Комплекс IV), АТФ синтазы (комплекс V) и интегрального белка внутренней мембраны митохондрий — никотинамид нуклеотид трансгидрогеназы (NNT). Гликолиз оценивали по количеству 7 белков: ENO1 (енолаза 1), G6PI (глюкозо-6-фосфат изомеразы), HIF-1 α (гипоксия-индуцируемый фактор 1- α), LDHA (α -цепь L-лактат дегидрогеназы), LDHB (β -цепь L-лактат дегидрогеназы), РКМ2 (M2-изоформа пируваткиназы), ТКТ (транскетолаза). Для всех пациентов было получено информированное добровольное согласие родителей и детей старше 14 лет в соответствии с Хельсинкской декларацией. Статистическая обработка результатов была выполнена с помощью пакета Statistica 10.0 (StatSoft, США). Описательная статистика количественных признаков представлена в формате: медиана (нижние и верхние квартили) — Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна — Уитни. Корреляционный анализ проводился с использованием коэффициента корреляции Пирсона (r). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При сравнении интенсивности флуоресценции белков последовательных этапов ОХРНOS наиболее высокие значения были получены для I комплекса — 1,11 [0,9–1,31]. Этот показатель был принят за 100 % для дальнейшей сравнительной оценки остальных ферментных комплексов дыхательной цепи. IF II комплекса составлял 0,79 [0,57–1,04] у. е. (66 % от IF комплекса I; $p = 0,0002$), IF III комплекса — 0,71 [0,37–1,09] у. е. (63 % от IF комплекса I; $p = 0,037$), IV комплекса — 0,54 [0,26–1,33] у. е. (52 % от IF комплекса I; $p = 0,404$). Получено также, что для АТФ синтазы (комплекс V) уровень IF был самый низкий — 0,23 [0,14–0,30] у. е. (22 % от IF комплекса I; $p = 4 * 10^{-6}$). Выявлены прямые корреляционные зависимости между IF комплексов I и II ($R = 0,68$; $p = 0,005$), а также между IF цитохром С оксидазы и белком NNT ($R = 0,87$; $p = 1 * 10^{-7}$). При оценке белков гликолиза наибольшая интенсивность IF в группе условно-здоровых детей выявлена для ТКТ, G6PI, LDHB. Сравнение пациентов с ИЗЗ относительно здоровых детей показало значимое снижение белков ОХРНOS: I комплекса на 28 % ($p = 0,002$), II комплекса на 56 % ($p = 5 * 10^{-5}$), III комплекса на 49 % ($p = 0,009$). При этом у детей с ИЗЗ выявлено достоверное увеличение IF белков гликолиза: G6PI на 18 % ($p = 0,024$), HIF-1 на 51 % ($p = 0,012$), ТКТ на 29 % ($p = 3 * 10^{-5}$). Для РКМ2 выявлено снижение IF на 69 % ($p = 0,004$).

Таким образом, в стадии обострения у пациентов с ИЗЗ выявлено снижение белков I–III комплексов ОХРНOS при увеличении белков G6PI (начальный этап гликолиза), транскетолазы (активация пентозофосфатного цикла), снижение РКМ2 (конечный этап гликолиза). Необходимо отметить существенное увеличение гипоксия-индуцируемого фактора 1- α у пациентов с ИЗЗ.

В связи с тем, что Т- и В-лимфоциты имеют разный метаболический профиль, на следующем этапе работы сравнили процессы ОХРНOS и гликолиза у пациентов с ИЗЗ в состоянии обострения и в группе условно-здоровых детей. В группе сравнения получено, что процессы ОХРНOS превалируют в Т-лимфоцитах по сравнению с В-лимфоцитами: в I комплексе на 8 % ($p = 0,01$), IV комплексе на 74 % ($p = 0,02$), V комплексе на 11 % ($p = 0,01$) и для белка NNT на 83 % ($p = 0,001$). В среднем увеличение показателя IF составляло 2,97 раз. При оценке гликолиза условно-здоровых детей оказалось, что по-

казатель IF в Т-лимфоцитах достоверно выше для всех ферментов по сравнению с В-лимфоцитами за исключением белков ENO1 и HIF1 α . Наибольшее соотношение IFТ/IFВ наблюдалось для G6PI (в 32 раза) и для ТКТ (в 9,4 раза). Прева-лирование гликолиза в В-лимфоцитах относительно Т-лимфоцитов наблюдалось только для белка HIF-1 α в 2,4 раза ($p=0,038$). Соотношение ферментов ОХРНOS у пациентов с ИЗЗ между Т- и В-лимфоцитами соответствовало таковым у условно-здоровых пациентов за исключением увеличения белков III комплекса ($p=0,03$). Что касается процессов гликолиза, у пациентов с ИЗЗ было существенно увеличено количество белка ENO1 в 4,1 раза ($p=0,03$) и белка HIF1 в 4,3 раза ($p=0,03$). Сравнение метаболических процессов пациентов с ИЗЗ и здоровых детей в Т-лимфоцитах показало существенное увеличение всех белков гликолиза за исключением ENO1 и HIF1 (в среднем в 3,2 раза) при увеличении IV комплекса ОХРНOS (цитохром С оксидазы, $p=0,004$). Сравне-

ние метаболических процессов пациентов с ИЗЗ и здоровых детей в В-лимфоцитах также показало существенное увеличение всех белков гликолиза в среднем в 6,4 раза и увеличение всех комплексов ОХРНOS (в среднем в 6,7 раза).

Заключение

Таким образом, комплексная оценка процессов окислительного фосфорилирования и гликолиза у пациентов с иммунозависимыми заболеваниями в состоянии обострения показала существенное увеличение процессов гликолиза как в Т-, так и в В-лимфоцитах. Кроме того, в В-лимфоцитах были существенно повышены процессы ОХРНOS. Выявленные нами закономерности согласуются с изменением метаболических процессов, описанных при активации Т- и В-клеток [1, 4]. Изучение метаболических процессов в лимфоцитах при различных иммунозависимых заболеваниях открывает возможности обоснования и внедрения таргетной терапии для контроля патологического процесса.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. 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>.
2. Abboud, G, Choi SC, Kanda N, Zeumer-Spataro L, Roopenian DC, & Morel L. Inhibition of Glycolysis Reduces Disease Severity in an Autoimmune Model of Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in immunology*, 2018; 9: 1973. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01973>.
3. Xu X, Gnanaprakasam JNR, Sherman J and Wang R. A Metabolism Toolbox for CAR T Therapy. *Front. Oncol.* 2019; 9: 322. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00322>.
4. 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>.