

*На правах рукописи*

ВЛАСОВА ВИОЛЕТТА ВИКТОРОВНА

**ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА CD4<sup>+</sup> Т-ЛИМФОЦИТОВ  
ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИЦ, ПРИНИМАЮЩИХ  
АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ**

3.2.7. Иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Екатеринбург – 2025

Работа выполнена на базе «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской Академии Наук» - филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской Академии Наук («ИЭГМ УрО РАН»).

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, доцент

**Сайдакова Евгения Владимировна**

**Официальные оппоненты:**

**Конькова-Рейдман Алена Борисовна**, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры инфекционных болезней Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Бобкова Марина Ридовна**, доктор биологических наук, главный специалист лаборатории биологии лентивирусов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова»

**Ведущая организация:**

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.063.01 на базе ФГБУН Института иммунологии и физиологии УрО РАН по адресу: 620078, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН по адресу: 620078, г. Екатеринбург, ул. Софьи Ковалевской/Академическая, 22/20 и на сайте ИИФ УрО РАН (<http://iip.uran.ru>), с авторефератом – там же и на сайте ВАК РФ (<http://vak2.ed.gov.ru>).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 24.1.063.01,  
кандидат биологических наук

Ю.А. Журавлёва

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.** Инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), проявляется постепенным разрушением иммунной системы, при этом наибольший ущерб приходится на субпопуляцию CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Дефицит CD4<sup>+</sup> Т-клеток, формирующийся при ВИЧ-инфекции, приводит к развитию синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) и снижению защитных свойств организма. По данным ЮНЭЙДС, с начала эпидемии ВИЧ от СПИД-ассоциированных заболеваний умерло не менее 40 миллионов человек (UNAIDS Fact Sheet 2023, Global Statistics / UNAIDS // Fact Sheet. 2023). Единственным эффективным средством контроля ВИЧ-инфекции является высокоактивная антиретровирусная терапия (АРТ), подавляющая репликацию вируса в организме. Как правило, применение АРТ приводит не только к снижению вирусной нагрузки, но и к восстановлению численности CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, что определяет сокращение риска клинических проявлений и смерти.

Применение АРТ обнажило серьезную проблему: у части пациентов (по различным данным от 10 до 40 %) численность CD4<sup>+</sup> Т-клеток восстанавливается слабо и сохраняется низкой на протяжении всего периода вирусологически эффективного лечения. Для описания данной клинической группы используют термин «иммунологические неответчики» (ИН). Иммунологический «неответ» на лечение, также называемый дискордантным ответом, как правило, связан с повышенным риском развития СПИД-ассоциированных и СПИД-неассоциированных заболеваний, а также уменьшением продолжительности жизни ВИЧ-инфицированных больных. Существенное снижение качества и продолжительности жизни ИН обуславливает актуальность изучения проблемы дискордантного ответа на АРТ. Развитие иммунологического неответа на АРТ связывают с целым рядом факторов – высокой вирусной нагрузкой до начала лечения, пожилым возрастом, коинфекцией вирусом гепатита С, длительным бесконтрольным течением инфекции и поздним началом терапии. Другими словами, дискордантный иммунологический ответ на АРТ может быть спровоцирован множеством разнообразных причин, при этом их объединяет отсутствие восполнения численности CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в организме.

В основе восстановления количества клеток любой популяции лежит процесс регенерации. При ВИЧ-инфекции источником регенерации в субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов являются клетки памяти (*Lederman M.M. et al., 2011*). Такие клетки имеют

низкий порог активации и достигают пика экспансии быстрее наивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Тем не менее, у ИИ высокая митотическая активность CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти не приводит к восполнению численности CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и часто завершается гибелью пролиферирующих клеток. Способность Т-лимфоцитов к делению в значительной степени зависит от активности их метаболизма, поскольку при митозе обменные процессы должны быть адаптированы к биосинтезу энергии и макромолекул. Ранее было показано, что у ИИ, при их сравнении с пациентами, давшими стандартный ответ на лечение, и здоровыми людьми, в делящихся CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах памяти существенно снижена экспрессия генов, обеспечивающих эффективное функционирование митохондрий (*Younes S.-A. et al., 2018*). Кроме того, было показано, что CD4<sup>+</sup> Т-клетки ИИ демонстрируют признаки истощения, для которого характерно угнетение анаболизма (*Shive C.L. et al., 2021*). Эти данные указывают на то, что у ИИ метаболизм регенерирующих CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти может быть нарушен. Тем не менее, данная гипотеза пока не получила фактического подтверждения.

**Цель исследования** – установить особенности метаболизма CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов ВИЧ-инфицированных людей с различной эффективностью восстановления иммунитета в ответ на высокоактивную антиретровирусную терапию.

#### **Задачи исследования**

1. Определить особенности метаболизма наивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на антиретровирусную терапию в состоянии покоя и при пролиферации.

2. Оценить потребление глюкозы и жирных кислот, экспрессию транспортера ASCT2 и уровень аутофагии в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах ВИЧ-инфицированных больных с дискордантным ответом на антиретровирусную терапию.

3. Охарактеризовать энергетический профиль CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на лечение путем определения интенсивности гликолиза и окислительного фосфорилирования.

4. Определить наличие связи между метаболическими свойствами, уровнем пролиферации и степенью истощения CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов памяти у ВИЧ-инфицированных больных с дискордантным ответом на антиретровирусную терапию.

**Научная новизна.** Впервые установлены метаболические характеристики CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти, обеспечивающие их приоритетное значение в регенерации CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Впервые показано, что при ВИЧ-инфекции низкая эффективность

регенерации связана с метаболическими нарушениями в CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти. Впервые установлено несоответствие между повышенным потреблением экзогенных и эндогенных субстратов и низкой биоэнергетической активностью CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков. Впервые показано, что нарушение метаболизма CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти при иммунологическом неответе на АРТ связано с истощением пролиферирующих клеток.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Теоретическая значимость проведенного исследования заключается в установлении связи между метаболизмом CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и их пролиферативным и регенераторным потенциалом. Показано, что метаболизм CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти в организме ИН изменен: вопреки активному потреблению субстратов скорость аэробного гликолиза и окислительного фосфорилирования митохондрий в таких клетках существенно снижена. Выявленные метаболические нарушения развиваются на фоне истощения CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов памяти в организме ИН. Полученные данные расширяют представление о механизмах, препятствующих продуктивной пролиферации CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти у ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на терапию, а также обозначают необходимость дальнейшего исследования клеточного цикла и метаболизма данных клеток. Практическая значимость проведенного исследования заключается в том, что полученные данные могут служить основой для своевременного выявления ВИЧ-инфицированных больных, склонных к формированию иммунологического неответа на лечение, на основании функционального состояния митохондрий CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на антиретровирусную терапию приспособлены к пролиферации больше, чем наивные CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты благодаря меньшему масштабу метаболической перестройки, необходимой для деления.
2. При дискордантном ответе на антиретровирусную терапию CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти ВИЧ-инфицированных пациентов потребляют больше метаболических субстратов и содержат больше аутофагосом, чем при стандартном ответе на терапию и в отсутствие ВИЧ-инфекции.
3. При нарушении регенерации CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных больных, получающих антиретровирусную терапию, CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти демонстрируют низкую интенсивность гликолиза и окислительного фосфорилирования.

4. В  $CD4^+$  Т-клетках памяти иммунологических неответчиков метаболические изменения связаны с активной пролиферацией и высокой степенью истощения этой клеточной субпопуляции.

**Методология и методы исследования.** Для решения поставленных задач были обследованы три клинические группы: 1) ВИЧ-инфицированные иммунологические неответчики – ИН (n=18, содержание  $CD4^+$  Т-лимфоцитов в периферической крови менее 350/мкл после двух и более лет АРТ); 2) ВИЧ-позитивные иммунологические ответчики – ИО (n=21, содержание  $CD4^+$  Т-лимфоцитов в крови более 350/мкл после двух и более лет АРТ); 3) Контроль – К (n=22, здоровые люди без ВИЧ-инфекции).

Субпопуляционный состав Т-клеток периферической крови, а также уровень пролиферации и истощения  $CD4^+$  Т-лимфоцитов оценивали по экспрессии специфических маркеров путем их детекции антителами методом многоцветной проточной цитофлуориметрии. Активность захвата глюкозы  $CD4^+$  Т-клетками определяли по интенсивности потребления ее флуоресцентного аналога – 2-(7-Нитро-2,1,3-бензоксадиазол-4-ил)-D-глюкозамина (2-NBDG). Способность  $CD4^+$  Т-клеток захватывать жирные кислоты из внеклеточной среды тестировали по интенсивности потребления флуоресцентного аналога пальмитиновой кислоты (BODIPY FL C16). Способность  $CD4^+$  Т-лимфоцитов потреблять нейтральные аминокислоты, включая глутамин, устанавливали по экспрессии транспортера ASCT2. Уровень аутофагии оценивали по окрашиванию клеток производным монодансилкадаверина. Активность основных энергетических путей – гликолиза и окислительного фосфорилирования – в  $CD4^+$  Т-лимфоцитах памяти тестировали методом анализа внеклеточных потоков на анализаторе Seahorse XF. Обработку данных осуществляли методами непараметрической статистики.

**Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора.** Достоверность результатов подтверждается проведением всех этапов работы с использованием современных методов исследования, сертифицированного оборудования, реагентов и расходных материалов. Сформулированные в тексте диссертации выводы основаны на фактических результатах, проиллюстрированных графиками. Статистический анализ данных проведен с использованием современных методик обработки данных с помощью прикладных компьютерных программ MS Office Excel, (Microsoft, США) и GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, США).

Результаты диссертационной работы были представлены на Всероссийских и международных научных конференциях: всемирная конференция «IAS 2021 – the 11th IAS Conference on HIV Science» (Берлин, 18-21 июля 2021 года); научная конференция с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования» (Пермь, 18-20 октября 2021 года); V Всероссийская научно-практическая конференция молодых учёных с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты в медицине и биологии» (Иркутск, 27-28 октября 2022 года); XVII Всероссийский научный форум с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни Иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 5-8 июня 2023 года); X Юбилейный Всероссийский форум молодых исследователей «ХимБиоSeasons 2024» (Калининград, 12-19 апреля 2024 года).

Автор лично участвовал в каждом этапе диссертационного исследования. Основная идея, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, цели и задач, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования проводились совместно с научным руководителем д.б.н. Сайдаковой Евгенией Владимировной. Анализ современной отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме проведен лично диссертантом. Работа с пациентами Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями выполнялась при участии врача-иммунолога д.м.н. Шмагель Надежды Геннадьевны. Экспериментальные исследования были выполнены совместно с сотрудниками лаборатории экологической иммунологии «ИЭГМ УрО РАН». Статистическая обработка первичных данных, интерпретация и анализ полученных результатов, написание и оформление рукописи диссертации осуществлялись соискателем лично.

**Внедрение результатов исследования в практику.** Материалы диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» (614068, г. Пермь, ул. Букирева, 15) по дисциплинам «Иммунология» и «Механизмы иммунитета», а также внедрены в научно-исследовательскую деятельность лаборатории молекулярной иммунологии «ИЭГМ УрО РАН» (614081, г. Пермь, ул. Голева, 13).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 8 – в научных журналах, которые включены в Перечень ВАК по специальности 3.2.7.

Иммунология, биологические науки, и/или индексируются в международных базах Web of Science, Scopus, RSCI.

**Структура и объем диссертации.** Работа изложена на 156 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов исследования, выводов, списка сокращений и списка литературы. Список литературы включает 423 источника, из них 27 источников на русском языке, 396 – на английском. Работа проиллюстрирована 30 рисунками и двумя таблицами.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

План исследования и форма информированного согласия пациентов были утверждены этическим комитетом ГКУЗ «Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» (рег. № комитета IRB00008964). Все обследованные пациенты были ознакомлены с целью и задачами исследования, и подписали форму информированного согласия. В исследование были включены ВИЧ-инфицированные субъекты, получающие АРТ более двух лет (вирусная нагрузка <50 копий/мл). В зависимости от эффективности иммунологического ответа ВИЧ-инфицированные больные, получающие АРТ, были распределены в две клинические группы: 1) иммунологические неответчики (ИН; число CD4<sup>+</sup> Т-клеток в крови < 350/мкл); 2) иммунологические ответчики (ИО; содержание CD4<sup>+</sup> Т-клеток в крови > 350/мкл). В контрольную группу (К) вошли неинфицированные ВИЧ добровольцы, давшие письменное согласие на участие в исследовании. Группы ВИЧ-инфицированных пациентов были сопоставимы по полу, возрасту, вирусной нагрузке ВИЧ, числу CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов перед началом АРТ, продолжительности инфекции и длительности терапии ( $p < 0,05$ ).

*Получение биологического материала.* Кровь забирали натощак в пробирки типа «Vacutainer». Численность CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов оценивали с использованием коммерческого набора Simultest™ IMK-Lymphocyte (Becton Dickinson, США) на проточном цитофлюориметре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Вирусную нагрузку ВИЧ определяли посредством разветвленной ДНК-гибридизации наборами «Versant HIV-1 RNA 3,0 assay b» на анализаторе Versant 440 (Siemens, Германия) согласно инструкции производителя. Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования периферической крови в градиенте плотности Диаколл (1,077 г/мл,

Диаэм, Россия). Образцы подвергали контролируемому замораживанию до  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение суток в среде, содержащей 90 % инактивированной теплом эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Biowest, Франция) и 10 % диметилсульфоксида (AppliChem, Германия), после чего помещали в жидкий азот для длительного хранения. Перед проведением исследования клетки размораживали при  $+37^{\circ}\text{C}$  [8].

*Определение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов.* Анализ мононуклеарных клеток периферической крови проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Жизнеспособные клетки выделяли по отсутствию окрашивания витальным флуоресцентным красителем Zombie UV Fixable Viability Kit (Biolegend, США). При определении  $\text{CD4}^+$  Т-лимфоцитов и оценке их субпопуляционного состава использовали анти- $\text{CD3-PE-Dazzle594}$ , анти- $\text{CD4-PE-Fire780}$  (Biolegend, США) и анти- $\text{CD45RO-APC-eFluor780}$  (Invitrogen, США) антитела. Определяли наивные  $\text{CD4}^+$  Т-клетки ( $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD45RO}^-$ ) и клетки памяти ( $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD45RO}^+$ ).

*Определение пролиферирующих и истощенных клеток.* При оценке количества делящихся  $\text{CD4}^+$  Т-лимфоцитов применяли флуоресцентные антитела к ядерному белку Ki-67. Клетки, окрашенные поверхностными антителами и витальным красителем, фиксировали в буфере, содержащем формальдегид (Invitrogen, США). Обработанные клетки осаждали центрифугированием, дважды отмывали в пермеабилизирующем буфере (Invitrogen, США) и окрашивали анти-Ki-67-BV786 антителами (Becton Dickinson, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. При оценке метаболических свойств  $\text{CD4}^+$  Т-клеток для определения делящихся лимфоцитов использовались анти- $\text{CD71-AF700}$  (Invitrogen, США) антитела. Истощенные элементы в пуле  $\text{CD4}^+$  Т-лимфоцитов определяли по поверхностной экспрессии ингибиторных рецепторов PD-1 и TIGIT. Для этого мононуклеарные клетки, предварительно окрашенные фенотипическими антителами, инкубировали в присутствии анти-TIGIT-FITC (Invitrogen, США) и анти-PD-1-Pacific Blue (Biolegend, США) антител. Здесь и далее интенсивность флуоресценции измеряли на проточном цитофлуориметре.

*Измерение потребления глюкозы.* Потребление глюкозы оценивали с использованием ее флуоресцентного аналога – 2-NBDG. Этот метод имеет ограничения: 2-NBDG способен проникать в лимфоциты мыши в присутствии ингибиторов транспортеров глюкозы Glut1 и Glut3 (Sinclair L. V et. al., 2020). В этом ключе наиболее вероятным механизмом проникновения 2-NBDG в Т-лимфоциты является

трансмембранный перенос через транспортер Glut2, экспрессируемый на поверхности активированных наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти (*Fu H. et al., 2023*)

Образцы, окрашенные поверхностными антителами и витальным красителем Zombie UV, инкубировали в среде, содержащей 80 мкМ флуоресцентного аналога глюкозы 2-NBDG (Abcam, Великобритания) при +37°C в течение 15 мин. Затем клетки двукратно отмывали в 1 мл DPBS/1 % BSA центрифугированием (1000 g, 3 мин).

*Измерение потребления жирных кислот.* К клеткам, окрашенным поверхностными антителами и витальным красителем Zombie UV, вносили раствор DPBS/1 % BSA, содержащий флуоресцентный аналог пальмитиновой кислоты BODIPY FL C16 (Invitrogen, США) в конечной концентрации 50 нМ. Образцы инкубировали 15 мин при комнатной температуре, затем дважды отмывали в 1 мл DPBS/1 % BSA центрифугированием (1000 g, 3 мин).

*Определение уровня экспрессии транспортера глутамин.* Образцы, окрашенные поверхностными антителами и витальным красителем Zombie UV, фиксировали и пермеабелизировали с использованием набора True-Nuclear Transcription Factor Buffer Set (BioLegend, США) согласно инструкции производителя. Обработанные клетки инкубировали в 100 мкл пермеабелизирующего буфера, содержащего первичные анти-ASCT2 антитела (Abcam, Великобритания), в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем образцы окрашивали вторичными анти-IgG-AF405 антителами (Abcam, Великобритания) в течение 30 мин при комнатной температуре.

*Определение уровня аутофагии.* Содержание аутофагосом определяли с использованием коммерческого набора Autophagy Detection Kit (Abcam, Великобритания). Образцы, окрашенные поверхностными антителами и витальным красителем Zombie UV, осаждали центрифугированием (1000 g, 3 мин), затем ресуспендировали в 250 мкл раствора Хэнкса, содержащего 5 % ЭТС. В каждый образец вносили 250 мкл флуоресцентного реагента Green Detection Reagent и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте.

*Анализ внеклеточных потоков (англ. Extracellular Flux Analysis).* CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты памяти выделяли методом магнитной сепарации с использованием коммерческого набора Memory CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Германия) согласно инструкции производителя. Изолированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти ресуспендировали в среде XF RPMI Medium (Agilent Technologies, США), содержащей 10 мМ глюкозы (Sigma-Aldrich, США), 2 мМ глутамин (Диа-М, Россия) и 1 мМ

пирувата натрия (Sigma-Aldrich, США) и вносили по  $2,5 \cdot 10^5$  клеток в лунки планшета (Agilent Technologies, США), предварительно обработанные поли-D-лизином (50 мкг/мл, Sigma, США). Активность митохондриального дыхания и гликолиза определяли с использованием анализатора Seahorse XFe96 (Agilent Technologies, США) по показателям скорости потребления кислорода (*англ.* oxygen consumption rate – OCR) и скорости ацидификации среды (*англ.* extracellular acidification rate – ECAR) соответственно. Измерения производили на базальном уровне, после 40 мин стимуляции фитогемагглютинином (ФГА, 15 мкг/мл, Serva, Германия) и последовательного внесения ингибиторов дыхательной цепи митохондрий. В качестве ингибиторов использовали олигомицин в конечной концентрации 2,5 мкМ, карбонилцианид-4-(трифлуорометокси)фенилгидразон (FCCP; 2 мкМ), ротенон и антимицин А (Р/АА; 0,5 мкМ) [6]. Вышеперечисленные реагенты были получены в Agilent Technologies, США.

*Статистический анализ данных.* Статистический анализ полученных данных проводили непараметрическими методами. В выборках рассчитывали медиану, интерквартильный размах (25-75 перцентили) и 10-90 %-ые интервалы. Значимость различий между группами устанавливали с помощью U-критерия Манна-Уитни и однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки. Корреляционный анализ выполняли методом Спирмена.

### **Результаты собственных исследований и их обсуждение**

По данным экспрессии молекул CD71 и Ki-67 установлено, что в обеих группах ВИЧ-инфицированных больных по сравнению со здоровыми лицами повышена доля пролиферирующих CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов ( $p_{ин-к} < 0,01$ ,  $p_{ио-к} < 0,05$ ). Наибольшее количество делящихся клеток было зафиксировано у ИН ( $p_{ио-ин} < 0,05$ ). Полученные данные указывают на запуск регенераторных процессов среди CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов ВИЧ-инфицированных пациентов.

Показано, что в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках митотическая активность незначительна. Содержание CD71-позитивных наивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у ИН составило 1,5 % (1,0-2,5 %), у ИО – 1,5 % (1,1-2,1 %), у К – 0,9 % (0,7-1,1 %). Процентное содержание Ki-67-позитивных наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток также было низким: у ИН – 1,4 % (0,7-1,7 %), у ИО – 0,9 % (0,7-1,2 %), у К – 0,9 % (0,5-1,2 %). У ИН доля пролиферирующих наивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов была выше, чем у неинфицированных субъектов ( $p < 0,05$ ). В субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти относительное количество пролиферирующих элементов было многократно выше, чем среди наивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Так, на

долю CD71-позитивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти у ИИ приходилось 10,3 % (9,2-12,7 %), у ИО – 9,1 % (8,3-10,6 %), у К – 7,6 % (6,5-8,9 %). Доля Ki-67<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов памяти у ИИ составила 6,0 % (5,2-7,9 %), у ИО – 5,2 % (4,4-6,2 %), у К – 4,3 % (3,2-4,6 %). По обоим показателям относительное количество пролиферирующих CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти у ИИ было наибольшим и статистически значимо превышало значения ИО ( $p < 0,05$ ) и К ( $p < 0,001$ ). Полученные данные указывают на то, что основным источником регенерации в субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов являются клетки памяти. При анализе связи между абсолютной численностью CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в периферической крови и показателями пролиферации CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти была установлена негативная корреляционная зависимость с долей CD71-позитивных ( $R = -0,420$ ,  $p = 0,023$ ) и Ki-67-позитивных элементов ( $R = -0,441$ ,  $p < 0,014$ ). Взаимосвязи между делением наивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и количеством CD4<sup>+</sup> Т-клеток в крови не обнаружено.

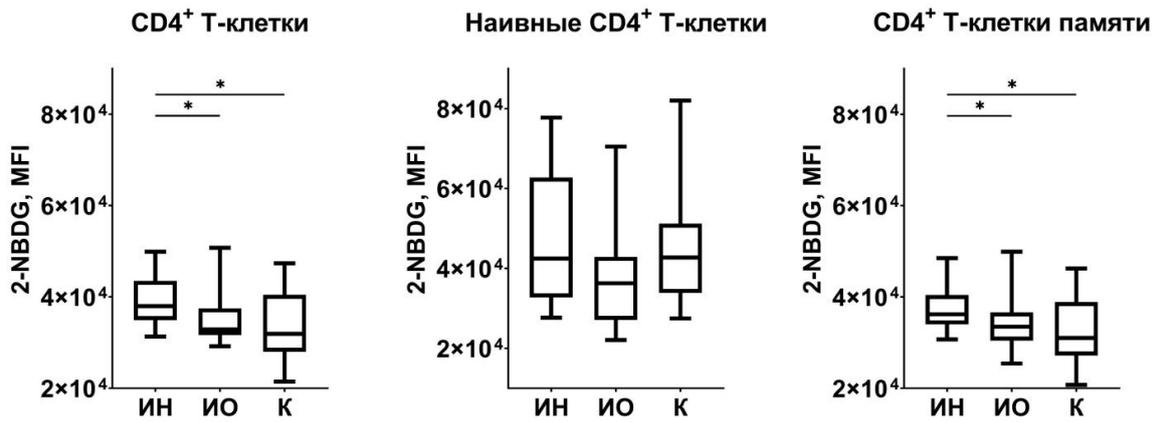
Метаболизм играет ключевую роль в поддержании пролиферации CD4<sup>+</sup> Т-клеток [4]. Однако особенности метаболизма CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов памяти при делении остаются малоизученными. Мы оценили использование экзогенных и эндогенных углеродных субстратов наивными CD4<sup>+</sup> Т-клетками и клетками памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков и здоровых доноров в покое и при пролиферации и показали следующее [3]. Покоящиеся CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты памяти поглощали значительно больше глюкозы ( $p < 0,001$ ) и жирных кислот ( $p < 0,001$ ), а также содержали больше аутофагосом ( $p < 0,001$ ) по сравнению с покоящимися наивными клетками. Уровни экспрессии транспортера нейтральных аминокислот ASCT2 между субпопуляциями не отличались ( $p > 0,05$ ).

В пролиферирующих CD4<sup>+</sup> Т-клетках утилизация экзогенных и эндогенных субстратов была активнее, чем в покоящихся элементах ( $p < 0,001$ ). У иммунологических неответчиков интенсивность поглощения субстратов при вступлении наивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в деление увеличивалась значительно (до 118 % в случае глюкозы, на 25 % для пальмитиновой кислоты и на 24 % для аутофагии). В то время как показатели CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти изменялись не так выражено (глюкоза – 19 %, пальмитиновая кислота – 11 %, аутофагия – 8 %). Таким образом, покоящиеся CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти характеризуются повышенной метаболической активностью: они потребляют больше глюкозы и жирных кислот, и содержат больше аутофагосом, чем наивные клетки. Для вступления в пролиферацию CD4<sup>+</sup> Т-клеткам памяти достаточно небольшой метаболической перестройки и незначительного усиления потребления экзогенных и

эндогенных метаболических субстратов. Из этого следует, что ведущая роль  $CD4^+$  Т-лимфоцитов памяти в регенерации  $CD4^+$  Т-клеток может быть обусловлена способностью быстро адаптироваться к метаболическим потребностям, сопутствующим делению.

Для определения роли метаболизма в восстановлении численности  $CD4^+$  Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных больных, получающих АРТ, мы измерили потребление глюкозы, жирных кислот и уровень аутофагии в пуле  $CD4^+$  Т-клеток трех клинических групп [10]. Установлено, что количество поглощенной глюкозы возрастало в порядке  $K \rightarrow IO \rightarrow IH$ . Это утверждение справедливо как для наивных  $CD4^+$  Т-лимфоцитов, так и для клеток памяти.  $CD4^+$  Т-клетки ИИ потребляли значительно больше субстрата, чем клетки К ( $p < 0,01$ ) и ИО ( $p < 0,05$ ). При этом, как наивные  $CD4^+$  Т-лимфоциты, так и  $CD4^+$  Т-клетки памяти ИИ захватывали существенно больше глюкозы, чем аналогичные клетки здоровых доноров ( $p_{\text{наивные}} < 0,01$ ;  $p_{\text{памяти}} < 0,05$ ). Из вышесказанного следует, что при ВИЧ-инфекции активность захвата глюкозы  $CD4^+$  Т-лимфоцитами существенно возрастает и достигает максимума у ИИ [2].

Во всех клинических группах количество глюкозы, потребляемой  $CD4^+$  Т-клетками, коррелировало с уровнем экспрессии рецептора CD71 на их поверхности. Наиболее сильная связь между двумя показателями была установлена в группе ИИ ( $R = 0,662$ ;  $p < 0,01$ ). Делящиеся  $CD4^+$  Т-клетки ИИ поглощали значительно больше глюкозы, чем пролиферирующие  $CD4^+$  Т-лимфоциты других групп (рисунок 1;  $p_{\text{ИИ-ИО}} < 0,05$ ,  $p_{\text{ИИ-К}} < 0,05$ ). При этом усиленный захват глюкозы был характерен исключительно для пролиферирующих  $CD4^+$  Т-клеток памяти ИИ, но не для делящихся наивных клеток. Другими словами,  $CD4^+$  Т-лимфоциты памяти неинфицированных субъектов способны поддерживать процессы пролиферации с меньшим потреблением глюкозы, чем  $CD4^+$  Т-клетки памяти ИИ. Полученные данные указывают на то, что в  $CD4^+$  Т-лимфоцитах памяти ИИ метаболические процессы, поддерживающие пролиферацию, могут быть недостаточно эффективны.

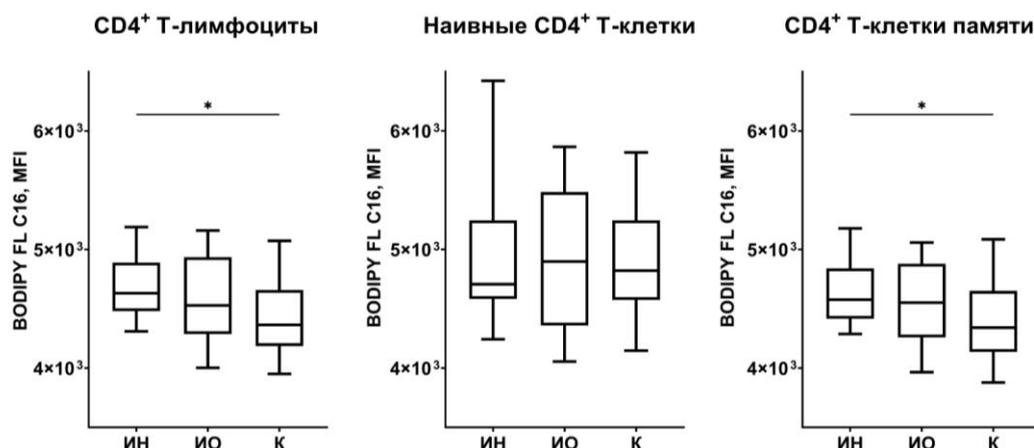


**Рисунок 1 – Потребление аналога глюкозы (2-NBDG) делящимися CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами иммунологических неответчиков (ИН, n=18), иммунологических ответчиков (ИО, n=21) и здоровых добровольцев (К, n=22)**

Представлены медианы, интерквартильные размахи и 10-90 %-ые перцентили. \* –  $p < 0,05$  (ANOVA; критерий Тьюки). MFI: *англ.* Mean Fluorescence Intensity – средняя интенсивность флуоресценции.

На низкую эффективность метаболических процессов в CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти ИН указывает и наличие обратной корреляционной зависимости между интенсивностью захвата глюкозы пролиферирующими CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами памяти и абсолютной численностью CD4<sup>+</sup> Т-клеток в крови ( $R = -0,348$ ,  $p = 0,037$ ). Связи между уровнем потребления глюкозы делящимися наивными CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами и абсолютным количеством CD4<sup>+</sup> Т-клеток в крови установлено не было.

Объем потребления пальмитиновой кислоты CD4<sup>+</sup> Т-клетками, полученными от пациентов трех клинических групп, существенно отличался. CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты ИН потребляли больше пальмитиновой кислоты, чем клетки К ( $p < 0,01$ ). Отличия между здоровыми людьми и ИН были обнаружены как в пуле наивных клеток ( $p < 0,01$ ), так и среди клеток памяти ( $p < 0,01$ ). Делящиеся CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты ИН отличались от таковых здоровых людей повышенным потреблением пальмитиновой кислоты ( $p < 0,05$ ; рисунок 2). Как и в случае с глюкозой, отличия были обусловлены усиленным потреблением пальмитата в субпопуляции делящихся CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти ( $p < 0,05$ ). В субпопуляции пролиферирующих наивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов статистически значимых отличий между ИН и К обнаружено не было ( $p > 0,05$ ). Полученные данные позволяют заключить, что CD4<sup>+</sup> Т-клеткам памяти ИН для регенерации требуется существенно больше экзогенных жирных кислот, чем клеткам неинфицированных субъектов.

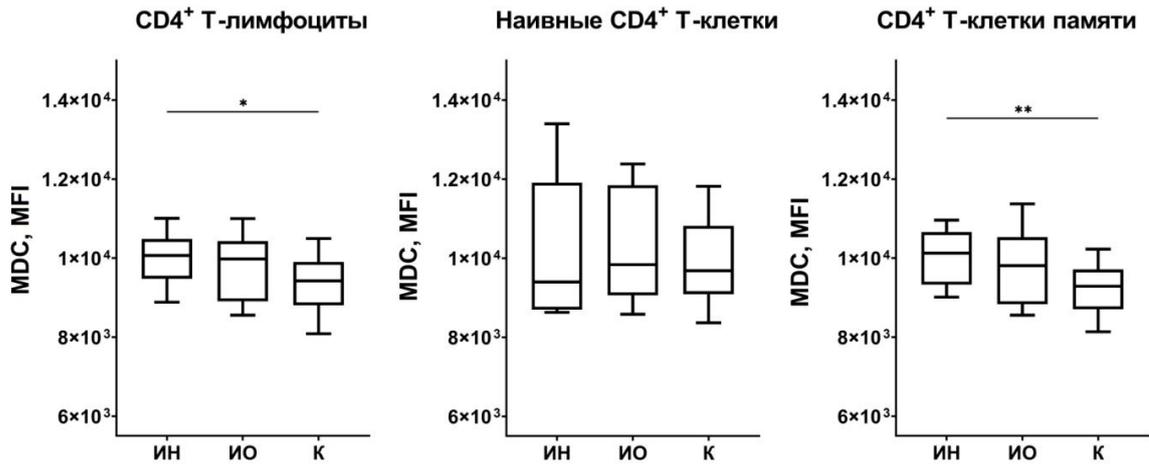


**Рисунок 2 – Интенсивность потребления аналога пальмитиновой кислоты (BODIPY FL C16) пролиферирующими CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами иммунологических неответчиков (ИН, n=18), иммунологических ответчиков (ИО, n=21) и здоровых добровольцев (К, n=22)**

Представлены медианы, интерквартильные размахи и 10-90 %-ые перцентили. \* –  $p < 0,05$  (ANOVA; критерий Тьюки). MFI: *англ.* Mean Fluorescence Intensity – средняя интенсивность флуоресценции.

Оценка экспрессии транспортера нейтральных аминокислот в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах ВИЧ-инфицированных пациентов показала, что во всех группах абсолютное большинство CD4<sup>+</sup> Т-клеток экспрессировало ASCT2. В общем пуле CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов уровень экспрессии транспортера у здоровых людей и ВИЧ-позитивных пациентов был сопоставим ( $p > 0,05$ ). Однако пролиферирующие CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты ИН отличались от таковых контрольной группы повышенной экспрессией ASCT2 ( $p < 0,05$ ) как в пуле наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, так и среди CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти ( $p < 0,05$ ).

Исследование аутофагии показало, что CD4<sup>+</sup> Т-клетки ИН, вовлеченные в этот процесс, содержат больше аутофагосом, чем клетки К ( $p < 0,05$ ). Повышенный уровень аутофагии наблюдался в общем пуле CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов ИН, в наивных клетках и клетках памяти. Пролиферирующие CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты ИН отличались от таковых здоровых людей повышенным содержанием аутофагосом ( $p < 0,05$ ; рисунок 3). Как и в случае с глюкозой и жирными кислотами, отличия были обусловлены высоким уровнем аутофагии в пуле клеток памяти ( $p < 0,01$ ). В пуле наивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов отличий между группами не установлено.



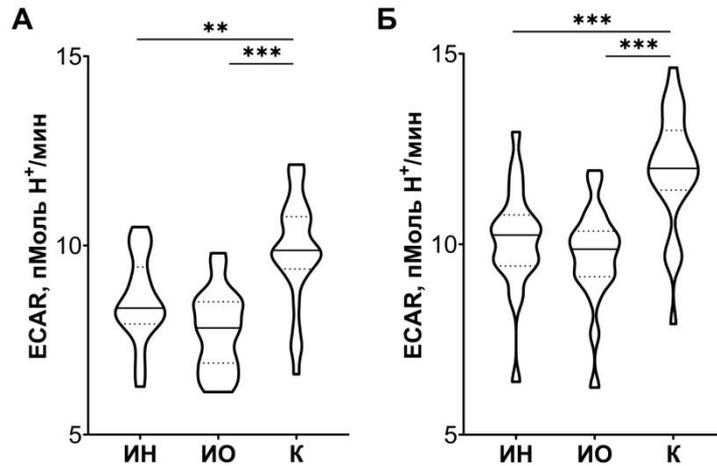
**Рисунок 3 – Уровень аутофагии в пролиферирующих CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах иммунологических неответчиков (ИН, n=18), иммунологических ответчиков (ИО, n=21) и здоровых добровольцев (К, n=22)**

Представлены медианы, интерквартильные размахи и 10-90 %-ые перцентили. \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$  (ANOVA; критерий Тьюки). Уровень аутофагии определяли с использованием производного монодансилкадаверина (MDC).

MFI: *англ.* Mean Fluorescence Intensity – средняя интенсивность флуоресценции.

Подводя итог, можно заключить, что делящиеся CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти ИН характеризуются повышенным потреблением экзогенных и эндогенных метаболических субстратов. При регенерации такие клетки не только поглощают существенно больше глюкозы, чем клетки неинфицированных субъектов, но также превосходят их по уровню аутофагии, экспрессии транспортера нейтральных аминокислот и потреблению экзогенных жирных кислот. Пролиферация CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов обеспечивается не только захватом метаболических субстратов, но и их утилизацией в ходе гликолиза и митохондриального дыхания. Для определения интенсивности гликолиза в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах памяти мы измеряли скорость ацидификации среды (*англ.* extracellular acidification rate – ECAR).

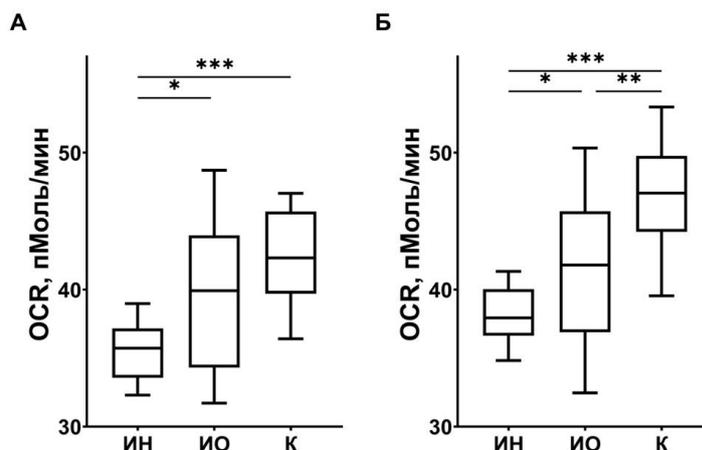
На базальном уровне (рисунок 4А) скорость ацидификации среды CD4<sup>+</sup> Т-клетками памяти ВИЧ-инфицированных пациентов была существенно снижена в сравнении с показателями здоровых доноров ( $p_{\text{ИН-К}} < 0,01$ ;  $p_{\text{ИО-К}} < 0,001$ ;) [11]. Стимуляция CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов памяти ФГА в течение 40 мин привела к увеличению ECAR ( $p < 0,05$ ). Тем не менее, после кратковременной стимуляции в образцах ВИЧ-инфицированных пациентов этот показатель оставался сниженным в сравнении с таковым неинфицированных доноров ( $p < 0,001$ ; рисунок 4Б).



**Рисунок 4 – Скорость закисления среды (ESAR) CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами памяти до (А) и после (Б) стимуляции фитогемагглютинином**

Представлены медианы и интерквартильные размахи; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$  (ANOVA; критерий Тьюки). ИН – иммунологические неответчики ( $n=4$ ,  $R=6$ ), ИО – иммунологические ответчики ( $n=4$ ,  $R=6$ ), К – контрольная группа ( $n=4$ ,  $R=6$ ).

Активность дыхательной цепи митохондрий CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов памяти оценивали, измеряя скорость потребления кислорода (*англ.* Oxygen consumption rate – OCR) данными клетками. Показано, что базальная скорость потребления кислорода CD4<sup>+</sup> Т-клетками памяти, полученными от ИН, была меньше, чем у ИО ( $p < 0,05$ ) и К ( $p < 0,001$ ; рисунок 5А) [1, 6, 9]. Кратковременная активация клеток ФГА приводила к увеличению показателя митохондриального дыхания во всех группах ( $p < 0,01$ ). Однако уровень OCR в активированных CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти ВИЧ-инфицированных пациентов был ниже, чем у К ( $p_{ИН-К} < 0,001$ ;  $p_{ИО-К} < 0,01$ ; рисунок 5Б).



**Рисунок 5 – Базальная скорость потребления кислорода (*англ.* Oxygen consumption rate – OCR) CD4<sup>+</sup> Т-клетками памяти иммунологических неответчиков (ИН), иммунологических ответчиков (ИО) и здоровых субъектов (К) до (А) и после (Б) стимуляции фитогемагглютинином**

Представлены медианы, интерквартильные размахи и 10-90 %-ые перцентили; \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$  (однофакторный дисперсионный анализ; критерий Тьюки).  $n=4$ ,  $R=6$ .

Таким образом, в CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти ИИ наблюдается значительное снижение интенсивности гликолиза и митохондриального дыхания. Эти процессы играют важную роль в биосинтезе макромолекул, и их подавление может приводить к остановке деления клеток (*Griffiths M., et al., 1993*). В связи с этим возникает вопрос о причинах метаболических нарушений в CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти ИИ.

Можно предположить, что эти изменения возникают в результате истощения. В нашем исследовании мы оценили уровень истощения CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов памяти по фенотипическим признакам – поверхностной экспрессии ингибиторных рецепторов PD-1 и TIGIT. Было установлено, что у ИИ PD-1 экспрессировали 29,6 % (18,9-48,9 %) CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти, у ИО – 23,6 % (17,4-31,2 %), у К – 18,3 % (15,5-23,4 %) [5, 7]. Содержание TIGIT-позитивных клеток в субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов памяти у ИИ составило 48,4 % (33,7-59,5 %), у ИО – 39,1 % (32,0-40,9 %), у К – 32,7 % (28,2-35,2 %). У ИИ доля PD-1-позитивных и TIGIT-позитивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов памяти была максимальной и статистически значимо превышала показатели неинфицированных лиц ( $p < 0,05$ ).

Пролиферирующие Ki-67<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти ИИ, в сравнении с аналогичными клетками здоровых людей, также содержали значительно больше PD-1-позитивных ( $p < 0,05$ ) и TIGIT-позитивных элементов ( $p < 0,01$ ). Более того, по количеству TIGIT<sup>+</sup> элементов делящиеся CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты памяти ИИ превосходили таковые ИО ( $p < 0,01$ ). Супрессорные молекулы способны угнетать активность гликолиза и окислительного фосфорилирования в Т-лимфоцитах (*Parry R. V. et al., 2005*), поэтому вполне вероятно, что метаболические нарушения в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах памяти ИИ вызваны истощением данных клеток.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Низкая степень регенерации иммунитета у ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков объясняется непродуктивной пролиферацией CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти. Механизмы, препятствующие эффективному делению CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов памяти ИИ, прежде установлены не были. Косвенные данные, полученные путем транскриптомного анализа, указывали на то, что данный феномен может быть связан с метаболическими нарушениями в CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти ИИ (*Younes et al., 2018*). В настоящей работе мы использовали ряд функциональных тестов, чтобы напрямую оценить активность обменных процессов в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах ВИЧ-инфицированных пациентов с различной эффективностью восстановления иммунитета в

ответ на АРТ. Нами было установлено, что делящиеся  $CD4^+$  Т-клетки памяти ИН характеризуются повышенным потреблением экзогенных и эндогенных метаболических субстратов. При регенерации  $CD4^+$  Т-лимфоциты памяти ИН поглощают существенно больше глюкозы и жирных кислот, чем клетки неинфицированных субъектов, а также превосходят их по уровню аутофагии и экспрессии транспортера нейтральных аминокислот. Полученные данные указывают на то, что в делящихся  $CD4^+$  Т-лимфоцитах памяти ИН углерод, поступающий с различными метаболическими субстратами, активно утилизируется. В контексте пролиферации допустимо предположить, что поглощаемые субстраты расходуются на метаболические пути, связанные с синтезом макромолекул.

Мы впервые использовали метод анализа внеклеточных потоков для оценки интенсивности гликолиза и митохондриального дыхания в изолированных  $CD4^+$  Т-лимфоцитах памяти, полученных от ИН, ИО и неинфицированных лиц. Результаты показали, что в  $CD4^+$  Т-клетках памяти ИН значительно снижена интенсивность гликолиза и митохондриального дыхания. Гликолиз и окислительное фосфорилирование митохондрий играют важную роль в биосинтезе макромолекул, а их подавление нередко связывают с остановкой деления (Griffiths *et al.*, 1993). Соответственно, угнетение этих процессов в  $CD4^+$  Т-клетках памяти ИН может приводить к недостаточному производству макромолекул, необходимых для формирования дочерних лимфоцитов. Описанные изменения происходят на фоне истощения регенерирующих  $CD4^+$  Т-лимфоцитов памяти. Мы показали, что  $CD4^+$  Т-клетки памяти ИН активно экспрессируют ингибиторные рецепторы PD-1 и TIGIT. Эти супрессорные молекулы способны подавлять прохождение сигнала через сигнальный путь PI3K/АКТ/mTOR и угнетать активность гликолиза и окислительного фосфорилирования в Т-лимфоцитах (Patsoukis *et al.*, 2015). Таким образом, можно предположить, что хроническая лимфопения приводит к истощению регенерирующих  $CD4^+$  Т-лимфоцитов памяти ИН, снижению их биоэнергетической активности и утрате способности к продуктивному делению.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

Дальнейшая разработка данной темы, на наш взгляд, имеет три перспективных направления. В первую очередь, следует оценить содержание промежуточных и конечных продуктов биосинтеза нуклеотидов, аминокислот и липидов – «строительных блоков» для делящихся  $CD4^+$  Т-клеток. Кроме того, следует определить, какие факторы

угнетают метаболическую активность  $CD4^+$  Т-лимфоцитов в организме иммунологических неответчиков. Наконец, важной задачей будет характеристика процесса истощения  $CD4^+$  Т-клеток в условиях хронической лимфопении.

### **ВЫВОДЫ**

1. В состоянии покоя  $CD4^+$  Т-клетки памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на антиретровирусную терапию потребляют больше экзогенных субстратов и содержат больше аутофагосом, чем наивные  $CD4^+$  Т-лимфоциты; для пролиферации наивные  $CD4^+$  Т-лимфоциты усиливают потребление субстратов до 118 %, а  $CD4^+$  Т-клетки памяти – только до 19 %.

2.  $CD4^+$  Т-лимфоциты ВИЧ-инфицированных больных с дискордантным ответом на антиретровирусную терапию потребляют больше глюкозы, чем аналогичные клетки пациентов со стандартным ответом на лечение и неинфицированных ВИЧ субъектов; такие клетки также потребляют больше жирных кислот и имеют более высокий уровень аутофагии, чем  $CD4^+$  Т-лимфоциты здоровых субъектов.

3. В  $CD4^+$  Т-лимфоцитах памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на антиретровирусную терапию интенсивность гликолиза снижена относительно неинфицированных ВИЧ доноров; активность митохондриального дыхания в  $CD4^+$  Т-клетках памяти иммунологических неответчиков снижена в сравнении с пациентами со стандартным ответом на терапию и здоровыми лицами.

4. При дискордантном ответе на антиретровирусную терапию изменение метаболизма  $CD4^+$  Т-лимфоцитов памяти связано с присутствием большего количества пролиферирующих клеток и регистрируется на фоне повышения доли PD-1-позитивных и TIMT-позитивных элементов.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Для своевременного выявления пациентов, склонных к формированию иммунологического неответа на лечение, рекомендуется оценивать функциональное состояние митохондрий  $CD4^+$  Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных больных, получающих антиретровирусную терапию. С этой целью рекомендовано определять показатели митохондриального дыхания и резервной дыхательной емкости митохондрий на анализаторе клеточного метаболизма Seahorse XF. В случае выявления нарушений в работе данных органелл рекомендуется рассмотреть возможность назначения препаратов, стимулирующих функцию митохондрий.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и/или индексируемых в международных базах данных RSCI, Scopus, Web of Science и PubMed:*

1. Метаболические свойства активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на высокоактивную антиретровирусную терапию / **В.В. Власова**, Е.В. Сайдакова, Л.Б. Королевская, Н.Г. Шмагель, В.А. Черешнев, К.В. Шмагель // Доклады Российской Академии Наук. Науки о Жизни. – 2021. – Т.501, № 1. – С.538–542. = Metabolic features of activated memory CD4<sup>+</sup> T-cells derived from HIV-infected immunological non-responders to highly active antiretroviral therapy / **V.V. Vlasova**, E.V. Saidakova, L.B. Korolevskaya, N.G. Shmagel, V.A. Chereshevnev, K.V. Shmagel // Doklady Biological Sciences. – 2021. – Т.501, №1. – С.206–209. [переводная версия] (IF Scopus – 0,22, Q4; ИФ РИНЦ – 1,085).
2. Особенности потребления глюкозы субпопуляциями CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих антиретровирусную терапию / Л.Б. Королевская, Е.В. Сайдакова, **В.В. Власова**, К.В. Шмагель // Российский иммунологический журнал. – 2021. – Т. 24, № 2. – С.311–316. (ИФ РИНЦ – 0,309, K2).
3. Особенности метаболизма наивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти в покое и при пролиферации / **В.В. Власова**, Е.В. Сайдакова, Л.Б. Королевская, Н.Г. Шмагель, К.В. Шмагель // Acta Biomedica Scientifica. – 2022. – Т.7, № 5-1. – С.167–178. (IF Scopus – 0,12, Q4; ИФ РИНЦ – 0,501).
4. Метаболические свойства Т-лимфоцитов и методы их регуляции / **В.В. Власова**, К.В. Шмагель // Биохимия. – 2023. – Т. 88, №11. – С. 2251–2270. = T-Lymphocyte Metabolic Features and Techniques to Modulate Them / **V.V. Vlasova**, K.V. Shmagel // Biochemistry (Moscow). – 2023. V. 88, №11. – P. 1857–1873. [переводная версия] (IF Scopus – 2,3, Q2; ИФ РИНЦ – 2,024).
- 5 Functional exhaustion of CD4<sup>+</sup> T-cells in HIV/HCV coinfecting HAART-treated patients / **V.V. Vlasova**, L.B. Korolevskaya, O.A. Loginova, N.G. Shmagel, E.V. Saidakova // Medical Immunology (Russia). – 2023. – Т. 25, №4. – С. 837-843. (IF Scopus – 0,14, Q4; ИФ РИНЦ – 0,719, K1).
6. Исследование показателей окислительного фосфорилирования и гликолиза в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков с применением технологии Seahorse / Л.Б. Королевская, **В.В. Власова**, Н.Г. Шмагель, Е.В. Сайдакова // Российский иммунологический журнал. – 2023. – Т.26, № 3. – С.307–312. (ИФ РИНЦ – 0,309, K2).
7. Особенности экспрессии ингибиторных рецепторов PD-1 и TIGIT на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах различной степени зрелости / **В.В. Власова**, Е.В. Сайдакова // Российский иммунологический журнал. – 2024. – Т. 27, №3. – С. 553–558. (ИФ РИНЦ – 0,309, K2).
8. Модификация протокола исследования функциональной активности оттаявших после криоконсервации Т-лимфоцитов / Е.В. Сайдакова, Л.Б. Королевская, В.Н. Пономарева, **В.В. Власова** // Acta Biomedica Scientifica. – 2024. – Т.9, №3. – С.256-265. (IF Scopus – 0,12, Q4; ИФ РИНЦ – 0,501).

*Публикации в других изданиях:*

9. Mitochondrial disorders in activated memory CD4<sup>+</sup> T cells derived from HIV-infected immunological non-responders / **V.V. Vlasova**, E.V. Saidakova, L.B. Korolevskaya, N.G. Shmagel, S.A. Younes, M. Lederman, K.V. Shmagel // 11th IAS

Conference on HIV Science: Abstract Book (Berlin, 18-21 July 2021). – Berlin, 2021. – С. PEALB06.

10. Поглощение метаболитических субстратов CD4+ Т-лимфоцитами, полученными от ВИЧ-инфицированных пациентов, принимающих высокоактивную антиретровирусную терапию / **В.В. Власова**, Е.В. Сайдакова, Л.Б. Королевская, Н.Г. Шмагель, К.В. Шмагель // *Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования: сборник статей всероссийской научной конференции с международным участием (Пермь, 18-20 октября 2021 года)*. – Пермь, 2021. – С. 177–179.

11. Нарушение аэробного гликолиза в CD4+ Т-клетках памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на высокоактивную антиретровирусную терапию / **В.В. Власова**, Л.Б. Королевская, Е.В. Сайдакова, Н.Г. Шмагель, К.В. Шмагель // *X юбилейный всероссийский форум молодых исследователей ХимБиоSeasons 2024: сборник тезисов докладов (Калининград, 15–20 апреля 2024)*. – Калининград, 2024. – С. 175.

### СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

2-NBDG – 2-(7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол-4-ил)-D-глюкозамин

АРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИН – иммунологические неответчики на лечение

ИО – иммунологические ответчики на терапию

К – контроль

СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита

ФГА – фитогемагглютинин

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

ASCT2 – аланин-серин-цистеин транспортер 2

BODIPY FL C16 – (4,4-дифтор-5,7-диметил-4-бора-3α,4α-диазо-*s*-индацен-3) гексадекановая кислота

BSA – бычий сывороточный альбумин

DPBS – фосфатно-солевой раствор в модификации Дульбекко

ЕСАР – скорость ацидификации среды

MFI – средняя интенсивность флуоресценции

OCR – скорость поглощения кислорода

PD-1 – белок программируемой гибели 1

TIGIT – Т-клеточный иммуноглобулин и тирозинсодержащий ингибиторный мотив иммунорецепторов

*На правах рукописи*

ВЛАСОВА ВИОЛЕТТА ВИКТОРОВНА

**ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА CD4<sup>+</sup> Т-ЛИМФОЦИТОВ  
ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИЦ, ПРИНИМАЮЩИХ  
АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ**

3.2.7. Иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Подписано в печать ---.---.-----.

Объем – 1 усл. печ. л. Тираж 120 экз.

Формат 60×90/16. Набор компьютерный.

Отпечатано в «Институте экологии и генетики микроорганизмов  
Уральского отделения Российской академии наук» –  
филиале Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Пермского федерального исследовательского центра  
Уральского отделения Российской академии наук 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13