

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения
Российской академии наук
Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения
Российской академии наук

На правах рукописи

ВЛАСОВА ВИОЛЕТТА ВИКТОРОВНА

**ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА CD4⁺ Т-ЛИМФОЦИТОВ
ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИЦ, ПРИНИМАЮЩИХ
АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ**

3.2.7. Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
Сайдакова Евгения Владимировна
доктор биологических наук

Пермь – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 – Механизмы формирования и восполнения иммунодефицита при ВИЧ-инфекции.....	11
1.2 – Метаболическое обеспечение пролиферации	21
1.3 – Метаболизм Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции.....	32
ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
ГЛАВА 3 – РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	53
3.1 – Регенерация CD4 ⁺ Т-лимфоцитов в организме ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков.....	53
3.2 – Нарушение гликолиза в CD4 ⁺ Т-лимфоцитах памяти ВИЧ-инфицированных лиц с дискордантным ответом на терапию	64
3.3 – Активное потребление метаболических субстратов CD4 ⁺ Т-лимфоцитами иммунологических неответчиков.....	74
3.4 – Нарушение работы митохондрий в CD4 ⁺ Т-лимфоцитах памяти иммунологических неответчиков.....	87
РЕЗЮМЕ.....	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	97
ВЫВОДЫ.....	106
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	107
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	111

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), остается одной из основных проблем глобального общественного здравоохранения. С начала эпидемии вирусом были инфицированы не меньше 85 миллионов человек [378]. ВИЧ-инфекция проявляется постепенным разрушением иммунной системы, при этом наибольший ущерб приходится на субпопуляцию CD4⁺ Т-лимфоцитов. Дефицит CD4⁺ 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 [378].

Российские исследователи внесли большой вклад во всестороннее изучение ВИЧ-инфекции. За последние годы отечественные ученые провели множество исследований, посвященных эпидемическому процессу ВИЧ-инфекции [7, 8, 18, 19], генетическим факторам, влияющим на распространение и течение ВИЧ-инфекции [3, 4, 15, 16], особенностям развития коинфекций, таких как ВИЧ/SARS-CoV-2 [2, 22, 118, 374], ВИЧ/ВГС [26] и ВИЧ/туберкулез [6, 7, 10, 11, 25], а также изучению нейрокогнитивных изменений при ВИЧ-инфекции [13, 20, 23]. Большое количество исследований посвящено проблемам диагностики [1, 12, 24], профилактики и лечения ВИЧ-инфекции [5, 9, 17, 27, 208, 209, 217]. Однако многие вопросы до сих пор остаются нерешенными.

В настоящее время единственным эффективным средством контроля ВИЧ-инфекции является высокоактивная антиретровирусная терапия (АРТ), подавляющая репликацию вируса в организме [102]. Как правило, применение АРТ приводит не только к снижению вирусной нагрузки, но и к восстановлению численности CD4⁺ Т-лимфоцитов, что определяет сокращение риска клинических проявлений и смерти [380]. Согласно мировой статистике, к концу 2022 года 76 %

всех людей, живущих с ВИЧ, принимали АРТ, при этом в 71 % случаев назначение терапии привело к подавлению вирусной нагрузки [378]. Применение АРТ обнажило серьезную проблему: у части пациентов (по различным данным от 10 до 40 %) численность CD4⁺ Т-клеток восстанавливается слабо и сохраняется низкой на протяжении всего периода вирусологически эффективного лечения [47, 206, 320, 406]. Для описания данной клинической группы в литературе 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 снижением продолжительности жизни ВИЧ-инфицированных больных [141, 321, 362]. Среди осложнений, распространенных у ВИЧ-инфицированных пациентов с дискордантным ответом на терапию, отмечают заболевания сердечнососудистой системы [319], онкологические заболевания [192] и нейрокогнитивные расстройства [172, 214]. 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 – генетических, клинических и инфекционных. К генетическим факторам риска относят мутации, связанные с *CCR5* [32, 203], *IL7R* [326] и *FAS* [289]. Клинические факторы включают в себя высокую вирусную нагрузку до начала лечения [131], пожилой возраст ВИЧ-инфицированных больных [131, 255], длительное течение инфекции, позднее начало терапии [396] и низкий уровень CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови на момент ее назначения [131, 137]. Также среди факторов, повышающих риск развития дискордантного ответа на АРТ, выделяют наличие коинфекции вирусом гепатита С (ВГС) [244]. Из этого следует, что дискордантный иммунологический ответ на АРТ может быть спровоцирован множеством разнообразных причин, при этом их объединяет отсутствие восполнения численности CD4⁺ Т-лимфоцитов в организме.

В основе восстановления количества клеток любой популяции лежит процесс регенерации [124, 342, 387]. Майкл Ледерман и его коллеги показали, что

при ВИЧ-инфекции источником регенерации в субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов являются клетки памяти [221]. Такие клетки имеют низкий порог активации и достигают пика экспансии быстрее наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов [327, 369, 401]. Тем не менее, у ИИ высокая митотическая активность CD4⁺ Т-клеток памяти не приводит к восполнению численности CD4⁺ Т-лимфоцитов и часто завершается гибелью пролиферирующих клеток [252, 345, 411]. 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 [174, 243]. Ранее было показано, что у ИИ, при их сравнении с пациентами, давшими стандартный ответ на лечение, и здоровыми людьми, в делящихся CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти существенно снижена экспрессия генов, обеспечивающих эффективное функционирование митохондрий [411, 418]. Кроме того, было показано, что CD4⁺ Т-клетки ИИ демонстрируют признаки истощения, для которого характерно угнетение анаболизма [346, 363]. Эти данные указывают на то, что у ИИ метаболизм регенерирующих CD4⁺ Т-клеток памяти может быть нарушен. Тем не менее, данная гипотеза пока не получила фактического подтверждения. Проверке этой гипотезы будет посвящена настоящая работа.

Цель исследования: установить особенности метаболизма CD4⁺ Т-лимфоцитов ВИЧ-инфицированных людей с различной эффективностью восстановления иммунитета в ответ на высокоактивную антиретровирусную терапию.

Задачи исследования:

1. Определить особенности метаболизма наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов и CD4⁺ 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⁺ Т-лимфоцитах ВИЧ-инфицированных больных с дискордантным ответом на антиретровирусную терапию.

3. Охарактеризовать энергетический профиль $CD4^+$ 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 $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти у ВИЧ-инфицированных больных с дискордантным ответом на антиретровирусную терапию.

Научная новизна. Впервые установлены метаболические характеристики $CD4^+$ Т-клеток памяти, обеспечивающие их приоритетное значение в регенерации $CD4^+$ Т-лимфоцитов. Впервые показано, что при ВИЧ-инфекции низкая эффективность регенерации связана с метаболическими нарушениями в $CD4^+$ Т-клетках памяти. Впервые установлено несоответствие между повышенным потреблением экзогенных и эндогенных субстратов и низкой биоэнергетической активностью $CD4^+$ Т-клеток памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков. Впервые показано, что нарушение метаболизма $CD4^+$ 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 $CD4^+$ Т-лимфоцитов и их пролиферативным и регенераторным потенциалом. Показано, что метаболизм $CD4^+$ Т-клеток памяти в организме ИН изменен: вопреки активному потреблению субстратов скорость гликолиза и окислительного фосфорилирования митохондрий в таких клетках существенно снижена. Выявленные метаболические нарушения развиваются на фоне истощения $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти в организме ИН. Полученные данные расширяют представление о механизмах, препятствующих продуктивной пролиферации $CD4^+$ Т-клеток памяти у ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на терапию, а также обозначают необходимость дальнейшего исследования 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⁺ Т-лимфоцитов.

Положения, выносимые на защиту:

1. CD4⁺ Т-клетки памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на антиретровирусную терапию приспособлены к пролиферации больше, чем наивные CD4⁺ Т-лимфоциты благодаря меньшему масштабу метаболической перестройки, необходимой для деления.

2. При дискордантном ответе на антиретровирусную терапию CD4⁺ 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⁺ Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных больных, получающих антиретровирусную терапию, CD4⁺ 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 (число CD4⁺ Т-лимфоцитов в периферической крови менее 350/мкл после двух и более лет АРТ);

2) ВИЧ-позитивные иммунологические ответчики – ИО (число CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови более 350/мкл после двух и более лет АРТ);

3) Контроль – К (относительно 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 (англ. 2-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-D-glucosamine – 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.

ГЛАВА 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 – Механизмы формирования и восполнения иммунодефицита при ВИЧ-инфекции

Характерной чертой ВИЧ-инфекции является формирование глубокого иммунодефицита – феномена, связанного с прогрессирующей гибелью CD4⁺ Т-лимфоцитов. Без лечения численность CD4⁺ Т-клеток в периферической крови хронически инфицированных больных сокращается на 40-80 единиц/мм³ в год [361]. На последней стадии заболевания данный показатель может достигать уровня 200 клеток/мм³ и ниже, при этом общее содержание CD4⁺ Т-лимфоцитов в организме сокращается более чем в два раза [162, 339]. Основной функцией CD4⁺ Т-лимфоцитов является регуляция иммунного ответа: данные клетки участвуют в активации макрофагов [80], CD8⁺ Т-клеток [66] и В-лимфоцитов, продуцируют цитокины [421], а также подавляют активность иммунокомпетентных клеток [347]. Дефицит CD4⁺ Т-клеток, формирующийся при ВИЧ-инфекции, приводит к развитию синдрома приобретенного иммунодефицита. Вследствие иммунной недостаточности ВИЧ-инфицированные пациенты становятся более уязвимыми к оппортунистическим инфекциям и злокачественным образованиям, редко проявляющимся в популяции здоровых людей [106]. Присоединение оппортунистических инфекций является основной причиной заболеваемости и смерти ВИЧ-позитивных больных [295, 366]. По данным ЮНЭЙДС, с начала эпидемии ВИЧ от СПИД-ассоциированных заболеваний погибло не менее 40 миллионов человек [378].

Известно, что ВИЧ преимущественно поражает CD4⁺ Т-лимфоциты и вызывает их гибель как в культуре, так и *in vivo* [104]. На основе этих наблюдений сложилась гипотеза о том, что иммунодефицит является естественным следствием гибели ВИЧ-инфицированных CD4⁺ Т-клеток [34]. Действительно, на модели приматов, инфицированных вирусом иммунодефицита обезьян (ВИО), было

показано, что в острой фазе заболевания ВИО поражает около 60 % $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти в организме, большинство из которых (до 80 %) вскоре погибает в результате цитолиза либо Fas-индуцированного апоптоза [233, 262]. При этом опустошение пула $CD4^+$ Т-клеток в острой фазе ВИО-инфекции совпадает с пиком виремии [233]. Тем не менее, данная модель оказалась неприменима к хронической фазе ВИЧ-инфекции. Harter и его коллеги показали, что в хронической фазе заболевания количество инфицированных клеток невелико: в лимфатических узлах ВИЧ-позитивных пациентов менее 0,01 % мононуклеарных клеток содержат вирусную РНК [166]. Более того, большая часть умирающих $CD4^+$ Т-лимфоцитов принадлежит к ВИЧ-негативной фракции [127]. Несоответствие между числом инфицированных и погибающих $CD4^+$ Т-клеток указывало на то, что прямое цитопатическое действие ВИЧ не может быть ведущей причиной развития иммунной недостаточности [108]. В качестве альтернативной гипотезы Ascher и Sheppard выдвинули предположение о том, что иммунодефицит формируется вследствие опосредованной ВИЧ иммунной активации [44].

При ВИЧ-инфекции активация носит системный характер и затрагивает как адаптивное, так и врожденное звено иммунитета. Так, в организме ВИЧ-инфицированных людей возрастает доля активированных элементов в популяциях дендритных клеток, моноцитов, нейтрофилов, НК-клеток, Т- и В-лимфоцитов [275]. Кроме того, увеличивается концентрация маркеров воспаления: неоптерина, $\beta 2$ -микроглобулина, TNF- α и его растворимого рецептора sTNFR2, IL-6, IL-1 β и IFN- γ [48, 63, 135, 276]. Первыми взаимосвязь между иммунной активацией и иммунодефицитом продемонстрировали Giorgi и ее коллеги [146, 239]. Авторы показали, что при ВИЧ-инфекции высокий уровень активации $CD8^+$ Т-лимфоцитов ассоциирован с прогрессией заболевания в стадию СПИД. Впоследствии многочисленные исследования подтвердили связь между уровнем иммунной активации, степенью дефицита $CD4^+$ Т-клеток, а также риском заболеваемости и смерти [113, 215, 307, 353]. Необходимо отметить, что природные носители вируса иммунодефицита – зеленые мартышки, мандрилы и

дымчатые мангобеи – отличаются низким уровнем иммунной активации в острой фазе инфекции [364] и полным ее отсутствием – в хронической [212, 238]. У таких приматов ВИО-инфекция не приводит к развитию иммунной недостаточности [238].

При ВИЧ-инфекции иммунная активация, в первую очередь, связана с прямым воздействием вируса. Известно, что ВИЧ вызывает антиген-специфичную активацию клеток адаптивного иммунитета [45], а его РНК также служит лигандом для Toll-подобных рецепторов (Toll-like receptor – TLR) [223]. Взаимодействие одноцепочечной РНК ВИЧ с TLR 7/8 приводит к активации Т- и В-лимфоцитов [51], плазмцитоподобных дендритных клеток [56], моноцитов [267] и НК-клеток [36]. Кроме того, структурные белки ВИЧ, такие как p17, p24 и gp41, являются лигандами TLR 2/1 и TLR 2/6 [177], а белок Tat – лигандом TLR 4 [97, 294]. Как следствие, иммунокомпетентные клетки, содержащие TLR соответствующей специфичности – в том числе, Т-лимфоциты – активируются под действием вирусных белков. Важно отметить, что, помимо лейкоцитов, ВИЧ и его белки также могут активировать клетки эндотелия [75, 152] и тромбоциты [413]. В ответ на стимуляцию эндотелиальные клетки и тромбоциты активно синтезируют провоспалительные цитокины, в том числе IL-18 и IL-1 β [30, 213].

В острой фазе заболевания инфекционный процесс локализуется, преимущественно, в желудочно-кишечном тракте [384] и сопровождается повреждением кишечного барьера [71]. Нарушение целостности кишечного эпителия при ВИЧ-инфекции происходит в результате апоптоза энтероцитов и нарушения плотных межклеточных контактов. При этом программируемая смерть энтероцитов вызвана как прямым действием ВИЧ [254, 291], так и локальным воспалением [350]. Было установлено, что высокое содержание TNF- α в слизистых кишечника ВИЧ-позитивных людей приводит к апоптозу клеток эпителия [121]. ВИЧ не только вызывает гибель энтероцитов, но также препятствует регенерации кишечного барьера. Опустошение пула CD4⁺ Т-клеток, населяющих кишечник, приводит к существенному сокращению численности Th17- и Th22-лимфоцитов – основных продуцентов IL-22 [92, 207, 341]. IL-22

вырабатывается в ответ на стимуляцию провоспалительными цитокинами [340] и участвует в пролиферации клеток эпителия, а также продукции муцина и противомикробных белков [205]. Снижение продукции IL-22 на фоне дефицита Th17- и Th22-лимфоцитов приводит к тому, что повышенная проницаемость кишечника приобретает хронический характер.

Нарушение целостности кишечного барьера влечет за собой усиление бактериальной транслокации. Этим термином обозначают процесс перехода живых микроорганизмов и их компонентов из кишечника в циркуляцию [350]. Известно, что ряд бактериальных продуктов обладает провоспалительными свойствами. К ним относятся пептидогликан [98], липотейхоевые кислоты [167], липополисахариды (ЛПС) и флагеллин [422]. Моноциты [38, 276], макрофаги [389], плазматоидные дендритные клетки [296] и Т-лимфоциты [136] несут TLR, специфичные к данным молекулам, и отвечают на их распознавание активацией и продукцией медиаторов воспаления. Важно отметить, что стимуляция TLR-лигандами неодинаково влияет на разные субпопуляции Т-клеток. Так, стимулированные CD8⁺ Т-лимфоциты экспрессируют маркер активации CD69, в то время как CD4⁺ Т-клетки вступают в пролиферацию и экспрессируют белок Ki-67 [136]. При этом большинство Ki-67⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов, активированных через TLR, не способно завершить деление и погибает путем апоптоза. Поскольку усиление бактериальной транслокации приводит к активации иммунитета и гибели CD4⁺ Т-клеток, содержание маркеров повреждения кишечного барьера (ЛПС и sCD14) в крови ВИЧ-инфицированных больных позволяет прогнозировать развитие заболевания и риск летального исхода [251, 351].

Помимо бактериальных продуктов, в организме ВИЧ-инфицированных пациентов присутствуют другие факторы, способные активировать Т-лимфоциты вне зависимости от специфичности их Т-клеточного рецептора (ТКР). Изменение фенотипических и функциональных свойств Т-клеток в ответ на такое воздействие получило название «сторонней активации» [53]. Сторонняя активация свойственна не только ВИЧ, поскольку в очаге других вирусных

инфекций также присутствуют активированные Т-лимфоциты различной специфичности [90, 94, 302]. Ключевую роль в индукции неспецифической активации Т-клеток играют цитокины. Установлено, что IL-12, IL-18, IL-15, TNF- α и IL-33 оказывают стимулирующее воздействие на CD8⁺ Т-лимфоциты в обход ТКР [133]. Культивируемые в присутствии этих медиаторов CD8⁺ Т-клетки экспрессируют маркер активации CD69 и продуцируют IFN- γ . Наибольший эффект на функциональное состояние CD8⁺ Т-лимфоцитов оказывают комбинации цитокинов, в частности, сочетание IL-12 и IL-18. При ВИЧ-инфекции CD8⁺ Т-клетки подвержены влиянию многих медиаторов воспаления. Так, было показано, что в организме ВИЧ-позитивных больных повышается содержание IL-15 и TNF- α , продуцируемых дендритными клетками и тканевыми макрофагами [55, 61, 269]. Кроме того, в лимфоидных тканях возрастает концентрация IL-12, IL-18, IL-33 и IL-10 [268]. Исследования *in vitro* подтвердили, что влияния цитокинов достаточно для ТКР-независимой активации покоящихся Т-лимфоцитов, полученных от ВИЧ-инфицированных людей [379].

Глубокий дефицит CD4⁺ Т-лимфоцитов, развивающийся при ВИЧ-инфекции, приводит к реактивации многих латентных инфекций [415]. Кроме того, организм ВИЧ-позитивных людей становится уязвимым к новым патогенам. В результате, одновременно с ВИЧ в организме человека нередко присутствуют коинфицирующие агенты. Среди коинфицирующих агентов наибольшую значимость имеют вирусы гепатита В и С, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, папилломавирус и *Mycobacterium tuberculosis* [261]. Известно, что большинство из них способствуют усилению хронической иммунной активации, свойственной ВИЧ-инфицированным пациентам [68]. Так, было показано, что, пациенты, коинфицированные ВИЧ и туберкулезом, демонстрируют более высокий уровень активации моноцитов и Т-лимфоцитов, чем ВИЧ-моноинфицированные лица [368]. В свою очередь, цитомегаловирусная инфекция приводит к увеличению доли активированных CD8⁺ Т-клеток в организме ВИЧ-позитивных людей [189], а коинфекция вирусом гепатита С – к повышению

содержания медиаторов воспаления (IL-6, sCD14 и IFN- α) в плазме крови [216, 256].

К настоящему времени установлено несколько механизмов, приводящих к гибели CD4⁺ Т-лимфоцитов в организме ВИЧ-позитивных людей. Один из них, как было отмечено выше, связан с цитопатическим действием вируса. Известно, что ВИЧ преимущественно размножается в активированных CD4⁺ Т-клетках эффекторной памяти [343, 382]. В связи с этим, клетки данной субпопуляции нередко погибают путем цитолиза [229] или апоптоза [138], а также в результате фагоцитоза иммунокомпетентными клетками [287, 367]. Помимо клеток эффекторной памяти, вирус также может проникать в клетки других субпопуляций CD4⁺ Т-лимфоцитов, однако в таком случае инфекция может быть abortивной, или непродуктивной [116]. При abortивной инфекции вирус не способен завершить процесс обратной транскрипции; в результате, в пораженных CD4⁺ Т-клетках накапливаются неполные фрагменты вирусной ДНК [114]. Неполные транскрипты ВИЧ распознаются интерферон-гамма-индуцируемым белком 16 (Interferon-gamma-inducible protein 16 – IFI16) [193, 277], который, при связывании с фрагментами ДНК, инициирует формирование инфламмосомы, активацию каспазы-1 и запуск пироптоза – «воспалительной» формы программируемой клеточной смерти [115]. Пироптоз CD4⁺ Т-лимфоцитов сопровождается формированием пор в мембране клетки и высвобождением во внеклеточную среду их провоспалительного содержимого: цитокинов IL-1 β и IL-18 [328, 352], а также ДНК, АТФ, гистонов и белков теплового шока [285]. Doitsh и соавт. предполагают, что данные факторы могут стимулировать пироптоз в близлежащих CD4⁺ Т-лимфоцитах даже в отсутствии вирусных компонентов [116]. Авторы считают, что abortивная инфекция покоящихся клеток запускает лавинообразный процесс индукции пироптоза в субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов, что, в конечном счете, приводит к их дефициту.

Развитие иммунологической недостаточности также связано с нарушением структуры лимфоидных тканей. При ВИЧ-инфекции в лимфатических узлах формируется выраженное провоспалительное окружение, что вызывает

аккумуляцию регуляторных Т-лимфоцитов, активно продуцирующих TGF- β [324, 417]. Под действием TGF- β в фибробластах усиливается синтез проколлагена, что, в конечном счете, приводит к нарушению архитектуры лимфатического узла вследствие фиброза [417]. Отложение коллагена приводит к уплотнению структуры венул с высоким эндотелием и нарушению миграции CD4⁺ Т-клеток [123]. Более того, в фиброзированных лимфатических узлах наивные CD4⁺ Т-лимфоциты и CD4⁺ Т-клетки центральной памяти теряют контакт с фибробластными ретикулярными клетками и лишаются доступа к гомеостатическим цитокинам и факторам роста, необходимым для их выживания [416]. Таким образом, при ВИЧ-инфекции фиброз лимфоидных тканей также может приводить к гибели CD4⁺ Т-лимфоцитов.

Помимо этого, численность Т-лимфоцитов в организме ВИЧ-позитивных людей сокращается в результате активационно-индуцированного апоптоза, опосредованного взаимодействием Fas/FasL [35, 50]. Активационно-индуцированный апоптоз является гомеостатическим механизмом, вызывающим сокращение активированных Т-клеток по завершению иммунного ответа [184]. Данный вид клеточной гибели также характерен для активированных Т-лимфоцитов, подвергнутых повторной антигенной стимуляции [194]. Установлено, что CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки ВИЧ-позитивных людей предрасположены к активационно-индуцированной программируемой смерти в большей степени, чем клетки здоровых лиц [204]. Так, *in vitro* активация CD4⁺ Т-клеток, полученных от ВИЧ-позитивных людей, приводит не к экспансии, а к Fas-индуцированной программируемой смерти [155, 323]. В условиях персистирующей антигенной и TLR-опосредованной стимуляции Т-клетки ВИЧ-инфицированных пациентов регулярно активируются и погибают в ходе активационно-индуцированного апоптоза [117]. При этом уровень экспрессии Fas на поверхности CD4⁺ Т-лимфоцитов положительно коррелирует с прогрессией заболевания и развитием иммунодефицита [43, 149]. Причины, обуславливающие высокую чувствительность Т-клеток к активационно-индуцированной программируемой гибели, остаются малоизученными. Тем не менее, известно, что

экспрессия Fas и FasL на поверхности CD4⁺ Т-лимфоцитов ВИЧ-инфицированных пациентов усиливается под действием вирусных белков gp120 и Tat [230, 399].

Известно, что как CD4⁺ Т-клетки, так и CD8⁺ Т-лимфоциты ВИЧ-инфицированных людей подвержены активационно-индуцированному апоптозу [204]. Однако, если активация CD8⁺ Т-клеток сопровождается их экспансией, то численность CD4⁺ Т-лимфоцитов в тех же условиях постепенно сокращается [85, 154]. Это явление объясняется тем, что CD8⁺ Т-клетки обладают большим пролиферативным потенциалом [143, 163, 247]: активированные CD8⁺ Т-лимфоциты, в сравнении с CD4⁺ Т-клетками, делятся быстрее и производят существенно больше дочерних клеток [179]. Количество антигенспецифичных CD8⁺ Т-лимфоцитов на пике экспансии в 20 раз превышает показатели CD4⁺ Т-клеток. Более того, по завершению иммунного ответа CD8⁺ Т-лимфоциты формируют стабильный пул долгоживущих клеток памяти, в то время как численность антигенспецифичных CD4⁺ Т-клеток постепенно сокращается [86, 179, 248]. В норме такая динамика позволяет поддерживать численность CD4⁺ Т-лимфоцитов на уровне, достаточном для эффективного функционирования иммунитета. Тем не менее, при хронической ВИЧ-инфекции сниженный, в сравнении с CD8⁺ Т-клетками, пролиферативный потенциал CD4⁺ Т-лимфоцитов не позволяет компенсировать их гибель [130, 176].

Роль хронической иммунной активации в патогенезе ВИЧ-инфекции в настоящий момент общепризнанна. Известно, что у ВИЧ-инфицированных пациентов с высокой вирусной нагрузкой и сниженным уровнем активации иммунитета болезнь медленнее прогрессирует в стадию СПИД [95]. В то же время, у «нонпрогрессоров», подавляющих вирусную нагрузку в отсутствии терапии, уровень иммунной активации выше, чем у здоровых людей, а численность CD4⁺ Т-клеток постепенно снижается, что со временем может привести к иммунодефициту [186, 187]. В совокупности, представленные данные демонстрируют, что при ВИЧ-инфекции уровень иммунной активации определяет степень поражения пула CD4⁺ Т-лимфоцитов, прогрессию заболевания в стадию СПИД, а также качество и продолжительность жизни больных.

Единственным эффективным средством для контроля ВИЧ-инфекции является высокоактивная антиретровирусная терапия (АРТ), подавляющая репликацию вируса в организме [102]. На фоне терапии у ВИЧ-инфицированных пациентов снижается уровень иммунной активации и воспаления [221], а также пироптоза [78] и апоптоза в субпопуляции CD4⁺ Т-клеток [336]. Уменьшение активности этих патологических процессов приводит к регенерации пула CD4⁺ Т-лимфоцитов в организме ВИЧ-позитивных людей [46] и, как следствие, сокращению риска заболеваемости и смерти [380].

Восстановление иммунитета на фоне АРТ представляет собой трехфазный процесс. Первая фаза длится 10 недель [67] и характеризуется выраженным увеличением численности CD4⁺ Т-клеток в периферической крови: их прирост в месяц составляет около 20-30 единиц/мм³ [158]. Однако данный процесс связан не с восстановлением иммунной системы, а с перераспределением периферических CD4⁺ Т-лимфоцитов [47]. АРТ приводит к уменьшению уровня иммунной активации и, как следствие, подавлению экспрессии молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1 на поверхности CD4⁺ Т-клеток [73]. В результате, CD4⁺ Т-лимфоциты обретают способность покидать лимфоидные ткани и поступать в циркуляцию. Во второй фазе скорость прироста CD4⁺ Т-клеток снижается и составляет 5-10 клеток/мм³ в месяц [103]. С этого момента увеличение количества CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови отражает истинную регенерацию иммунной системы. По прошествии двух лет с начала терапии наступает третья фаза регенерации, при которой скорость пополнения пула CD4⁺ Т-лимфоцитов уменьшается до 2-5 единиц/мм³ в месяц. При условии, что пациент непрерывно получает терапию, его иммунная система способна реализовывать свой регенераторный потенциал как минимум 7 лет [241].

При приеме терапии регенерация CD4⁺ Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов преимущественно реализуется за счет гомеостатической пролиферации периферических CD4⁺ Т-клеток [221, 300, 301]. У ВИЧ-инфицированных больных, получающих АРТ, относительное количество делящихся клеток увеличивается в ряду: наивные CD4⁺ Т-лимфоциты < CD4⁺ Т-

клетки центральной памяти $< CD4^+$ Т-лимфоциты эффекторной памяти [346]. Как следствие, большинство клеток, продуцируемых на фоне АРТ, имеют фенотип $CD4^+CD45RO^+$ [398]. Численность $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти начинает активно восстанавливаться спустя 3-6 месяцев с начала терапии. Этот процесс сопровождается усилением иммунитета против оппортунистических инфекций [170, 222, 398], являющихся основной причиной смерти ВИЧ-инфицированных пациентов в стадии СПИД. Таким образом, при приеме АРТ гомеостатическая пролиферация $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти является ключевым механизмом, препятствующим развитию иммунодефицита и снижающим риск развития заболеваний и смерти.

Широкое применение АРТ обнажило серьезную проблему: не у всех пациентов подавление репликации ВИЧ приводит к восстановлению иммунной системы. У части ВИЧ-инфицированных больных (по различным данным от 10 до 40 % [47, 206, 320, 406]) численность $CD4^+$ Т-клеток в периферической крови не достигает уровня 350 единиц/ $мм^3$, несмотря на годы вирусологически эффективного лечения [83]. Таких пациентов в литературе обозначают термином «иммунологические неответчики» (ИН) [87, 141]. Как и у пациентов со стандартным ответом на АРТ («иммунологических ответчиков» – ИО), у ИН репликация ВИЧ подавлена, а $CD4^+$ Т-лимфоциты памяти активно пролиферируют в ответ на лимфопению. Более того, доля пролиферирующих $CD4^+$ Т-клеток памяти в организме ИН, как правило, существенно выше, чем у ИО и здоровых людей [49, 252]. Тем не менее, у ИН интенсивная пролиферация не приводит к восстановлению пула $CD4^+$ Т-лимфоцитов. В результате, для ИН характерны развитие ассоциированных и не ассоциированных со СПИД заболеваний и повышенный риск смерти [141, 321, 362]. В настоящий момент не существует терапевтических стратегий, позволяющих увеличить качество и продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных пациентов с неполной регенерацией иммунитета в ответ на АРТ [77]. Поэтому особенно важно определить механизмы, препятствующие восстановлению численности $CD4^+$ Т-клеток в организме ИН.

Результаты современных исследований указывают на то, что отсутствие регенерации иммунитета у ИИ связано с непродуктивной пролиферацией CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти. Так, было показано, что у ИИ CD4⁺ Т-клетки памяти, находящиеся в активных фазах клеточного цикла, не способны завершить деление формированием дочерних клонов [411]. Кроме того, *in vitro* активация покоящихся CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти, полученных от ИИ, приводит к малопродуктивному и асимметричному делению [21]. Таким образом, в основе феномена иммунологического неответа на АРТ лежит нарушение основного регенераторного механизма – пролиферации CD4⁺ Т-клеток памяти; его механизмы остаются неизвестными. Ранее Younes и соавт. показали, что у ИИ снижение способности CD4⁺ Т-клеток к продуктивному делению может быть связано с нарушением функции митохондрий [411]. Известно, что снижение митохондриальной активности препятствует пролиферации Т-лимфоцитов и приводит к их апоптозу [111, 226, 338]. Впоследствии проблема иммунологического неответа на АРТ с точки зрения метаболизма никем подробно не рассматривалась. Настоящее исследование будет посвящено определению метаболических свойств CD4⁺ Т-клеток памяти, полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов со слабой регенерацией иммунной системы в ответ на АРТ.

1.2 – Метаболическое обеспечение пролиферации

Пролиферация представляет собой процесс увеличения численности клеток путем митотического деления. Как правило, митоз сопровождается метаболической перестройкой, в ходе которой усиливается синтез нуклеиновых кислот, белков и липидов – «строительных материалов» для генетического аппарата, органелл и мембран дочерней клетки [391]. При этом способность клетки активно производить макромолекулы прямо влияет на возможность завершения деления: в большинстве случаев, клетки с дефицитом липидов [314], нуклеотидов [316] и белков [312, 410] подвергаются аресту клеточного цикла. Скорость и эффективность иммунного ответа во многом определяются

пролиферативным потенциалом Т-лимфоцитов. Поэтому в делящихся Т-клетках метаболические пути всегда адаптированы к активному биосинтезу.

Важным источником биосинтеза и энергии в клетке является глюкоза. Процесс окисления глюкозы – гликолиз – представляет собой последовательность из десяти ферментативных реакций, промежуточные продукты которых нередко выступают субстратами в побочных биосинтетических путях (рисунок 1.2.1) [234]. Так, глюкозо-6-фосфат может служить источником углерода в пентозофосфатном пути, обеспечивающим клетку 5-фосфорибозилпирофосфатом – важным компонентом пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов [142]. Другой промежуточный продукт гликолиза – 3-фосфоглицерат – может быть предшественником цистеина, серина и глицина, участвующих в синтезе белков и нуклеиновых кислот [330]. Кроме того, конечный продукт гликолиза – пировиноградная кислота – может преобразовываться в аминокислоту аланин [151]. Третьим классом соединений, продуцируемых из метаболитов гликолитического пути, являются глицеролипиды [225]. Их источником служит дигидроксиацетонфосфат – предшественник глицерол-3-фосфата.

Углерод, поступающий с глюкозой, необходим для протекания многих биосинтетических процессов, поэтому ее потребление и окисление в пролиферирующих клетках существенно усиливаются [174]. Полное окисление глюкозы завершается формированием двух молекул АТФ и двух молекул пировиноградной кислоты, которые могут подвергаться либо окислению, либо восстановлению [234]. Как правило, в присутствии кислорода пировиноградная кислота окисляется под действием пируватдегидрогеназного мультиферментного комплекса и формирует ацетил-коэнзим А (ацетил-КоА) [28]. Образованный ацетил-КоА служит источником углерода в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК), функционирование которого сопряжено с синтезом 36 молекул АТФ на одну молекулу глюкозы. Однако данное правило не распространяется на делящиеся Т-лимфоциты: несмотря на наличие кислорода в среде, такие клетки преобразуют большую часть глюкозы в молочную кислоту (рисунок 1.2.1). В этом случае энергетический выход гликолиза на одну молекулу глюкозы существенно

снижается и составляет две молекулы АТФ. В литературе данный феномен обозначается термином «аэробный гликолиз» [236].

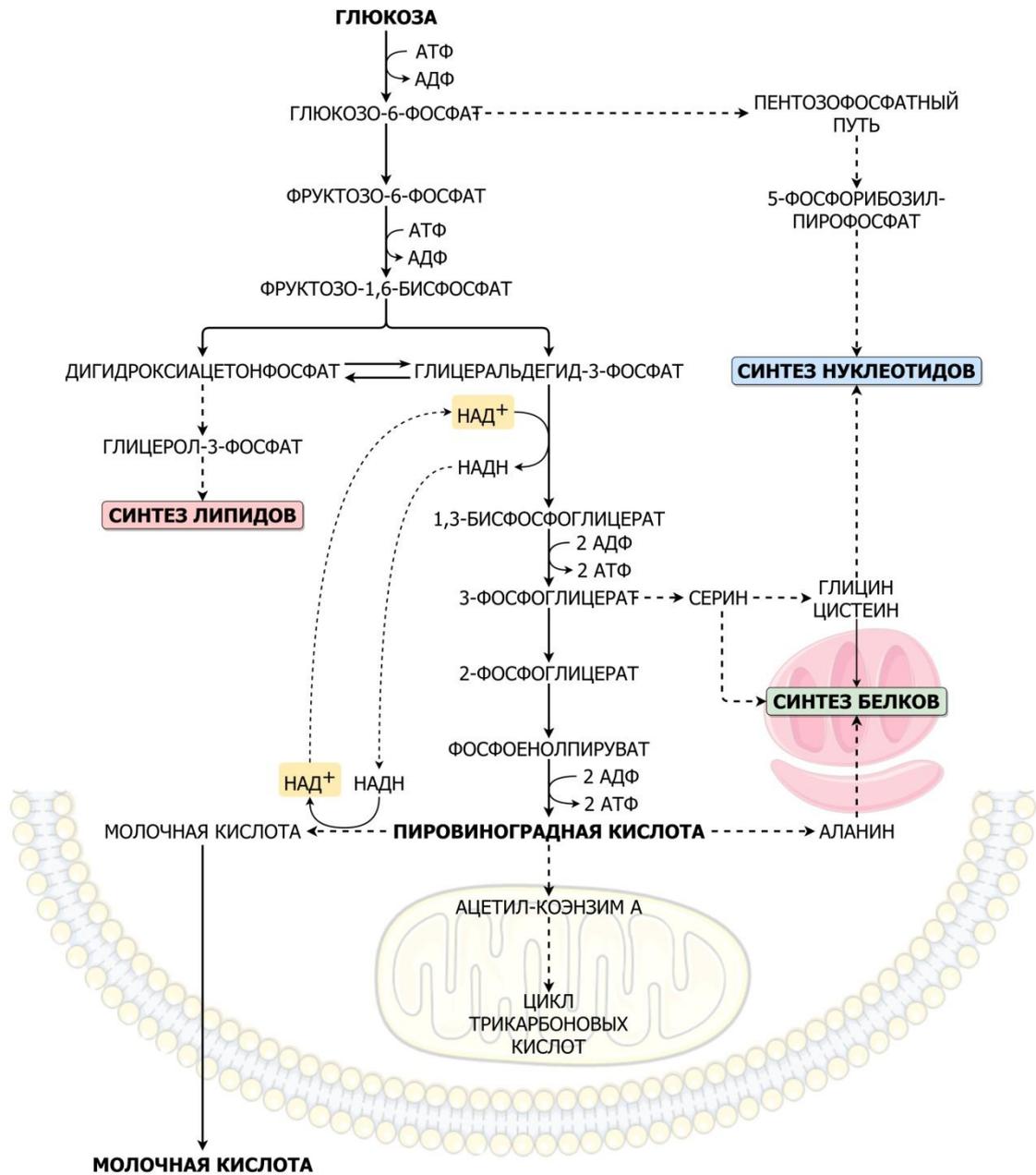


Рисунок 1.2.1 – Продукты гликолитических реакций и их роль в биосинтетических процессах

Использование аэробного гликолиза в качестве основного пути метаболизма глюкозы при пролиферации, на первый взгляд, кажется контрпродуктивным. В таком случае только 7 % углерода, поступающего с глюкозой, вовлечены в образование макромолекул [110, 185]. Более 90 % расходуется на продукцию молочной кислоты, которая экскретируется во внеклеточное пространство [69,

110]. Тем не менее, делящиеся Т-лимфоциты используют такой «расточительный» тип метаболизма для достижения важной цели – увеличения интенсивности гликолиза [243]. Существует целый ряд факторов, способных ограничить скорость гликолиза в клетке. Одним из основных является накопление конечного продукта гликолиза – пировиноградной кислоты [175, 402]. В покое Т-лимфоциты поддерживают гликолитическую активность, преимущественно окисляя этот продукт в ЦТК. Однако количество пировиноградной кислоты, которую можно реализовать таким способом, ограничено дыхательной емкостью митохондрий [84]. Пролиферирующие клетки снимают данное ограничение, преобразуя избыток пировиноградной кислоты в молочную и транспортируя ее во внеклеточное пространство [175]. Другим фактором, ограничивающим гликолитическую активность, является содержание окисленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАД^+) в цитоплазме. Полное окисление одной молекулы глюкозы требует двух молекул НАД^+ , служащих коферментами при превращении глицеральдегид-3-фосфата в 1,3-бисфосфоглицериновую кислоту [372]. В ходе реакции НАД^+ переходит в восстановленную форму (НАДН), поэтому повторение гликолиза требует окисления кофермента. В пролиферирующих клетках регенерация цитозольного НАД^+ происходит при окислении НАДН в ходе реакции восстановления пировиноградной кислоты [228]. Таким образом, аэробный гликолиз исключает воздействие двух факторов, ограничивающих скорость окисления глюкозы: избытка пирувата и дефицита НАД^+ . В результате, в пролиферирующих Т-лимфоцитах увеличивается продукция АТФ вне митохондрий, а поток углерода через гликолитический путь и сопряженные с ним биосинтетические процессы существенно возрастает [390].

Активность митохондрий при пролиферации Т-клеток также существенно усиливается и дополняет гликолиз при синтезе макромолекул и энергии [89]. Так, в Т-лимфоцитах уже через 4 часа митогенной стимуляции возрастает концентрация промежуточных продуктов ЦТК [198]. ЦТК представляет собой узел пересечения большинства метаболических путей, в котором разнообразные

углеродные субстраты – производные глюкозы, глутамина и жирных кислот – участвуют в восстановлении доноров электронов для дыхательной цепи. Помимо этого, ЦТК является важным источником метаболитических субстратов, необходимых для синтеза аминокислот, жирных кислот, холестерина и нуклеотидов (рисунок 1.2.2) [107]. Так, лимонная кислота, формируемая в первой реакции ЦТК при взаимодействии щавелевоуксусной кислоты и ацетил-КоА, участвует в *de novo* синтезе жирных кислот [397]. Образованная в митохондриях лимонная кислота транспортируется в цитоплазму, где подвергается ферментативному расщеплению на исходные соединения: ацетил-КоА и щавелевоуксусную кислоту [311]. В цитоплазме ацетил-КоА превращается в малонил-КоА, осуществляющий удлинение углеродной цепи жирных кислот [344]. Помимо этого, цитоплазматический ацетил-КоА может участвовать в формировании 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА – предшественника мевалоновой кислоты и, соответственно, холестерина [183]. Упомянутая выше щавелевоуксусная кислота также поддерживает процессы биосинтеза в делящихся клетках. В реакции трансаминирования данный субстрат преобразуется в аспарагиновую кислоту, используемую при построении белков и нуклеотидов [31].

В пролиферирующих клетках промежуточные продукты ЦТК активно используются в побочных биосинтетических реакциях, поэтому для поддержания данного метаболитического пути необходим постоянный приток углерода. Его основным источником в делящихся клетках является самая распространенная в организме аминокислота – глутамин [305]. В пролиферирующих клетках ее потребление возрастает в 5-10 раз [82]. Углеродный скелет глутамина включается в ЦТК в виде α -кетоглутаровой кислоты (рисунок 1.2.2), которая способна преобразовываться в продукты нисходящих реакций, либо пополнять пул лимонной кислоты. В структуре глутамин присутствуют две азотсодержащие группы, поэтому его превращение в α -кетоглутаровую кислоту представляет собой две последовательные реакции дезаминирования [109]. Продуктами первой реакции являются глутаминовая кислота и аммиак. В пролиферирующих клетках

аммиак участвует в образовании карбамоилфосфата – основы пиримидинового кольца [365]. Азот, высвобождающийся при дезаминировании глутаминовой кислоты, также участвует в биосинтетических процессах, в частности – в превращении кетокислот в аминокислоты. Так, глутаминовая кислота является донором азота для пировиноградной, 3-фосфоглицериновой и щавелевоуксусной кислот, образующих аланин, серин и аспарагиновую кислоту соответственно [412].

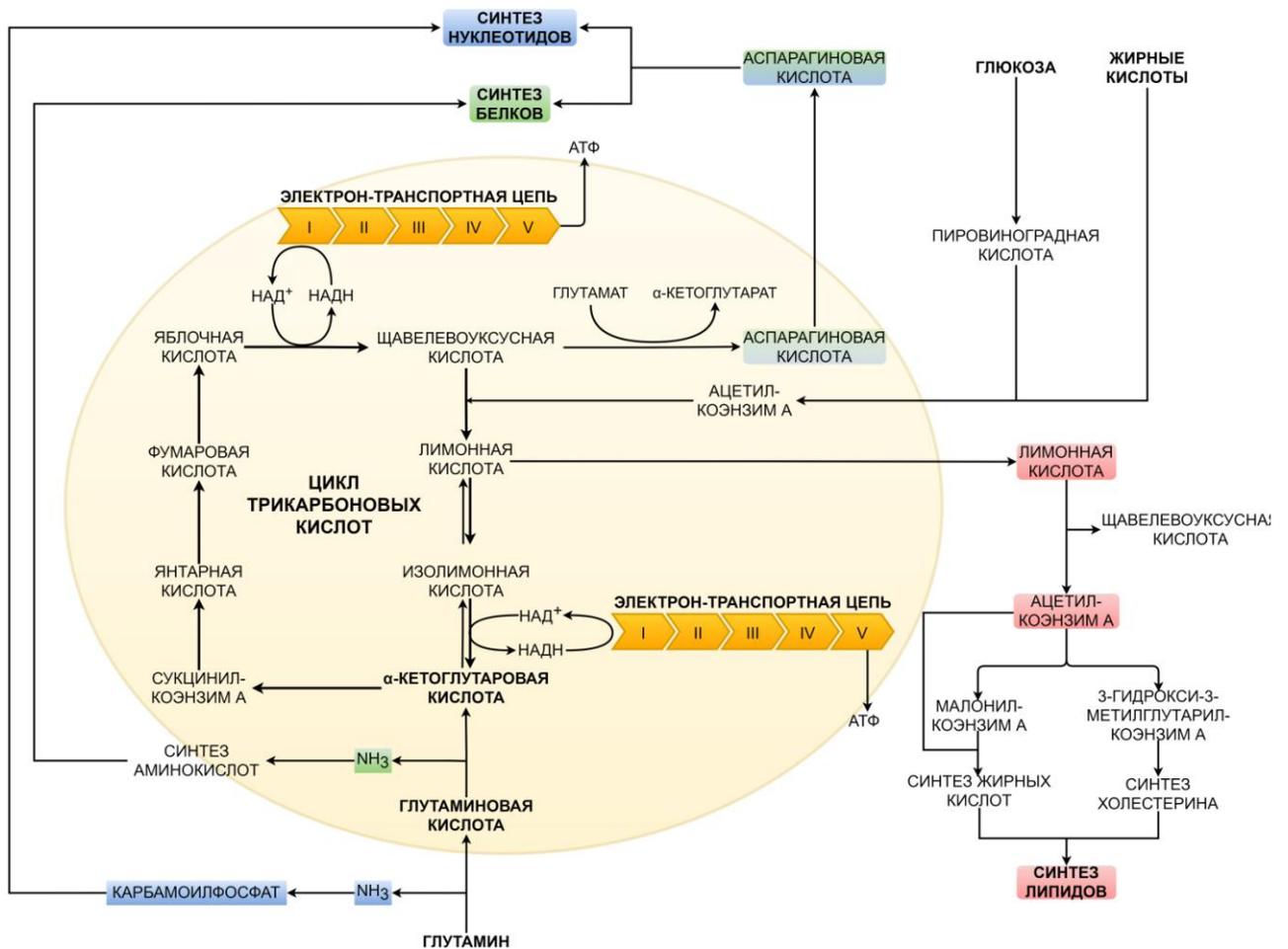


Рисунок 1.2.2 – Промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот и их роль в биосинтетических процессах

По аналогии с гликолизом, функционирование ЦТК существенно зависит от баланса между окисленной и восстановленной формой НАД [79]. НАД⁺ является коферментом при превращении α-кетоглутаровой кислоты в сукцинил-КоА [373], а также яблочной кислоты в щавелевоуксусную [404]. В ходе данных реакций НАД переходит из окисленной формы в восстановленную (НАДН) и становится

потенциальным донором электронов для дыхательной цепи митохондрий [404]. В отсутствие кофермента дегидрирование α -кетоглутаровой и яблочной кислот не происходит, поэтому повторение цикла всегда требует восполнения пула НАД⁺ [33, 257]. В связи с этим, в пролиферирующих клетках усиление работы ЦТК, как правило, сопровождается повышением активности дыхательной цепи, окисляющей НАДН [197, 409]. Стоит отметить, что ранее усиление работы электрон-транспортной цепи митохондрий связывали исключительно с потребностью делящихся клеток в энергии. Тем не менее, последние исследования показывают, что именно способность дыхательной цепи восстанавливать пул НАД⁺ является фактором, лимитирующим пролиферацию [62]. Так, было установлено, что ингибиторы митохондриального дыхания вызывают в опухолевых клетках арест клеточного цикла, снижение соотношения НАД⁺/НАДН, а также падение концентрации промежуточных продуктов ЦТК и их производных, в частности – аспарагиновой кислоты. Аспарагиновая кислота имеет большое значение в синтезе пуриновых нуклеотидов, поэтому ее дефицит при недостатке НАД⁺ приводит к остановке деления на стадии репликации ДНК. Таким образом, при пролиферации клетки метаболические пути, сопряженные с продукцией энергии, активно поддерживают процессы биосинтеза.

Помимо промежуточных продуктов гликолиза и ЦТК, важным источником биосинтетических молекул также являются продукты метаболизма одноуглеродных остатков (англ. one-carbon metabolism) [240]. Метаболизм одноуглеродных остатков объединяет фолатный цикл и цикл метионина и представляет собой своеобразный «распределительный центр» углерода. Источником углерода в данном случае является аминокислота серин [199], а акцепторами выступают метаболические продукты, соединяющие фолатный цикл и цикл метионина с путями биосинтеза нуклеотидов, белков и липидов (рисунок 1.2.3) [240]. Так, производное фолиевой кислоты – 5,10-метилентетрагидрофолат – переносит метильную группу серина на дезоксиуридинмонофосфат, что приводит к образованию дезокситимидинмонофосфата [371]. В свою очередь, 10-формилтетрагидрофолат участвует в биосинтезе пуриновых нуклеотидов [52].

Кроме того, при участии одноуглеродных остатков серина протекает формирование фосфатидилхолина – основного компонента всех клеточных мембран [385]. Наконец, функционирование фолатного цикла и цикла метионина также сопряжено с образованием ряда аминокислот, в том числе глицина, гомоцистеина и цистеина [128]. В связи с этим, при пролиферации интенсивность метаболизма одноуглеродных остатков существенно возрастает [338].

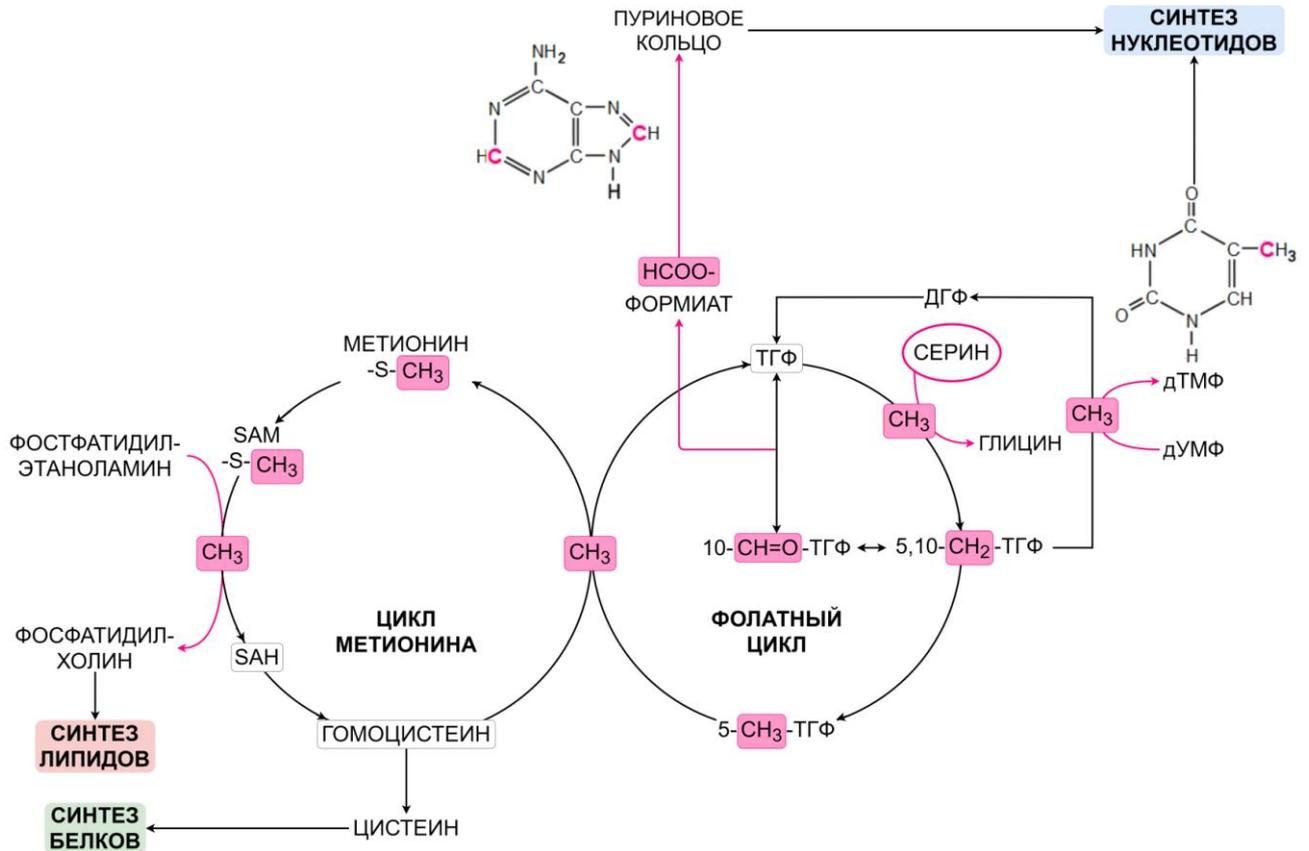


Рисунок 1.2.2 – Метаболизм одноуглеродных остатков и его роль в биосинтетических процессах

Примечания: одноуглеродные остатки выделены на рисунке розовым цветом; ДГФ – дигидрофолат, ТГФ – тетрагидрофолат, дУМФ – дезоксиуридинмонофосфат, дТМФ – дезокситимидинмонофосфат, SAM – S-аденозилметионин, SAH – S-

Поддержание активности всех описанных биосинтетических путей требует поступления в клетку большого количества метаболических субстратов. Поэтому на поверхности пролиферирующих клеток, в сравнении с покоящимися, существенно возрастает экспрессия белков, осуществляющих транспорт глюкозы и глутамина [191, 331]. В делящихся иммунокомпетентных клетках перенос глюкозы преимущественно осуществляется белком Glut1 [245]. В транспорте

глутамин и других нейтральных аминокислот при пролиферации основная роль принадлежит ASCT2 (англ. Alanine, Serine, Cysteine Transporter 2 – аланин-серин-цистеин транспортер 2), известному также как SLC1A5 [354]. Помимо глюкозы и глутамин, пролиферирующие клетки также способны потреблять из внешней среды жирные кислоты [286, 408]. Перенос жирных кислот в клетку осуществляется транспортером CD36 и семейством белков FABP (англ. fatty acid binding proteins – белки, связывающие жирные кислоты) [182]. Однако в настоящий момент роль жирных кислот в процессах биосинтеза остается спорной. Так, на примере Th17-лимфоцитов было показано, что при пролиферации *in vitro* аккумуляция липидов в таких клетках преимущественно происходит путем их биосинтеза *de novo* [60]. В то же время, регуляторные Т-клетки, делящиеся *in vitro*, активно потребляют жирные кислоты из внешней среды и используют эти субстраты для построения фосфолипидов [60]. Таким образом, вопрос о роли экзогенных жирных кислот в пролиферации разных субпопуляций Т-лимфоцитов остается открытым для дальнейшего изучения.

Представленные данные демонстрируют, что переход покоящихся клеток к делению сопровождается усилением большинства биосинтетических процессов, каждый из которых вносит уникальный вклад в образование нуклеотидов, белков и липидов, необходимых для воспроизведения материнской клетки. Как следствие, нарушение активности любого из перечисленных метаболических путей способно привести к остановке деления. Так, пролиферации клеток препятствуют ингибиторы транспорта глюкозы и глутамин [293], окислительного фосфорилирования [62], гликолиза и глутаминолиза [62, 153]. Кроме того, ингибиторы ферментов, участвующих в синтезе жирных кислот, холестерина и продуктов метаболизма одноуглеродных остатков, также подавляют деление [88, 169, 338]. В связи с этим, угнетение анаболизма клеток нередко связано с потерей регенераторного потенциала тканей [232, 358], развитием заболеваний [220, 235, 318] и старением организма [42, 168, 171].

Процесс пролиферации имеет особое значение в функционировании Т-лимфоцитов. В отличие от многих других типов клеток, клетки адаптивного

иммунитета делятся не только при регенерации собственной популяции, но и при осуществлении иммунного ответа [74]. Как следствие, стимулированные Т-лимфоциты являются второй по распространенности моделью для изучения метаболического обеспечения пролиферации и уступают только опухолевым клеточным линиям [246]. Первая работа, посвященная метаболизму делящихся иммунокомпетентных клеток, была опубликована в 1958 году [394]. В данной публикации Варбург, впервые описавший феномен аэробного гликолиза в раковых клетках, отметил, что митогенная стимуляция лейкоцитов также сопровождается усилением продукции молочной кислоты. Позднее было показано, что стимуляция Т-лимфоцитов фитогемагглютинином в течение 4 часов приводит к увеличению потребления глюкозы вдвое, при этом большая ее часть окисляется в ходе аэробного гликолиза [173]. В настоящий момент известно, что в ответ на стимуляцию в Т-клетках, помимо аэробного гликолиза, усиливается окислительное фосфорилирование и глутаминолиз, активность ЦТК, пентозофосфатного и мевалонатного пути, а также метаболизм одноуглеродных остатков. В результате, спустя 24 часа после стимуляции размер Т-лимфоцитов значительно увеличивается [156], а содержание клеточных белков удваивается [298]. Через 30-48 часов с момента активации метаболическая перестройка Т-лимфоцитов завершается генерацией первой дочерней популяции [180].

Необходимо отметить, что в разных субпопуляциях Т-клеток обеспечение пролиферации может осуществляться различными метаболическими программами. Так, известно, что как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-лимфоциты при стимуляции ТКР усиливают потребление глюкозы. Однако активированные CD4⁺ Т-клетки человека обладают существенно большим гликолитическим потенциалом, чем CD8⁺ Т-лимфоциты, и интенсивнее производят молочную кислоту *in vitro* [197]. Причины, обуславливающие повышенный уровень аэробного гликолиза в стимулированных CD4⁺ Т-клетках, в настоящий момент остаются неизвестными. Стоит отметить, что Сао *et al.*, исследуя активированные Т-лимфоциты мыши, получили противоположные результаты: стимулированные CD8⁺ Т-клетки производили молочную кислоту интенсивнее, чем CD4⁺ Т-

лимфоциты в аналогичных условиях [81]. Представленные данные подчеркивают, что при выборе модели для исследования метаболизма Т-клеток необходимо учитывать возможные межвидовые различия.

Помимо этого, особое внимание в литературе уделяется отличиям между метаболизмом конвенциональных и регуляторных CD4⁺ Т-клеток. В покое обе субпопуляции Т-лимфоцитов отличаются низкой метаболической активностью и используют энергию, полученную в ходе окислительного фосфорилирования, для поддержания своей жизнедеятельности. При этом конвенциональные CD4⁺ Т-лимфоциты отличаются высоким уровнем экспрессии транспортера Glut1 и используют глюкозу в качестве основного источника углерода, в то время как регуляторные CD4⁺ Т-клетки слабо экспрессируют Glut1 и получают энергию преимущественно путем β -окисления жирных кислот [271]. При пролиферации экспрессия Glut1 на поверхности регуляторных клеток усиливается, что сопровождается существенным увеличением уровня аэробного гликолиза [144]. В результате, регуляторные CD4⁺ Т-лимфоциты при делении приобретают уникальный метаболический профиль, характеризующийся одновременным протеканием анаболических (аэробный гликолиз) и катаболических (β -окисление жирных кислот) процессов [325]. В то время как в конвенциональных CD4⁺ Т-клетках при пролиферации преобладает анаболизм.

Существенно меньше известно о том, чем метаболизм пролиферирующих наивных CD4⁺ Т-клеток отличается от такового в клетках памяти. CD4⁺ Т-клетки памяти играют основную роль в реализации иммунного ответа при повторном проникновении патогена в организм: в сравнении с наивными CD4⁺ Т-лимфоцитами, такие клетки быстрее достигают пика экспансии и активнее производят цитокины [327, 369, 401]. Известно, что CD4⁺ Т-лимфоциты памяти обладают рядом адаптаций, позволяющих им быстрее увеличивать число собственных клонов при повторном иммунном ответе. Так, CD4⁺ Т-клетки памяти имеют более низкий, в сравнении с наивными клетками, порог активации и меньше зависят от ко-стимулирующих сигналов [105, 249]. С учетом того, что характер метаболизма клеток во многом определяет их способность к

пролиферации, закономерно предположить, что обменные процессы активированных CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти также адаптированы к ускоренному делению. Однако в настоящий момент количество работ, посвященных данному вопросу, слишком мало, чтобы подтвердить данную гипотезу.

Из вышесказанного следует, что метаболические свойства Т-лимфоцитов во многом определяют их способность к делению. Поэтому при исследовании нарушений, связанных с сокращением пролиферативного потенциала Т-клеток, все больше исследователей обращаются к оценке их метаболизма [337, 356, 405]. При ВИЧ-инфекции проблема регенерации Т-лимфоцитов имеет особое значение: глубокая лимфопения, формирующаяся на фоне инфекции, уносит более полумиллиона жизней ежегодно [377]. Недостаточная эффективность компенсаторных механизмов, направленных на восстановление численности Т-клеток в организме ВИЧ-инфицированных людей, вызывает существенное отягощение в развитии заболевания. Механизмы данных нарушений до сих пор не ясны и с точки зрения метаболизма ранее глубоко не изучались. Настоящая работа будет посвящена определению метаболических свойств Т-лимфоцитов ВИЧ-позитивных больных и их связи с регенерацией иммунитета.

1.3 – Метаболизм Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции

Воспроизведение большинства вирусов – в том числе, вируса иммунодефицита человека – обеспечивается ресурсами клетки-хозяина. Так, обратная транскрипция и репликация ВИЧ осуществляются за счет нуклеотидов, синтезируемых инфицированной клеткой [270]; структурные и функциональные белки вируса образуются с использованием произведенных клеткой-мишенью аминокислот [157]; оболочка ВИЧ формируется из липидных рафтов, на построение которых инфицированная клетка затрачивает большое количество холестерина [349, 419]. Иными словами, эффективное производство вирусных частиц возможно только в клетках с высоким уровнем анаболизма [200]. Наиболее интенсивно анаболические процессы протекают в активированных

клетках. В соответствии с этим, попадая в организм, ВИЧ размножается преимущественно в активированных CD4⁺ Т-лимфоцитах [211, 359].

Известно, что не все активированные CD4⁺ Т-клетки одинаково перmissive по отношению к ВИЧ. Так, наивные CD4⁺ Т-лимфоциты, стимулированные через ТКР, не подвержены инфицированию, в то время как в CD4⁺ Т-клетках памяти аналогичный сигнал приводит к репликации ВИЧ [335]. Эти отличия, по крайней мере отчасти, обусловлены различиями в метаболизме данных клеток. Так, в субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов активность гликолиза и окислительного фосфорилирования возрастает в направлении наивные Т-лимфоциты → Т-лимфоциты центральной памяти → Т-лимфоциты эффекторной памяти [343, 382]. В связи с этим, активированные CD4⁺ Т-клетки эффекторной памяти, как клетки с наибольшей метаболической активностью, являются основным источником новых вирусных частиц [99]. Известно, что наибольшее количество CD4⁺ Т-лимфоцитов эффекторной памяти локализовано в кишечнике [218]. Более того, в окружении множества пищевых и микробных антигенов такие клетки нередко находятся в активированном состоянии [279, 388, 393]. В связи с этим, экспансия ВИЧ, как правило, начинается с поражения желудочно-кишечного тракта [72, 266]. Скопление большей части всех перmissive к вирусу клеток в одном анатомическом сайте приводит к тому, что в острой фазе заболевания ВИЧ стремительно размножается, при этом вирусная нагрузка может достигать пика уже спустя 10 дней с начала инфекции [262].

Ранее отмечалось, что пораженные ВИЧ CD4⁺ Т-клетки имеют малую продолжительность жизни и погибают путем апоптоза вскоре после инфицирования. Примечательно, что цитопатическое действие ВИЧ в отношении CD4⁺ Т-лимфоцитов преимущественно реализуется путем подавления дыхательной функции митохондрий [355]. Так, было показано, что апоптоз ВИЧ-инфицированных клеток связан со снижением экспрессии субъединицы NDUFA6 комплекса I дыхательной цепи и уменьшением активности данного комплекса, а также с деполяризацией мембраны митохондрий [219]. Вследствие цитопатического действия ВИЧ, его активная репликация в острой фазе

заболевания приводит к опустошению пула $CD4^+$ Т-лимфоцитов кишечника спустя 14 дней с момента инфицирования [262]. В результате потери большинства клеток-мишеней, способных к поддержанию репликации ВИЧ, а также ответа со стороны иммунной системы [265], вирусная нагрузка в плазме крови ВИЧ-инфицированных пациентов начинает снижаться. Данный процесс может продолжаться около 6 недель, пока уровень вирусной нагрузки не достигнет стабильного значения, называемого установочной точкой [37].

Высота установочной точки вирусной нагрузки во многом определяется метаболической активностью $CD4^+$ Т-лимфоцитов, сохранившихся в организме ВИЧ-инфицированных пациентов. Guo *et al.* установили, что этот показатель прямо связан с экспрессией генов, вовлеченных в процесс окислительного фосфорилирования и гликолиза, в $CD4^+$ Т-клетках ВИЧ-позитивных больных [160]. Более того, уровень экспрессии этих генов позволял прогнозировать не только высоту установочной точки вирусной нагрузки, но и скорость прогрессии заболевания в стадию СПИД. Авторы также установили, что введение ингибиторов окислительного фосфорилирования (таких как метформин, ротенон или антимицин А) и гликолиза (2-дезоксиглюкозы) гуманизированным мышам с острой ВИЧ-инфекцией приводит к снижению вирусной нагрузки в установочной точке. В совокупности представленные данные подчеркивают, что размножение ВИЧ в организме человека ограничено содержанием клеток, метаболизм которых способен обеспечить его репликацию.

В организме здорового человека активированные $CD4^+$ Т-лимфоциты с высоким уровнем анаболизма присутствуют постоянно. Тем не менее, их количества, вероятно, было бы недостаточно, чтобы годами поддерживать репликацию ВИЧ. Вирус преодолевает данное ограничение с помощью целого ряда механизмов, направленных на активацию $CD4^+$ Т-клеток. В первую очередь стоит отметить, что сам вирус, а также его белки – Tat [303], Nef [307] и gp120 [147] – обладают способностью активировать $CD4^+$ Т-лимфоциты. Кроме того, ранее отмечалось, что массовая гибель $CD4^+$ Т-клеток, вызванная активной репликацией ВИЧ в острой фазе инфекции, сопровождается транслокацией

микробных продуктов из кишечника в циркуляцию и также приводит к активации покоящихся $CD4^+$ Т-лимфоцитов. Среди других механизмов, способствующих образованию $CD4^+$ Т-клеток с высоким уровнем анаболизма в организме ВИЧ-позитивных больных, также были отмечены сторонняя активация и воздействие коинфицирующих агентов, более детально описанные в разделе 1.1. Таким образом, хронический характер ВИЧ-инфекции во многом обусловлен тем, что данный вирус способен постоянно создавать благоприятные условия для собственного размножения.

В настоящий момент становится очевидным, что длительное воздействие ВИЧ на организм инфицированных пациентов приводит к существенному изменению метаболических свойств $CD4^+$ Т-клеток. Так, Palmer *et al.* установили, что у ВИЧ-инфицированных пациентов, в сравнении со здоровыми донорами, повышается уровень аэробного гликолиза в $CD4^+$ Т-лимфоцитах [260, 310]. В частности, авторы показали, что $CD4^+$ Т-клетки ВИЧ-позитивных больных отличаются от соответствующих лимфоцитов здоровых людей повышенной экспрессией транспортера глюкозы Glut1, усиленным потреблением глюкозы и активным формированием молочной кислоты. При этом как усиление экспрессии Glut1, так и увеличение потребления глюкозы были связаны с экспрессией маркеров активации на поверхности $CD4^+$ Т-лимфоцитов [310]. В $CD8^+$ Т-клетках подобных отличий авторами обнаружено не было, несмотря на то, что уровень их активации при ВИЧ-инфекции, как правило, повышен. Из этого следует, что влияние ВИЧ-инфекции на метаболизм Т-лимфоцитов в разных субпопуляциях может проявляться неодинаково.

Ранее отмечалось, что, в случае активации $CD4^+$ Т-лимфоцитов, вместе с усилением аэробного гликолиза также возрастает интенсивность митохондриального дыхания. Тем не менее, при хронической ВИЧ-инфекции увеличение уровня активации в субпопуляции $CD4^+$ Т-клеток не приводит к усилению дыхательной функции митохондрий. Напротив, было показано, что у ВИЧ-инфицированных пациентов, в сравнении со здоровыми людьми, $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоциты характеризуются пониженным уровнем дыхания и меньшей

максимальной дыхательной емкостью митохондрий [139, 210]. Кроме того, CD4⁺ Т-клетки ВИЧ-позитивных больных, в сравнении с таковыми здоровых людей, отличаются повышенной массой митохондрий и усиленной продукцией активных форм кислорода (АФК) [414]. Сокращение респираторной активности Т-клеток, вероятно, может быть связано с общим снижением экспрессии митохондриального комплекса I в мононуклеарных клетках периферической крови ВИЧ-инфицированных людей [139]. Этот белковый комплекс обеспечивает поступление большей части электронов в дыхательную цепь; ротенон – ингибитор комплекса I – известен способностью усиливать продукцию АФК [274]. В настоящий момент механизмы, приводящие к снижению дыхательной функции митохондрий в Т-лимфоцитах ВИЧ-инфицированных пациентов, остаются неизвестными.

Из представленных выше данных можно сделать следующее заключение. Размножение ВИЧ зависит от уровня анаболической активности клетки-хозяина. В связи с этим, ВИЧ преимущественно инфицирует активированные клетки эффекторной памяти, демонстрирующие наибольший уровень гликолиза и окислительного фосфорилирования в субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов. Пораженные вирусом CD4⁺ Т-клетки неизбежно погибают, что приводит к снижению количества мишеней, доступных для репликации ВИЧ. Вирус преодолевает данное ограничение, активируя прежде непермиссивные покоящиеся CD4⁺ Т-лимфоциты – как напрямую, так и опосредованно, усиливая бактериальную транслокацию, стороннюю активацию и содержание коинфицирующих агентов в организме. Способность создавать благоприятные условия для собственного размножения позволяет ВИЧ персистировать в организме в течение многих лет. В результате такого продолжительного воздействия, в CD4⁺ Т-клетках ВИЧ-инфицированных людей существенно изменяется метаболическая активность: усиливается аэробный гликолиз и снижается респираторная активность митохондрий.

Назначение АРТ ВИЧ-позитивным больным, в большинстве случаев, приводит к подавлению репликации вируса [102]. Вместе с тем снижается

способность ВИЧ воздействовать на метаболизм Т-клеток. Palmer *et al.* показали, что при непрерывном приеме терапии у ВИЧ-положительных больных в CD4⁺ Т-лимфоцитах снижается уровень гликолиза, о чем свидетельствует сокращение доли клеток, экспрессирующих Glut1 [259, 310], а также уменьшение количества потребляемой ими глюкозы [310]. Кроме того, под действием АРТ в CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах ВИЧ-инфицированных больных также возрастает интенсивность митохондриального дыхания [210]. Тем не менее, в большинстве случаев терапия не приводит к полной нормализации метаболических показателей: интенсивность гликолиза и окислительного фосфорилирования в CD4⁺ Т-клетках ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих АРТ, как правило, не достигает аналогичных показателей здоровых лиц [210, 310]. Данное явление может быть обусловлено тем, что уровень активации CD4⁺ Т-лимфоцитов у ВИЧ-положительных больных, получающих терапию, в сравнении со здоровыми людьми, сохраняется повышенным [100, 188, 288].

Необходимо также отметить, что для ВИЧ-положительных пациентов прием АРТ *per se* становится дополнительным фактором, влияющим на метаболизм CD4⁺ Т-лимфоцитов. Это связано с тем, что антиретровирусные препараты нередко характеризуются митохондриальной токсичностью [355]. Показано, что нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы Зидовудин вызывает в Т-клетках снижение содержания митохондриальной ДНК и, как следствие, сокращение дыхательной активности [59]. Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы – Эфавиренз и Невирапин – вызывают в клетках окислительный стресс, увеличение массы и снижение мембранного потенциала митохондрий [41, 201, 322]. Ингибиторы протеазы также характеризуются способностью вызывать окислительный стресс [65, 332, 420]. Терапия на основе Ритонавира, Индинавира или Саквинавира приводит к увеличению продукции АФК, снижению мембранного потенциала митохондрий и нарушению работы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) в CD4⁺ Т-лимфоцитах [122, 210]. Под действием Атазанавира в клетках также усиливается аутофагия [145]. Ингибиторы интегразы – Долутегравир и Элвитегравир – подавляют митохондриальное дыхание в CD4⁺

Т-клетках и стимулируют продукцию АФК [210]. Таким образом, прием АРТ, независимо от класса препарата, предрасполагает ВИЧ-инфицированных пациентов к повышенному риску нарушения функции митохондрий в Т-лимфоцитах.

Как уже было отмечено ранее, у ВИЧ-позитивных людей регенерация $CD4^+$ Т-клеток при приеме терапии реализуется преимущественно путем пролиферации $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти. Однако в организме ИИ, в отличие от пациентов со стандартным ответом на терапию, пролиферация данных клеток завершается непродуктивно и не приводит к увеличению числа $CD4^+$ Т-лимфоцитов [411]. Поскольку способность $CD4^+$ Т-клеток к делению во многом определяется активностью анаболических процессов, закономерно предположить, что слабое восстановление численности $CD4^+$ Т-лимфоцитов у ИИ может быть связано с метаболическими изменениями, развивающимися в данных клетках на фоне ВИЧ-инфекции. Здесь важно подчеркнуть, что, согласно современным исследованиям, у ВИЧ-инфицированных неответчиков изменение метаболических свойств $CD4^+$ Т-клеток может быть выражено в большей степени, чем у пациентов со стандартным ответом на терапию. Так, было установлено, что у ИИ, в сравнении с ИО и здоровыми добровольцами, повышена экспрессия транспортера Glut1 на поверхности $CD4^+$ Т-клеток [259]. Кроме того, у ИИ, при их сравнении с ИО и здоровыми людьми, существенно снижена экспрессия генов, обеспечивающих эффективное функционирование митохондрий, в делящихся $CD4^+$ Т-лимфоцитах памяти [411, 418]. Данные транскриптомного анализа позднее подтвердились на уровне протеома: было установлено, что $CD4^+$ Т-лимфоциты памяти ИИ, в отличие от таковых ИО, характеризуются сниженным содержанием белков, вовлеченных в работу электрон-транспортной цепи, функционирование ЦТК и ответ на окислительный стресс [49]. Представленные данные указывают на то, что в $CD4^+$ Т-клетках памяти ВИЧ-инфицированных пациентов со слабым восстановлением иммунной системы в ответ на АРТ, может быть нарушена активность многих митохондриальных путей метаболизма.

Возможным механизмом, препятствующим регенерации $CD4^+$ Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных ИИ, является истощение данных клеток [308]. Истощение Т-лимфоцитов, как правило, заключается в постепенном снижении их функциональной активности: сокращении продукции цитокинов и потере пролиферативного потенциала [40, 383]. Фенотипически истощенные Т-клетки отличаются от «здоровых» Т-лимфоцитов усиленной экспрессией ингибирующих рецепторов, таких как PD-1, TIGIT, Tim-3, CTLA-4, LAG-3 [400]. Среди факторов, способных привести к истощению, в настоящий момент отмечают хроническую антигенную стимуляцию [284], гипоксию [54], а также недостаток питательных веществ во внеклеточной среде [132]. Ранее отмечалось, что в организме ВИЧ-инфицированных пациентов $CD4^+$ Т-лимфоциты подвергаются постоянной стимуляции со стороны ВИЧ, его белков, микробных продуктов, коинфицирующих агентов и провоспалительных цитокинов. В соответствии с этим, при хронической ВИЧ-инфекции содержание истощенных $CD4^+$ Т-клеток в организме человека существенно повышено [101, 125]. У ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих АРТ, подавление репликации вируса и уменьшение активации иммунной системы сопровождаются снижением уровня истощения в субпопуляции $CD4^+$ Т-лимфоцитов. Тем не менее, у ИИ, в сравнении с пациентами со стандартным ответом на терапию, содержание истощенных $CD4^+$ Т-клеток сохраняется повышенным [101, 150, 346]. Более того, установлено, что существует негативная корреляционная связь между содержанием истощенных $CD4^+$ Т-лимфоцитов и общей численностью $CD4^+$ Т-клеток в периферической крови ВИЧ-позитивных больных [381].

В настоящий момент общепризнано, что функциональное истощение Т-лимфоцитов сопровождается метаболическими нарушениями [57, 111, 356]. Истощенные Т-клетки, как правило, характеризуется пониженной экспрессией транскрипционного коактиватора PGC1- α , регулирующего биогенез митохондрий, а также экспрессию многих генов, кодирующих компоненты дыхательной цепи и ферменты ЦТК [227, 357, 386, 403]. Помимо этого, в данных клетках повышены масса митохондрий и продукция АФК, а также снижены

показатели трансмембранного потенциала, активности дыхательной цепи и резервной дыхательной емкости митохондрий [57, 132, 263, 360]. Предполагается, что описанные сдвиги в работе митохондрий не только сопровождают, но и, что более важно, вызывают функциональное истощение Т-лимфоцитов [263]. Действительно, ранее Vardhana *et al.* показали, что восстановление респираторной активности митохондрий в истощенных Т-клетках приводит к усилению их эффекторной функции и повышению их пролиферативного потенциала [383]. В свете представленных фактов можно предположить, что у ИН выраженное истощение и нарушение регенерации CD4⁺ Т-лимфоцитов могут быть связаны со схожими метаболическими нарушениями. В пользу данной гипотезы свидетельствует тот факт, что у ВИЧ-инфицированных людей увеличение доли истощенных клеток ассоциировано со снижением интенсивности митохондриального дыхания в CD4⁺ Т-лимфоцитах [210]. Более того, ранее численность CD4⁺ Т-клеток в организме ВИЧ-позитивных больных уже связывали с нарушением митохондриальной активности иммунокомпетентных клеток. Позитивная корреляционная связь была установлена с содержанием комплекса I и уровнем митохондриального дыхания в мононуклеарных клетках периферической крови [139], а негативная – с содержанием АФК в CD4⁺ Т-клетках [190].

Представленные данные позволяют заключить, что у ВИЧ-инфицированных пациентов с дискордантным ответом на АРТ метаболические свойства CD4⁺ Т-лимфоцитов могут быть изменены. Данные изменения, предположительно, вызваны истощением CD4⁺ Т-клеток. Ранее метаболические особенности, ассоциированные с истощением, были установлены для опухолев-инфильтрирующих CD8⁺ Т-лимфоцитов [356], а также CD8⁺ Т-клеток, специфичных к вирусу гепатита В [129] и вирусу лимфоцитарного хориоменингита [58]. Тем не менее, у ВИЧ-инфицированных ИН наличие метаболических изменений, характерных для истощенных Т-лимфоцитов, установлено не было. Известно, что функциональная активность и пролиферативный потенциал Т-клеток определяются активностью целого ряда метаболических процессов: митохондриального дыхания [383], синтеза [96] и

окисления жирных кислот [315], гликолиза [272], глутаминолиза [99] и аутофагии [264]. Особенности их протекания в Т-лимфоцитах ВИЧ-инфицированных пациентов с дискордантным ответом на терапию остаются неизвестными. Изучению некоторых из этих процессов будет посвящена настоящая работа.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ
В ГЛАВЕ 1

*Публикации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в
международных базах данных Scopus, RSCI:*

1. 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).

ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Формирование клинических групп

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»). Работы по сбору биоматериала и анализу медицинских карт выполнены на базе ГКУЗ «Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями». 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), без ВГС-коинфекции. В зависимости от эффективности иммунологического ответа [329] ВИЧ-инфицированные больные, получающие АРТ, были распределены в две клинические группы (рисунок 2.1):

- 1) иммунологические неответчики (ИН; содержание $CD4^+$ Т-клеток в крови < 350/мкл);
- 2) иммунологические ответчики (ИО; содержание $CD4^+$ Т-клеток в крови > 350/мкл).

В контрольную группу (К) вошли неинфицированные ВИЧ добровольцы, давшие письменное согласие на участие в исследовании.

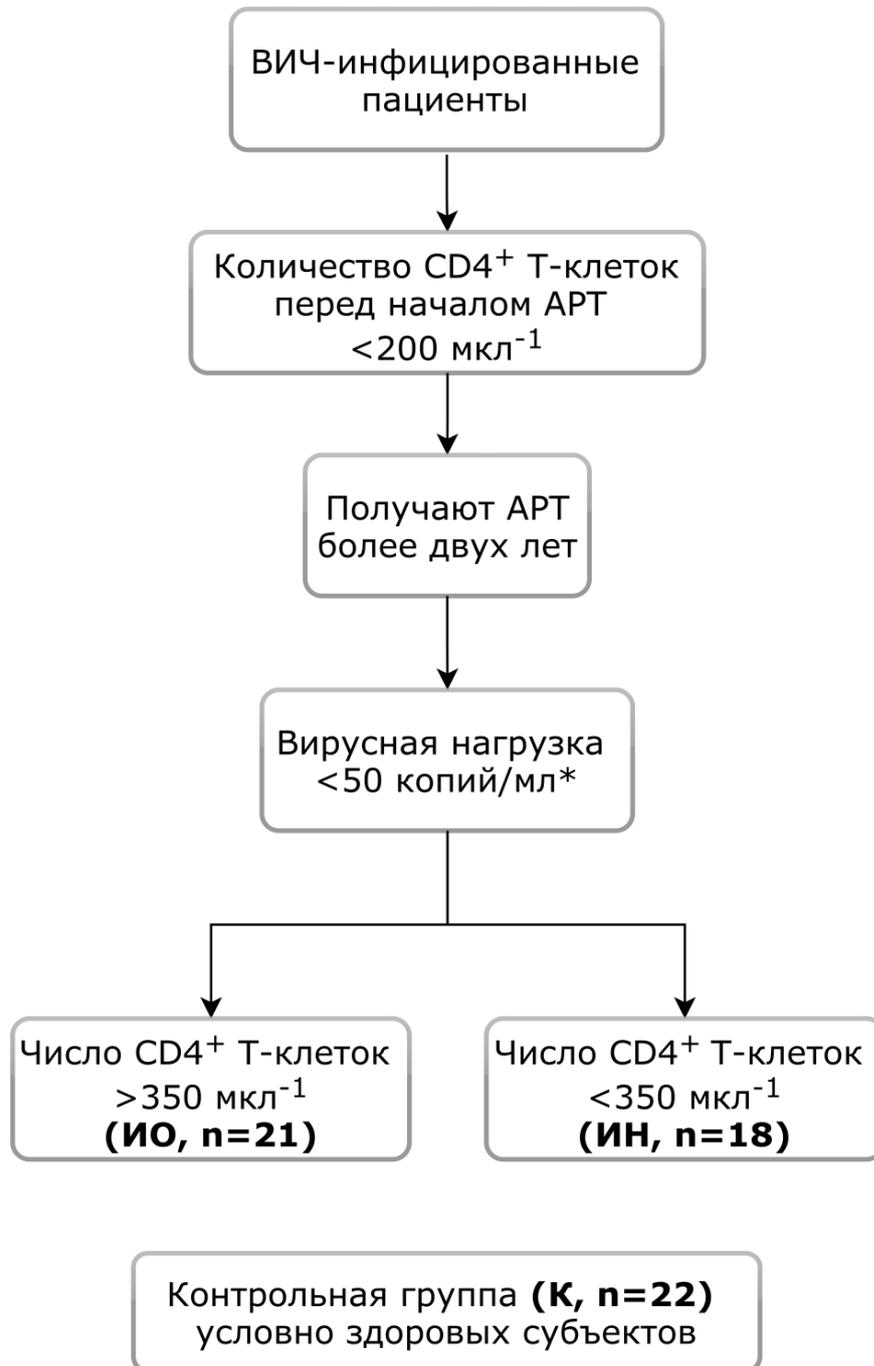


Рисунок 2.1 – Схема отбора ВИЧ-инфицированных пациентов в исследование

Примечание: ИН – иммунологические неответчики; ИО – иммунологические ответчики; К – контрольная группа; АРТ – антиретровирусная терапия; * – предел чувствительности тест-системы.

За период исследования были обследованы 39 ВИЧ-инфицированных пациентов и 22 здоровых добровольца (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика клинических групп

Показатели	Группы пациентов		
	ИН n=18	ИО n=21	К n=22
Пол:			
мужской (%)	50	52	55
женский (%)	50	48	45
Средний возраст (лет)	42,5 (37,0-47,5)	40,3 (35,0-45,0)	42,0 (34,0-50,0)
Число CD4 ⁺ Т-лимфоцитов перед началом АРТ (клеток/мкл)	110 (52-150)	180 (62-190)	н/д
Вирусная нагрузка ВИЧ перед началом АРТ (копий/мл)	82538 (11466-421000)	191668 (25675-466300)	н/д
Продолжительность ВИЧ-инфекции (лет)	6,5 (4,3-13,0)	10,0 (6,3-13,0)	н/д
Длительность АРТ (лет)	4,2 (3,1-7,8)	5,3 (5,0-7,4)	н/д
Вирусная нагрузка ВИЧ на момент исследования (копий/мл)	<50*	<50	н/д
Число CD4 ⁺ Т-лимфоцитов на момент исследования (клеток/мкл)	272 (226-338) P _{ИН-ИО} < 0,001 P _{ИН-К} < 0,001	484 (430-618) P _{ИО-К} < 0,001	652 (573-828)

Примечание: указаны медианы значений и интерквартильные размахи; Группы количественных данных сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки; ИН – иммунологические неответчики; ИО – иммунологические ответчики; К – контрольная группа; АРТ – антиретровирусная терапия; * – предел чувствительности тест-системы; н/д – значение недоступно

Среди ВИЧ-позитивных людей 18 характеризовались дискордантным ответом на терапию. В группах ВИЧ-инфицированных ИН и ИО доля женщин составила 50 и 48 % соответственно. В контрольной группе данный показатель составил 45 %. Группы ВИЧ-инфицированных пациентов были сопоставимы по полу, возрасту, вирусной нагрузке ВИЧ, числу CD4⁺ Т-лимфоцитов перед началом АРТ, продолжительности инфекции и длительности терапии ($p < 0,05$). Большинство ВИЧ-инфицированных пациентов получало трехкомпонентную

терапию, включающую нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы ламивудин и ингибитор интегразы долутегравир, а также другие ингибиторы обратной транскриптазы (тенофовир, эфавиренз или абакавир).

Получение биологического материала

Кровь объемом до 50 мл забирали натошак из кубитальной вены в пробирки типа «Vacutainer», содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту. Лейкоцитарные формулы определяли в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе (таблица 2).

Таблица 2 – Содержание различных форм лейкоцитов в крови доноров трех групп

Показатели	Группы пациентов		
	ИН n=18	ИО n=21	К n=22
Лейкоциты (10^6 клеток/мл)	4,8 (3,9-7,3)	5,5 (4,4-6,7)	5,6 (4,9-6,3)
Палочкоядерные нейтрофилы (% от лейкоцитов)	0,0 (0-1,3)	1,0 (0,0-3,0)	1,0 (0,5-1,5)
Сегментоядерные нейтрофилы (% от лейкоцитов)	59,5 (54,0-67,8) $p_{ИН-К} < 0,05$	54,0 (47,0-59,0)	52,0 (41,5-57,0)
Базофилы (% от лейкоцитов)	0	0	0
Эозинофилы (% от лейкоцитов)	1,5 (1,0-3,0)	2,0 (1,5-4,0)	2,0 (1,0-4,0)
Моноциты (% от лейкоцитов)	8,0 (6,8-11,0)	6,0 (4,5-9,5)	6,0 (3,5-9,5)
Лимфоциты (% от лейкоцитов)	27,5 (21,5-36,0) $p_{ИН-К} < 0,01$	35,0 (30,0-42,0)	37,0 (31,5-43,5)
НК-клетки (% от лимфоцитов)	13,5 (8,7-15,7)	10,5 (7,6-15,0)	12,6 (9,0-16,4)
В-клетки (% от лимфоцитов)	11,3 (5,8-16,2)	9,7 (7,1-12,3)	10,2 (8,0-14,2)
Т-клетки (% от лимфоцитов)	69,5 (62,2-73,8)	73,8 (69,5-77,8) $p_{ИО-К} < 0,05$	69,1 (62,5-73,7)
CD4 ⁺ Т-клетки (% от Т-лимфоцитов)	20,0 (13,7-27,3) $p_{ИН-ИО} < 0,001$ $p_{ИН-К} < 0,001$	30,2 (25,1-34,3) $p_{ИО-К} < 0,001$	39,7 (34,8-45,3)
CD8 ⁺ Т-клетки (% от Т-лимфоцитов)	45,8 (37,8-60,0) $p_{ИН-К} < 0,001$	41,5 (38,4-46,4) $p_{ИО-К} < 0,001$	26,2 (23,7-29,7)

Примечание: указаны медианы значений и интерквартильные размахи; Группы сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки; ИН – иммунологические неответчики; ИО – иммунологические ответчики; К – контрольная группа.

Численность CD4⁺ Т-лимфоцитов оценивали с использованием коммерческого набора Simultest™ IMK-Lymphocyte (Becton Dickinson, США) на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Плазму отделяли от форменных элементов крови путем центрифугирования. 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. Наличие антител к ВИЧ и ВГС устанавливали наборами для иммуноферментного анализа (АО «Вектор-Бест», Россия).

Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования периферической крови в градиенте плотности Диаколл (1,077 г/мл, Диаэм, Россия). Образцы подвергали контролируемому замораживанию до -80°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°C, отмывали в 10 мл полной питательной среды (10 % ЭТС, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma, США) в RPMI-1640 (Gibco, США)), затем в 10 мл фосфатно-солевого буферного раствора Дульбекко (Dulbecco's phosphate buffered saline – DPBS; Gibco, США).

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 флуоресцентным витальным красителем Zombie UV Fixable Viability Kit (Biolegend, США; рисунок 2.1). При определении CD4⁺ Т-лимфоцитов и оценке их субпопуляционного состава использовали анти-CD3-BV605, анти-CD3-PE-Dazzle594, анти-CD4-PE, анти-CD4-PE-Fire780 (Biolegend, США) и анти-CD45RO-APC-eFluor780

(Invitrogen, США) антитела. Определяли наивные $CD4^+$ Т-клетки ($CD3^+CD4^+CD45RO^-$) и клетки памяти ($CD3^+CD4^+CD45RO^+$).

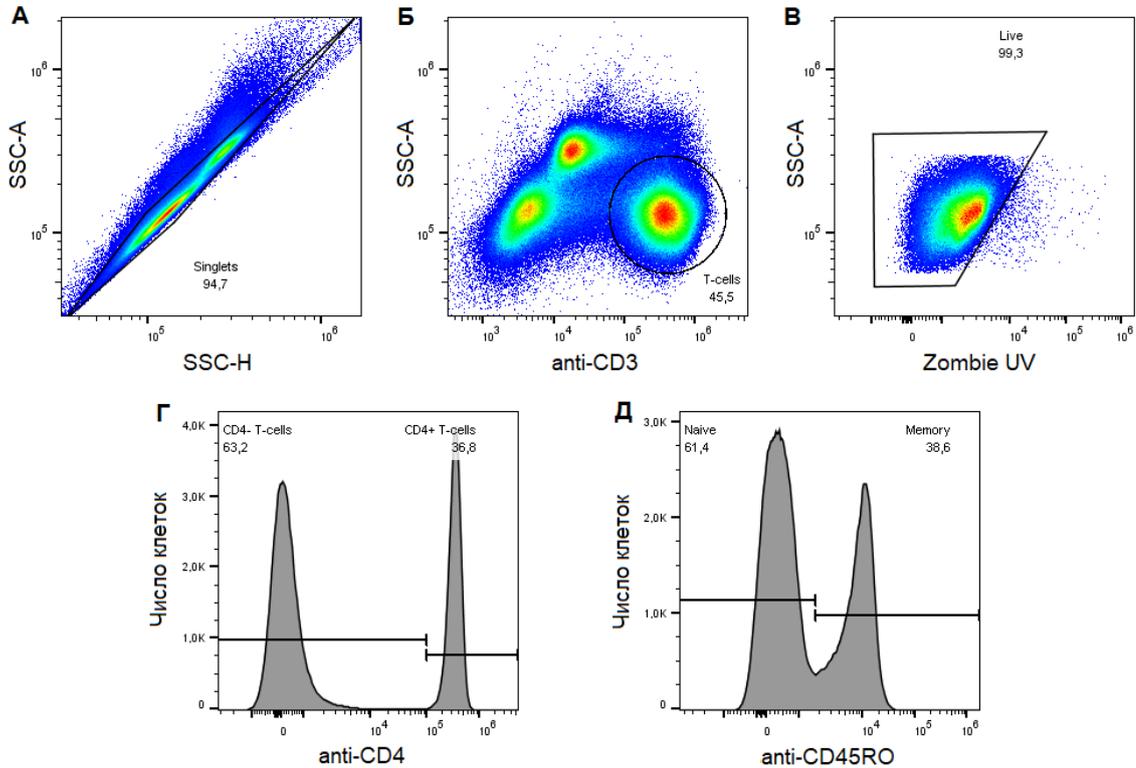


Рисунок 2.2 – Логика гейтирования мононуклеарных клеток периферической крови при определении субпопуляционного состава Т-лимфоцитов

По оси абсцисс: А – интенсивность бокового светорассеяния (SSC-H); Б-Д – интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных, анти-CD3 антителами, красителем Zombie UV, анти-CD4 и анти-CD45RO антителами. По оси ординат: А-В – интенсивность бокового светорассеяния (SSC-A); Г-Д – число клеток. А – гейтирование одиночных клеток; Б – $CD3^+$ лимфоцитов; В – живых Т-лимфоцитов; Г – $CD4^+$ Т-лимфоцитов; Д – наивных $CD4^+$ Т-клеток и клеток памяти.

Определение пролиферирующих и истощенных клеток

При оценке количества делящихся $CD4^+$ Т-лимфоцитов применяли антитела к ядерному белку Ki-67, конъюгированные с флуоресцентным красителем. Клетки, окрашенные поверхностными антителами и витальным красителем, фиксировали в буфере, содержащем формальдегид (Invitrogen, США). Обработанные клетки осаждали центрифугированием, дважды отмывали в пермеабилзирующем буфере (Invitrogen, США) и окрашивали анти-Ki-67-BV786 антителами (Becton Dickinson, США) в течение 1 ч при комнатной температуре.

Клетки после двукратного отмывания в пермеабилзирующем буфере ресуспендировали в растворе DPBS, содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина (Bovine Serum Albumin – BSA; Sigma-Aldrich, США) для последующего измерения на проточном цитофлуориметре.

Применение функциональных тестов для исследования метаболизма CD4⁺ Т-лимфоцитов исключает возможность использования таких широко распространенных маркеров пролиферации, как Ki-67, требующих фиксации и пермеабиллизации клеток на этапе пробоподготовки. Ранее мы показали, что экспрессия рецептора трансферрина 1 (CD71) на поверхности делящихся CD4⁺ Т-клеток прямо связана с содержанием белка Ki-67 в их ядрах [411]. Другими словами, поверхностное окрашивание антителами к CD71 может применяться в качестве альтернативы Ki-67 при определении пролиферирующих клеток в культуре живых CD4⁺ Т-лимфоцитов. В настоящем исследовании при оценке метаболических свойств CD4⁺ Т-клеток для определения делящихся лимфоцитов использовались флуоресцентные анти-CD71-AF700 (Invitrogen, США) антитела.

Истощенные элементы в пуле 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. После окрашивания образцы анализировали на проточном цитофлуориметре.

Оценка потребления метаболических субстратов

Измерение потребления глюкозы. 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). Образцы ресуспендировали в 100 мкл DPBS и инкубировали в течение 5 мин при температуре +4°C перед измерением на проточном цитофлуориметре.

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). Перед измерением флуоресценции клетки ресуспендировали в 100 мкл DPBS.

Определение уровня экспрессии транспортера глутамина. 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 флуоресцентными анти-IgG-AF405 антителами (Abcam, Великобритания) в течение 30 мин при комнатной температуре. К клеткам вносили 1 мл раствора DPBS/1 % BSA, центрифугировали образцы (400 g, 5 мин) и ресуспендировали в 100 мкл DPBS перед измерением флуоресценции.

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. Пробы дважды отмывали в 750 мкл однократного буфера (1X Assay Buffer; 1000 g, 3 мин), ресуспендировали в 100 мкл DPBS и измеряли флуоресценцию на проточном цитофлуориметре.

Анализ внеклеточных потоков (англ. Extracellular Flux Analysis)

CD4⁺ Т-лимфоциты памяти выделяли методом магнитной сепарации с использованием коммерческого набора Memory CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Германия) согласно инструкции производителя. Изолированные CD4⁺ Т-клетки памяти ресуспендировали в среде XF RPMI Medium (Agilent Technologies, США), содержащей 10 мМ глюкозы (Sigma-Aldrich, США), 2 мМ глутамин (Диам, 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). Планшет центрифугировали в течение 4 мин при 200 g для формирования монослоя клеток. Объем жидкости в лунке доводили до 175 мкл средой, планшет инкубировали при +37°C в течение 60 мин. 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 (P/AA; 0,5 мкМ). Вышеперечисленные реагенты были получены в Agilent Technologies, США. В пробах определяли базальную скорость потребления кислорода (разница между OCR на базальном уровне и OCR после внесения P/AA), базальную OCR после 40 мин стимуляции ФГА, максимальную скорость потребления кислорода (разница между OCR после внесения FCCP и P/AA), и резервную дыхательную емкость митохондрий (разница между максимальной и базальной OCR). ECAR в исследуемых пробах определяли на базальном уровне и после 40 мин стимуляции ФГА.

Определение соотношения АТФ/АДФ

Суспензию изолированных CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти ($1 \cdot 10^5$ клеток в объеме 10 мкл переносили в лунки 96-луночного планшета, затем добавляли к ним 90 мкл АТФ-реагента из набора «ADP/ATP Ratio Assay Kit» (Sigma-Aldrich, США). После внесения реагента планшет анализировали на люминометре Luminoskan Ascent (Thermo Scientific, США). Измерение хемилюминесценции, выраженное в относительных единицах света (Relative light units – RLU), производили после инкубации при комнатной температуре в течение 1 мин (RLU_A). По завершению измерения планшет инкубировали в течение 10 мин, затем повторяли измерение хемилюминесценции (RLU_B). Следующим шагом к образцам вносили 5 мкл АДФ-реагента. Хемилюминесценцию считывали после 1 мин инкубации с реагентом при комнатной температуре (RLU_C). Соотношение АДФ/АТФ рассчитывали согласно формуле: $\frac{RLU_C - RLU_B}{RLU_A}$

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. Проведение статистических расчетов и построение графиков осуществляли с использованием программного обеспечения Microsoft Excel и GraphPad Prism 8.0.1. Анализ цитофлюориметрических данных осуществляли с применением программы FlowJo v10.0 (FlowJo LLC, США). Данные, полученные в ходе отдельных экспериментов на анализаторе Seahorse XFe96, были масштабированы с целью снижения вариабельности. Последующую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Wave Desktop («Agilent Technologies», США).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ
В ГЛАВЕ 2

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК и/или индексируемых в международных базах данных RSCI, Scopus:

1. Исследование показателей окислительного фосфорилирования и гликолиза в CD4⁺ 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, К2).

2. 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).

ГЛАВА 3 – РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 – Регенерация CD4⁺ Т-лимфоцитов в организме ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков

Одной из основных характеристик ИН является дефицит CD4⁺ Т-клеток в крови после двух и более лет вирусологически эффективной антивирусной терапии. Восстановление численности CD4⁺ Т-клеток зависит от баланса между двумя фундаментальными процессами: пролиферацией и клеточной гибелью. У ИН по сравнению с ИО уровень клеточной гибели в субпопуляции CD4⁺ Т-клеток повышен [258, 418]. Пролиферативная активность CD4⁺ Т-лимфоцитов у ИН также усилена [221]. Однако, низкая численность CD4⁺ Т-клеток в крови ИН свидетельствует о том, что активное деление CD4⁺ Т-клеток не приводит к увеличению их числа. В связи с этим, проблема регенерации CD4⁺ Т-лимфоцитов при дискордантном иммунологическом ответе на АРТ требует дальнейшего детального изучения. Некоторым особенностям регенерации CD4⁺ Т-клеток у ИН будет посвящен настоящий раздел. В данной работе для получения наиболее объективных данных о митотической активности CD4⁺ Т-лимфоцитов использовались два маркера пролиферации – ядерный белок Ki-67 и трансферриновый рецептор CD71.

В результате проведенного исследования было установлено, что в обеих группах ВИЧ-инфицированных лиц уровень пролиферации в субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов повышен (рисунок 3.1.1). Это было показано как при определении поверхностной экспрессии CD71 ($p_{ин-к} < 0,01$, $p_{ио-к} < 0,05$), так при анализе содержания Ki-67 ($p_{ин-к} < 0,01$, $p_{ио-к} < 0,05$). Наибольшее количество делящихся клеток было зафиксировано у ИН ($p_{ио-ин} < 0,05$). Полученные данные указывают на то, что у ВИЧ-инфицированных пациентов в субпопуляции CD4⁺ Т-клеток запущены регенераторные процессы. При этом у ИН, характеризующихся самой низкой

численностью $CD4^+$ Т-лимфоцитов в крови, доля пролиферирующих элементов в популяции была наибольшей.

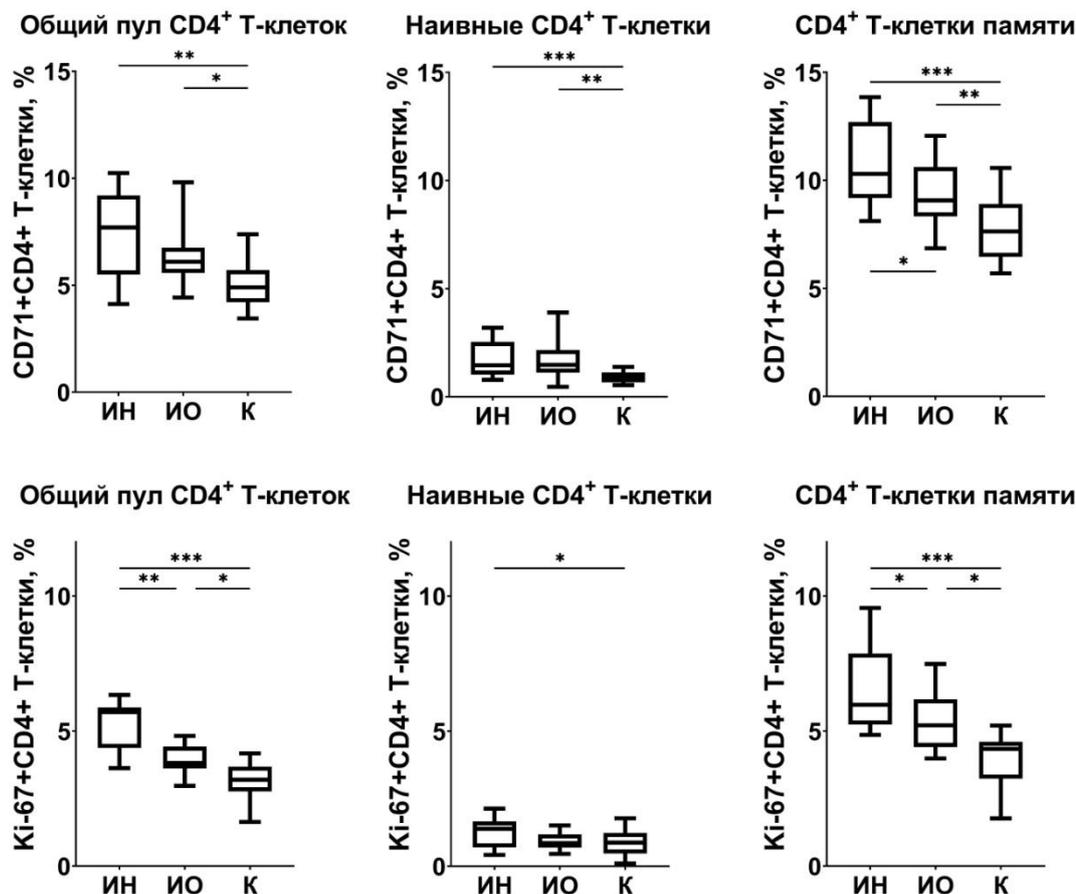


Рисунок 3.1.1 – Проллиферативная активность $CD4^+$ Т-лимфоцитов иммунологических неответчиков (ИН, n=10), иммунологических ответчиков (ИО, n=10) и относительно здоровых добровольцев (К, n=9)

Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90 %-ые перцентили (вертикальные отрезки); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$. Группы количественных данных сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки.

Анализ экспрессии CD71 и Ki-67 в отдельных субпопуляциях $CD4^+$ Т-лимфоцитов показал, что в наивных $CD4^+$ Т-клетках митотическая активность была незначительной. Содержание CD71-позитивных наивных $CD4^+$ 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 %). Показатели, полученные при анализе Ki-67, также были низкими: 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 элементов в субпопуляции наивных $CD4^+$

Т-лимфоцитов была выше, чем у неинфицированных субъектов ($p < 0,05$). Статистических отличий между показателями ИН и ИО установлено не было.

В субпопуляции $CD4^+$ Т-клеток памяти уровень пролиферации был многократно выше, чем таковой наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов. Так, на долю $CD71$ -позитивных $CD4^+$ Т-клеток памяти у ИН приходилось 10,3 % (9,2-12,7 %), у ИО – 9,1 % (8,3-10,6 %), у К – 7,6 % (6,5-8,9 %). Доля $Ki-67^+CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти у ИН составила 6,0 % (5,2-7,9 %), у ИО – 5,2 % (4,4-6,2 %), у К – 4,3 % (3,2-4,6 %). В обеих группах ВИЧ-инфицированных пациентов относительное количество делящихся клеток в субпопуляции $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти было выше, чем у здоровых субъектов. У ИН, характеризующихся наименьшей численностью $CD4^+$ Т-лимфоцитов в крови, пролиферативная активность $CD4^+$ Т-клеток памяти была наибольшей и статистически значимо превышала показатели ИО ($p < 0,05$) и неинфицированных субъектов ($p < 0,001$).

Представленные сведения позволили выявить два важных феномена. Во-первых, было установлено, что существует прямая зависимость между абсолютным количеством $CD4^+$ Т-лимфоцитов и их пролиферацией. У ИН, отличительной чертой которых является дефицит $CD4^+$ Т-клеток в крови, доля пролиферирующих элементов в субпопуляции $CD4^+$ Т-лимфоцитов была наибольшей. Во-вторых, полученные данные указали на то, что основным источником регенерации в субпопуляции $CD4^+$ Т-лимфоцитов являются клетки памяти. Такие клетки в среднем пролиферируют в 6 раз активнее наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов. Для подтверждения данных выводов параметры пациентов всех трех групп были объединены и проанализированы на наличие связи между абсолютной численностью $CD4^+$ Т-лимфоцитов и пролиферативной активностью $CD4^+$ Т-клеток памяти (рисунок 3.1.2).

Негативная корреляционная зависимость между двумя показателями была установлена как с использованием маркера $CD71$ ($R = -0,420$, $p = 0,023$), так при оценке содержания $Ki-67$ ($R = -0,441$, $p < 0,014$). При этом статистически значимой корреляционной зависимости между митотической активностью наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов и количеством $CD4^+$ Т-клеток в крови установлено

не было. Из этого следует, что роль наивных клеток в регенерации общего пула $CD4^+$ Т-лимфоцитов невелика. Повышенный уровень пролиферации наивных $CD4^+$ Т-клеток у ИО и ИН, вероятно, связан с восстановлением их собственной субпопуляции.

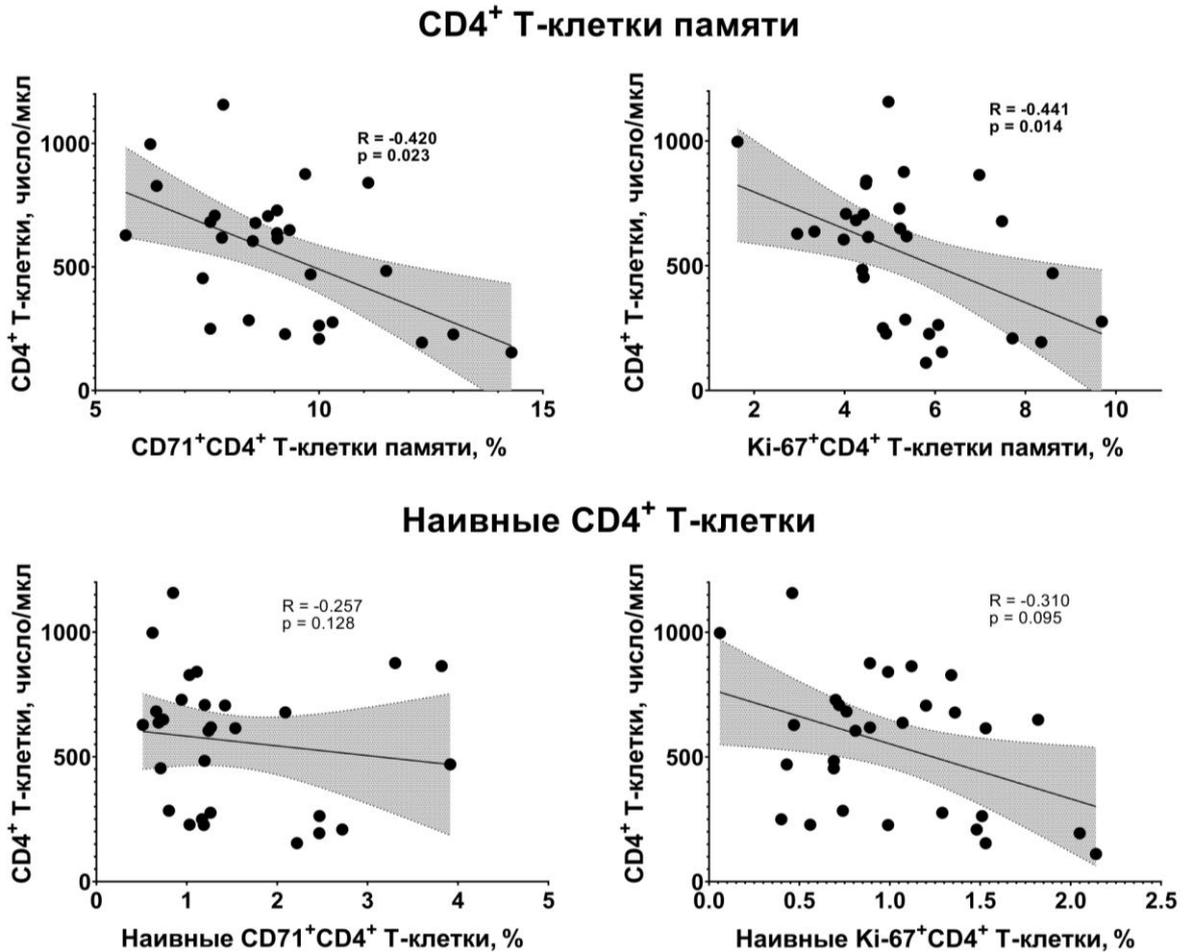


Рисунок 3.1.2 – Связь между пролиферативной активностью наивных $CD4^+$ Т-клеток и клеток памяти и численностью $CD4^+$ Т-лимфоцитов в крови доноров трех групп (n=29)

Подводя итог, можно заключить, что у ИН на фоне выраженного дефицита $CD4^+$ Т-лимфоцитов активно протекает гомеостатическая пролиферация. Основную роль в данном процессе играют $CD4^+$ Т-клетки памяти. Полученные результаты согласуются с данными, впервые полученными М. Ледерманом и соавт., показавшими, что при ВИЧ-инфекции клетки памяти являются главным источником регенерации в субпопуляции $CD4^+$ Т-лимфоцитов [221].

Представленные сведения поднимают закономерный вопрос: почему у ИН активная пролиферация $CD4^+$ Т-клеток памяти не приводит к приросту

численности CD4⁺ Т-лимфоцитов? Выше отмечалось, что количество CD4⁺ Т-клеток определяется балансом между пролиферацией и гибелью. При ВИЧ-инфекции этот баланс постоянно изменяется. Так, ВИЧ-инфекция начинается с массовой гибели и дефицита CD4⁺ Т-лимфоцитов, однако по окончании острого периода инфекции влияние вируса ослабевает, и число CD4⁺ Т-клеток прирастает [392]. Со временем, однако, баланс вновь смещается, что приводит к постепенной гибели CD4⁺ Т-лимфоцитов [392]. В дальнейшем равновесие между двумя процессами изменяется под воздействием АРТ. Подавление вирусной нагрузки приводит к тому, что темпы гибели CD4⁺ Т-клеток стремительно снижаются [91]. Именно поэтому об иммунологическом «неответе» со стороны CD4⁺ Т-лимфоцитов можно судить только после инициации АРТ.

Пролиферативный ответ CD4⁺ Т-клеток памяти на лимфопению реализуется на протяжении всего периода заболевания, в том числе – до назначения терапии. Такое продолжительное поддержание процессов регенерации – в течение многих лет до и после назначения АРТ – может привести к истощению регенерирующих клеток [237]. Из вышесказанного можно предположить, что отсутствие прироста численности CD4⁺ Т-лимфоцитов у ИН на фоне подавленной вирусной нагрузки может быть вызвано истощением регенерирующих клеток. Термином истощение обозначают постепенный процесс утраты функциональной активности Т-клеток, который проявляется в потере способности производить цитокины и снижении их пролиферативного потенциала [159]. Стимулами к истощению Т-лимфоцитов могут являться длительная персистенция антигена [400], хроническое воспаление [400] и многократное деление клеток [237]. Одновременно с утратой цитокинпродуцирующей и пролиферативной активности Т-клетки, как правило, начинают экспрессировать поверхностные маркеры истощения – ингибиторные рецепторы. Среди ингибиторных рецепторов, экспрессируемых на поверхности CD4⁺ Т-лимфоцитов, выделяют такие супрессорные молекулы как PD-1, Lag-3, Tim-3, CTLA-4, TIGIT, CD160, LAIR1 и др. [84]. В настоящем исследовании в субпопуляции CD4⁺ Т-клеток оценивали экспрессию рецепторов PD-1 и TIGIT. Данные супрессорные молекулы содержат классический ингибиторный мотив

ITIM (иммунорецепторный ингибиторный мотив на основе тирозина) и при взаимодействии с лигандами (PD-L1 и CD155 соответственно) подавляют активацию, пролиферацию и цитокинпродуцирующую функцию иммунных клеток [93, 196, 242, 333].

Анализ экспрессии супрессорных молекул на поверхности CD4⁺ Т-лимфоцитов ВИЧ-инфицированных больных и неинфицированных лиц показал следующее. Во всех исследуемых группах лишь малая часть наивных CD4⁺ Т-клеток экспрессировала ингибиторные рецепторы. Так, содержание PD-1-позитивных клеток в субпопуляции наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов у ИН составило 5,9 % (1,9-11,6 %), у ИО – 2,3 % (1,5-3,3 %), у К – 1,7 % (1,2-2,2 %). На долю TIGIT-позитивных наивных CD4⁺ Т-клеток у ИН приходилось 7,1 % (4,6-18,2 %), у ИО – 5,3 % (3,9-6,7 %), у К – 5,3 % (4,5-6,0 %). У ИН содержание наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов, экспрессирующих PD-1 или TIGIT, было выше, чем у неинфицированных субъектов ($p < 0,05$). В субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти уровень экспрессии ингибиторных рецепторов был существенно выше, чем в наивных CD4⁺ Т-клетках ($p < 0,01$). У ИН PD-1 экспрессировали 29,6 % (18,9-48,9 %) CD4⁺ Т-клеток памяти, у ИО – 23,6 % (17,4-31,2 %), у К – 18,3 % (15,5-23,4 %; рисунок 3.1.3).

Содержание TIGIT-позитивных клеток в субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти у ИН составило 48,4 % (33,7-59,5 %), у ИО – 39,1 % (32,0-40,9 %), у К – 32,7 % (28,2-35,2 %). Содержание PD-1-позитивных и TIGIT-позитивных элементов в субпопуляции CD4⁺ Т-клеток памяти возрастало в направлении К→ИО→ИН. У ИН доля PD-1-позитивных и TIGIT-позитивных CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти была максимальной и статистически значимо превышала показатели неинфицированных лиц ($p < 0,05$). Важно отметить, что у ИН, при их сравнении с относительно здоровыми донорами, также было значительно увеличено относительное количество CD4⁺ Т-клеток памяти, одновременно экспрессирующих маркеры PD-1 и TIGIT ($p < 0,05$).

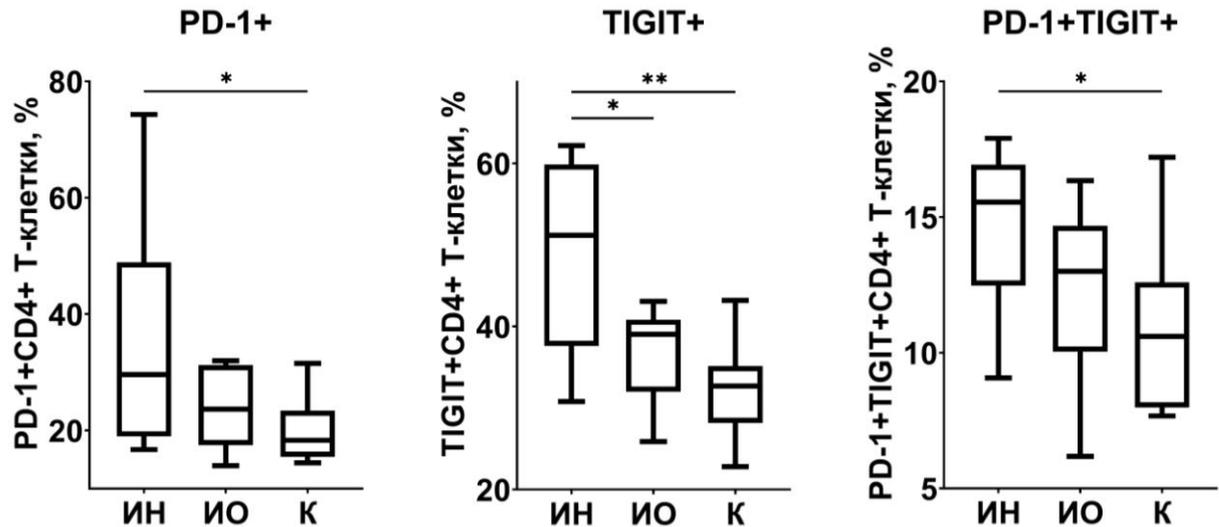


Рисунок 3.1.3 – Особенности экспрессии ингибиторных рецепторов PD-1 и TIGIT в субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти иммунологических неответчиков (ИН, n=10), иммунологических ответчиков (ИО, n=10) и относительно здоровых добровольцев (К, n=9)

Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90 %-ые перцентили; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$. Группы количественных данных сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки.

Помимо оценки процентного содержания CD4⁺ Т-лимфоцитов, экспрессирующих ингибиторные рецепторы, важно было определить плотность экспрессии этих молекул (рисунок 3.1.4). Установлено, что плотность экспрессии ингибиторных рецепторов PD-1 и TIGIT на поверхности CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти возрастала в направлении К→ИО→ИН. CD4⁺ Т-клетки памяти ИН и ИО в среднем экспрессировали PD-1 и TIGIT значительно активнее, чем клетки неинфицированных доноров.

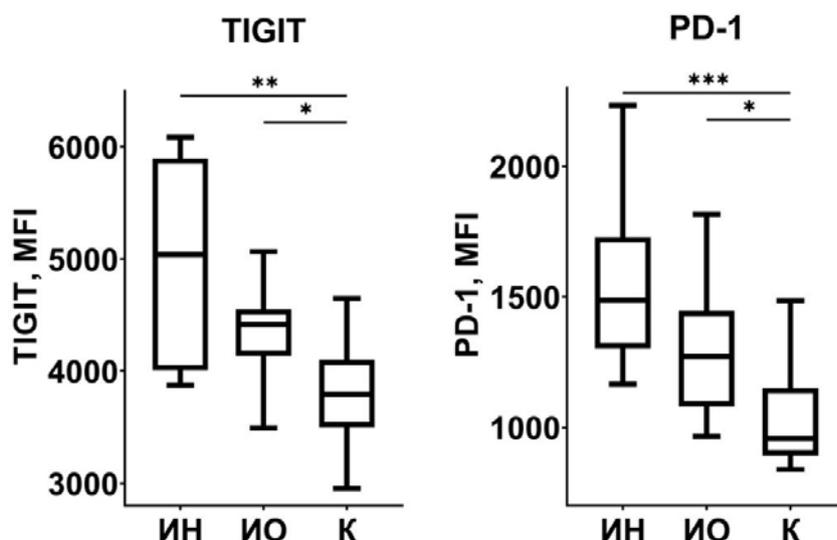


Рисунок 3.1.4 – Плотность экспрессии ингибиторных рецепторов на TIGIT⁺ и PD-1⁺ CD4⁺ Т-клетках памяти иммунологических неответчиков (ИН, n=10), иммунологических ответчиков (ИО, n=10) и здоровых добровольцев (К, n=9)

Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90 %-ые перцентили (вертикальные отрезки); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$. Группы количественных данных сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки.

Во всех исследуемых группах содержание CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти, экспрессирующих ингибиторные рецепторы, было прямо связано с долей пролиферирующих клеток в данной субпопуляции (рисунок 3.1.5). Так, доля Ki-67-позитивных CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти коррелировала с относительным количеством PD-1⁺ ($R = 0,405$, $p = 0,032$) и TIGIT⁺ CD4⁺ Т-клеток памяти ($R = 0,399$, $p = 0,040$). В свою очередь, доля CD71-позитивных элементов в субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти была прямо связана с содержанием TIGIT-позитивных клеток ($R = 0,429$, $p = 0,022$).

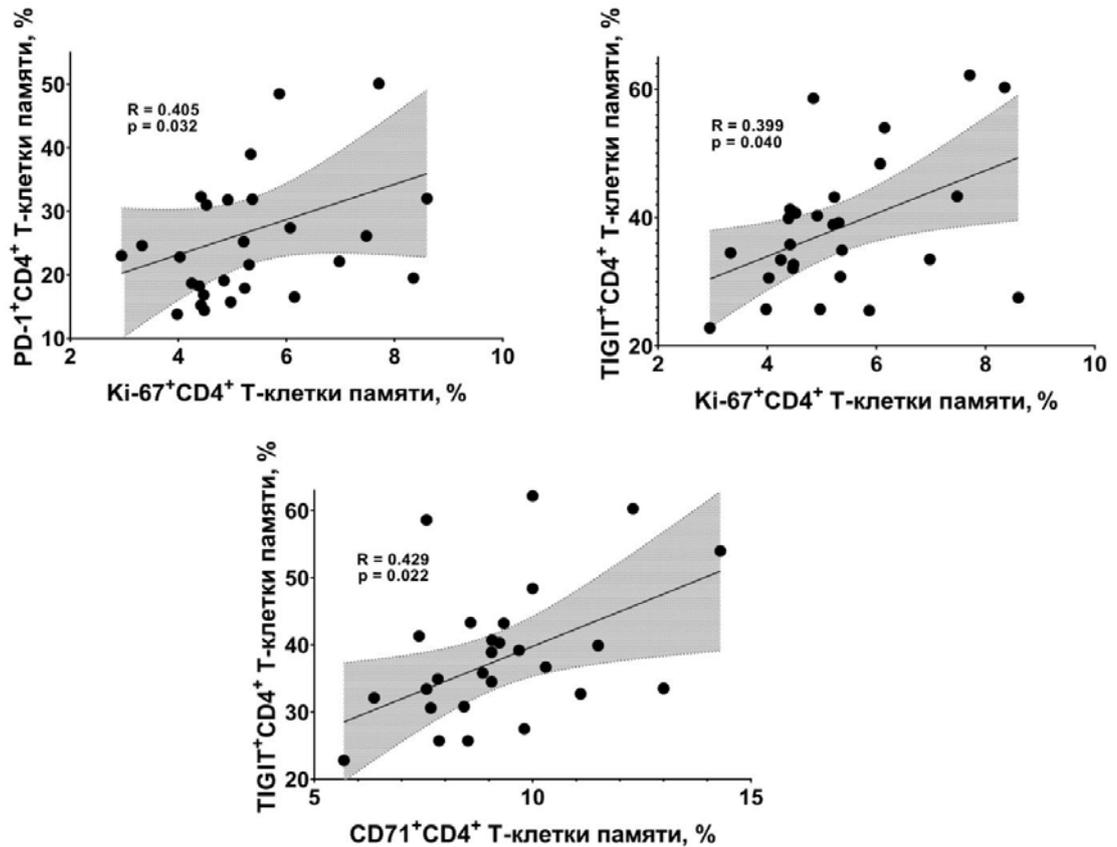


Рисунок 3.1.5 – Взаимосвязь между экспрессией ингибиторных рецепторов PD-1 и TIGIT и маркеров пролиферации CD71 и Ki-67 на поверхности CD4⁺ Т-клеток памяти трех групп (n=29)

Важно отметить, что доля клеток, экспрессирующих ингибиторные рецепторы, также была повышена в пуле делящихся CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти ИИ (рисунок 3.1.6). Так, было установлено, что пролиферирующие Ki-67⁺CD4⁺ Т-клетки памяти ИИ, в сравнении с аналогичными клетками здоровых людей, содержат значительно больше PD-1-позитивных элементов ($p < 0,05$). Доля делящихся Ki-67⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов, экспрессирующих TIGIT, у ИИ была значительно выше, чем у ИО ($p < 0,01$) и неинфицированных субъектов ($p < 0,01$).

Представленные данные указывают на то, что ингибиторный рецептор TIGIT может быть более специфичным маркером, отличающим ИИ как от неинфицированных людей, так и от ИО. При анализе экспрессии PD-1 статистически значимых отличий между двумя группами ВИЧ-инфицированных пациентов установлено не было.

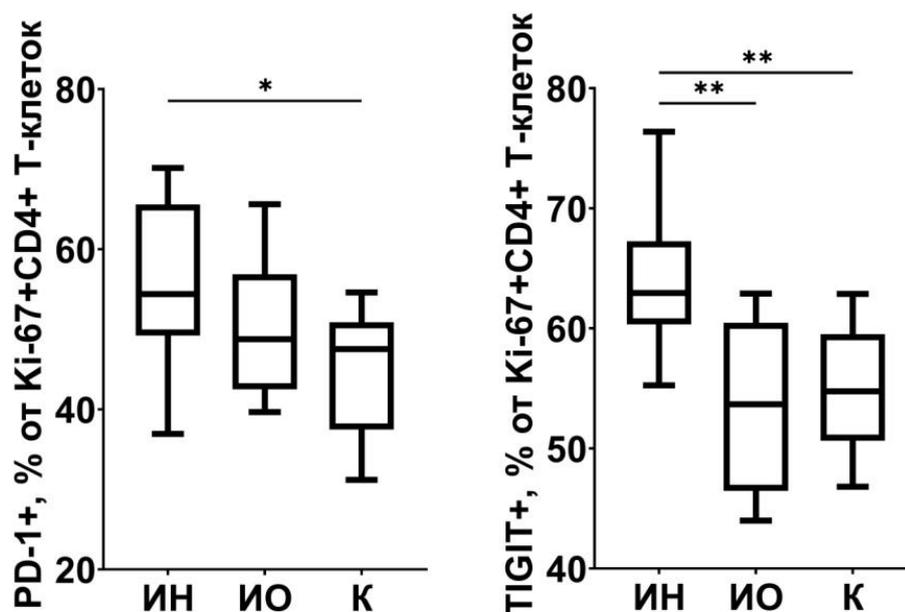


Рисунок 3.1.6 – Особенности экспрессии ингибиторных рецепторов в субпопуляции делящихся ($Ki-67^+$) $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти иммунологических неответчиков (ИН, $n=10$), иммунологических ответчиков (ИО, $n=10$) и относительно здоровых добровольцев (К, $n=9$)

Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90 %-ые перцентили (вертикальные отрезки); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$. Группы количественных данных сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки.

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что у ИН $CD4^+$ Т-клетки памяти активно экспрессируют ингибиторные рецепторы. Данное утверждение распространяется и на делящиеся $CD4^+$ Т-лимфоциты памяти ИН, составляющие основу регенерации. В совокупности с данными о митотической активности $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти, представленные сведения указывают на следующую закономерность: чем выше число пролиферирующих клеток в субпопуляции $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти, тем большее количество клеток экспрессирует ингибиторные рецепторы. Эта закономерность свидетельствует в пользу гипотезы о том, что многократные митозы приводят к истощению регенерирующих $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти ИН. Важно отметить, что экспрессия супрессорных молекул на поверхности Т-клеток сама по себе не является достоверным признаком их истощения [181]. В рамках данного исследования мы показали, что $CD4^+$ Т-лимфоциты памяти неинфицированных доноров также несут

ингибиторные рецепторы на своей поверхности. Тем не менее, для CD4⁺ Т-клеток памяти ИИ, помимо этого, была характерна экспрессия двух ингибиторных молекул одновременно – в литературе данный феномен связывают с терминальным истощением Т-лимфоцитов [195, 202]. Кроме того, CD4⁺ Т-клетки памяти ИИ отличаются высокой плотностью экспрессии ингибиторных рецепторов. Как правило, плотность экспрессии супрессорных молекул возрастает по мере истощения и снижения функциональной активности Т-лимфоцитов [64]. Таким образом, с большой вероятностью можно заключить, что активная экспрессия ингибиторных рецепторов на CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти ИИ связана с истощением данных клеток.

При взаимодействии с лигандами ингибиторные рецепторы подавляют многие процессы, связанные с пролиферацией Т-клеток. Так, проведение сигнала через рецептор PD-1 инактивирует молекулу ZAP70 и фосфатидилинозитол-3-киназу (англ. phosphatidylinositol-3-kinase - PI3K), что приводит к нарушению проведения сигнала от ТКР, снижению продукции ИЛ-2 и жизнеспособности Т-лимфоцитов, а также угнетению синтеза белков и гликолиза [224]. Убедительным подтверждением тому, что CD4⁺ Т-клетки памяти ИИ истощены, служит работа Younes и соавт., продемонстрировавшая, что у таких пациентов CD4⁺ Т-клетки памяти, находящиеся в активных фазах клеточного цикла, не способны завершить пролиферацию формированием дочерних клонов при переносе в питательную среду [411]. Кроме того, было показано, что *in vitro* активация покоящихся CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти, полученных от ИИ, приводит к малопродуктивному и асимметричному делению, завершающемуся формированием различных по размеру клонов [21]. Такая асимметрия может привести к апоптотической гибели дочерних клеток меньшего размера [161, 304, 370].

Как размер клетки, так и ее способность к пролиферации, во многом определяются активностью метаболических процессов, направленных на синтез нуклеиновых кислот, белков и липидов – «строительных материалов» для генетического аппарата, органелл и клеточных мембран [391]. Исходя из этого, закономерно предположить, что непродуктивная пролиферация CD4⁺ Т-

лимфоцитов у ИИ может быть связана с метаболическими изменениями в данных клетках. Ранее было показано, что у ИИ, в сравнении с ИО и здоровыми добровольцами, повышена экспрессия транспортера Glut1 на поверхности CD4⁺ Т-клеток [259]. Кроме того, у ИИ, при их сравнении с ИО и здоровыми людьми, существенно снижена экспрессия генов, обеспечивающих эффективное функционирование митохондрий, в делящихся CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти [411, 418]. Представленные данные указывают на то, что в CD4⁺ Т-клетках памяти ИИ могут быть отклонения в метаболических процессах. В связи с этим, дальнейшие исследования были направлены на определение метаболических свойств CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти ИИ и их связи с регенерацией иммунитета.

3.2 – Нарушение гликолиза в CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти ВИЧ-инфицированных лиц с дискордантным ответом на терапию

Особенности метаболизма различных субпопуляций CD4⁺ Т-лимфоцитов к настоящему моменту недостаточно изучены. В связи с этим, на первом этапе данного исследования в образцах крови ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на АРТ были проанализированы особенности потребления глюкозы наивными CD4⁺ Т-клетками и CD4⁺ Т-клетками памяти в покоем состоянии и при пролиферации. Делящиеся CD4⁺ Т-лимфоциты определяли по наличию трансферринового рецептора CD71 на их поверхности. Данный маркер начинает экспрессироваться на поверхности CD4⁺ Т-клеток спустя 6-8 часов с момента активации и позволяет включить в анализ CD4⁺ Т-лимфоциты, недавно вступившие в клеточный цикл и находящиеся на стадии метаболической перестройки [283].

Установлено, что в состоянии покоя $CD4^+$ Т-лимфоциты активно потребляют глюкозу. Доля клеток, поглощающих ее флуоресцентный аналог 2-NBDG, в среднем составила 76,8% (70,3–82,6 %) в общей популяции. В субпопуляции клеток памяти данный показатель (87,7 %; 82,1–90,3 %) был существенно выше, чем в субпопуляциях наивных клеток (73,2 %; 64,7–81,1 %). Покоящиеся $CD4^+$ Т-лимфоциты памяти при их сравнении с наивными клетками, также находящимися в состоянии покоя, поглощали значительно больше глюкозы (оценка по MFI; рисунок 3.2.1).

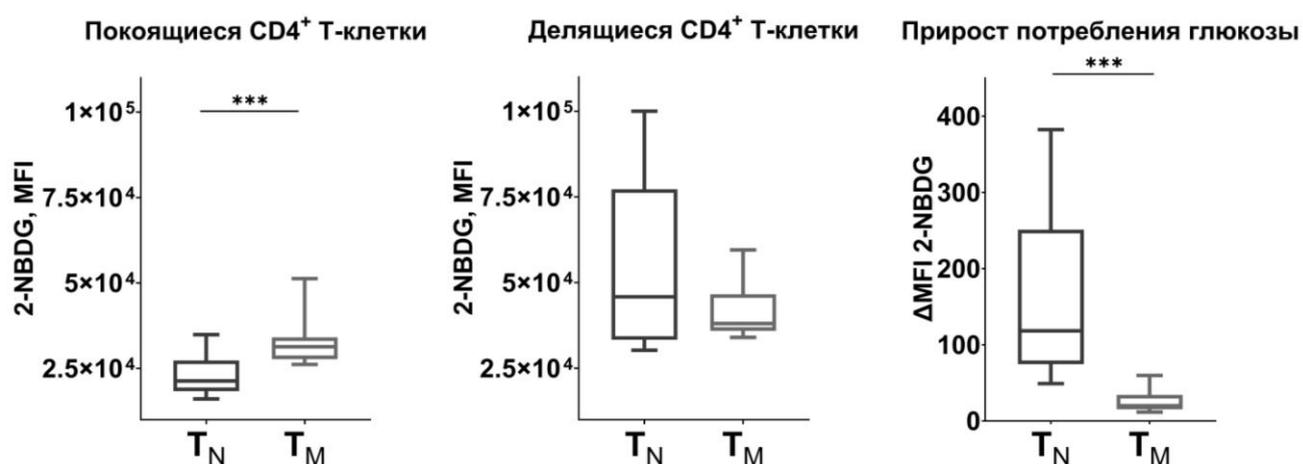


Рисунок 3.2.1 – Интенсивность потребления аналога глюкозы (2-NBDG) наивными $CD4^+$ Т-лимфоцитами (T_N) и $CD4^+$ Т-клетками памяти (T_M) ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков (n=18) в состоянии покоя и пролиферации

Представлены медианы (горизонтальные линии), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10–90 %-ые интервалы (вертикальные отрезки); *** – $p < 0,001$ (U-критерий Манна-Уитни). MFI: англ. Mean Fluorescence Intensity – средняя интенсивность флуоресценции. Прирост потребления глюкозы рассчитывали как разницу между средней интенсивностью флуоресценции (Δ MFI) 2-NBDG в пролиферирующих и покоящихся клетках.

В пролиферирующих $CD4^+$ Т-клетках уровень захвата глюкозы был существенно выше, чем в покоящихся элементах ($p < 0,001$). При этом потребление глюкозы при вступлении наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов в деление резко увеличивалось (медиана 118 %) и существенно превышало соответствующий показатель $CD4^+$ Т-клеток памяти (медиана 19 %; $p < 0,001$). В $CD4^+$ Т-лимфоцитах здоровых людей наблюдались аналогичные закономерности:

в делящихся наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитах захват глюкозы возрастал почти на 178 %, в то время как в клетках памяти лишь на 49 %.

Таким образом, у ВИЧ-инфицированных неответчиков на терапию покоящиеся $CD4^+$ Т-клетки памяти характеризуются повышенной метаболической активностью и потребляют значительно больше глюкозы, чем наивные $CD4^+$ Т-лимфоциты. Для вступления в пролиферацию $CD4^+$ Т-клеткам памяти достаточно совершить небольшую метаболическую перестройку и усилить захват глюкозы не более чем на 19 %. Ведущая роль $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти в регенерации $CD4^+$ Т-клеток при дискордантном ответе на АРТ может быть обусловлена способностью быстро адаптироваться к метаболическим потребностям, сопутствующим делению.

Для определения роли гликолиза в восстановлении численности $CD4^+$ Т-лимфоцитов при приеме АРТ уровень потребления глюкозы измеряли в $CD4^+$ Т-клетках ИИ, ИО и здоровых доноров. Было установлено, что большая часть $CD4^+$ Т-лимфоцитов, полученных из крови ВИЧ-инфицированных ИО (74,6 %; 46,9–87,7 %) и неинфицированных людей (80,6%; 61,7–85,7 %) также потребляет флуоресцентный аналог глюкозы 2-NBDG. Отличий в относительном количестве $CD4^+$ Т-клеток, потребляющих 2-NBDG, между клиническими группами (ИИ, ИО и К) установлено не было. В то же время, количество поглощенной глюкозы в трех группах было неодинаково и возрастало в направлении К→ИО→ИИ (рисунок 3.2.2). Данное утверждение справедливо как для наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов, так и для $CD4^+$ Т-клеток памяти. Различия в потреблении 2-NBDG у ИО и неинфицированных добровольцев не достигли уровня статистической значимости ($p > 0,05$). В то же время $CD4^+$ Т-клетки ИИ потребляли значительно больше субстрата, чем клетки контрольных субъектов ($p < 0,01$) 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 ($p_{\text{наивные}} < 0,01$; $p_{\text{памяти}} < 0,05$).

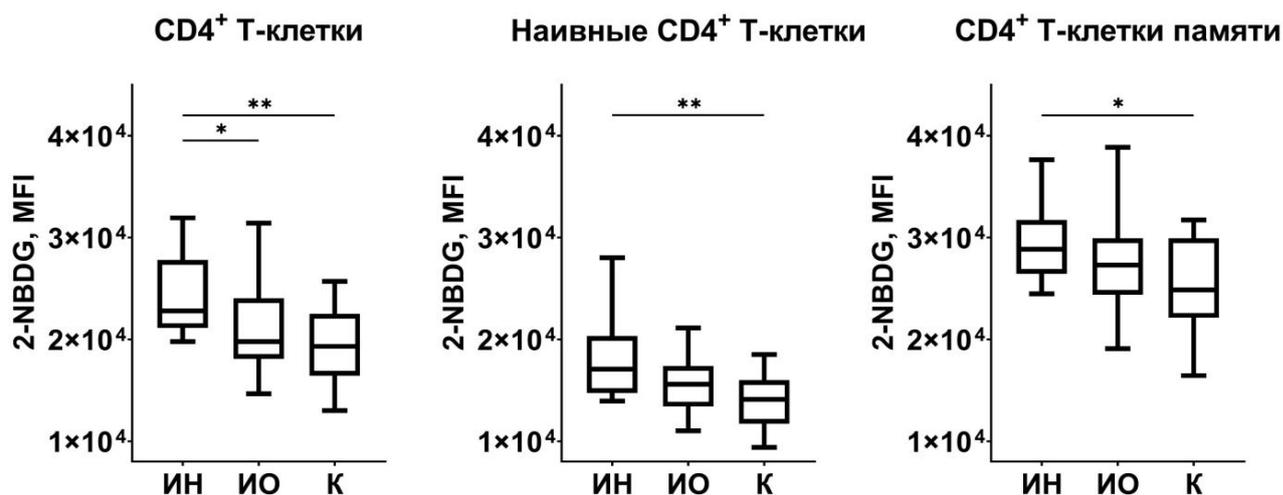


Рисунок 3.2.2 – Интенсивность потребления аналога глюкозы (2-NBDG) $CD4^+$ Т-лимфоцитами иммунологических неответчиков (ИН, n=18), иммунологических ответчиков (ИО, n=21) и относительно здоровых добровольцев (К, n=22)

Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90 %-ые перцентили (вертикальные отрезки). * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$. Группы количественных данных сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки. MFI: *англ.* Mean Fluorescence Intensity – средняя интенсивность флуоресценции.

Из вышесказанного следует, что при ВИЧ-инфекции активность захвата глюкозы $CD4^+$ Т-лимфоцитами существенно возрастает и достигает максимума у ИН. Полученные сведения согласуются с данными литературы. Ранее Palmer и соавторы показали, что при ВИЧ-инфекции $CD4^+$ Т-клетки потребляют существенно больше глюкозы [310]. Кроме того, было показано, что у ИН, в сравнении с ИО и здоровыми добровольцами, повышена экспрессия транспортера глюкозы Glut1 на поверхности $CD4^+$ Т-клеток [259]. В нашей работе высокая интенсивность захвата глюкозы $CD4^+$ Т-лимфоцитами ИН была продемонстрирована напрямую с помощью ее флуоресцентного аналога 2-NBDG.

Во всех исследуемых группах количество глюкозы, потребляемой $CD4^+$ Т-клетками, прямо коррелировало с уровнем экспрессии рецептора CD71 на их поверхности (рисунок 3.2.3). При этом наиболее сильная связь между двумя показателями была установлена в группе ИН ($R = 0,662$; $p < 0,01$).

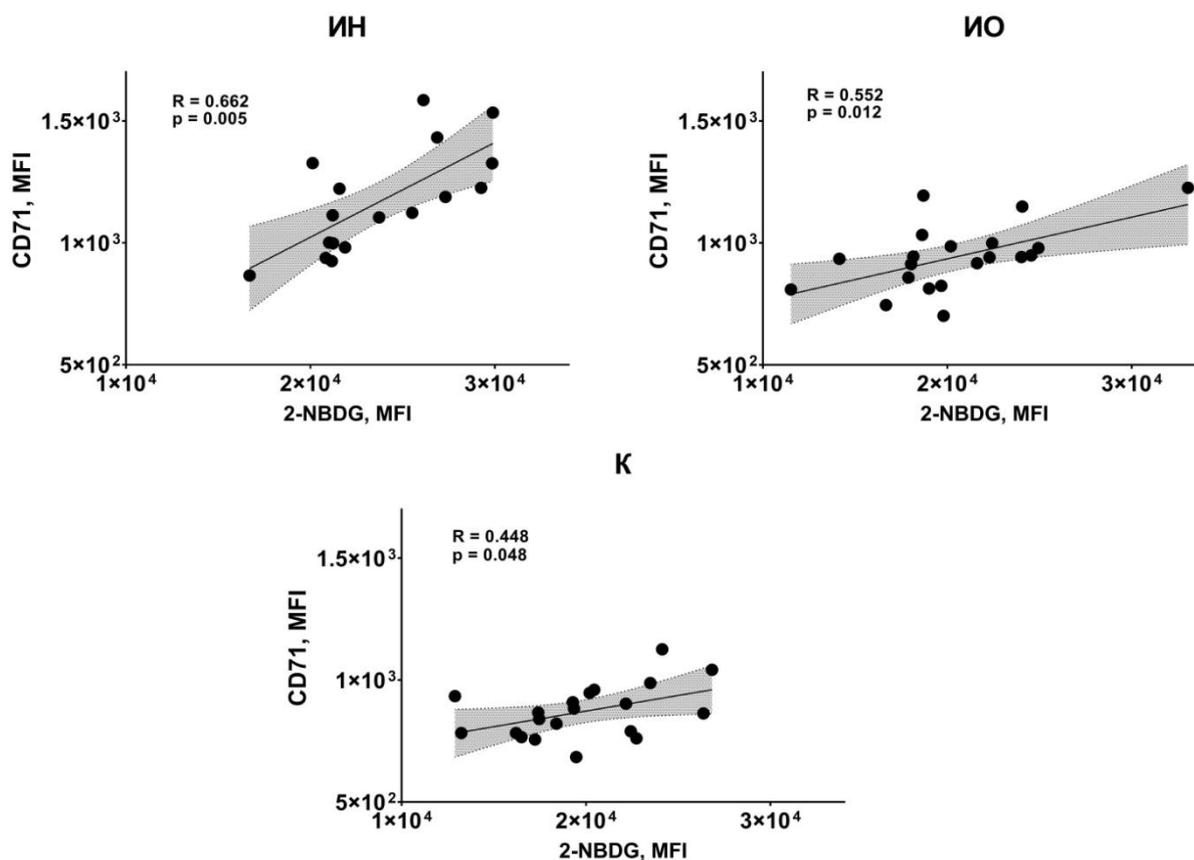


Рисунок 3.2.3 – Связь между уровнем потребления аналога глюкозы (2-NBDG) и экспрессией рецептора CD71 в CD4⁺ Т-лимфоцитах иммунологических неответчиков (ИИ, n=18), иммунологических ответчиков (ИО, n=21) и относительно здоровых добровольцев (К, n=22)

Примечательно, что делящиеся CD4⁺ Т-клетки ИИ поглощают значительно больше глюкозы в сравнении с пролиферирующими CD4⁺ Т-лимфоцитами других исследуемых групп (рисунок 3.2.4; $r_{ИИ-ИО} < 0,05$, $r_{ИИ-К} < 0,05$). При этом усиленный захват глюкозы 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.

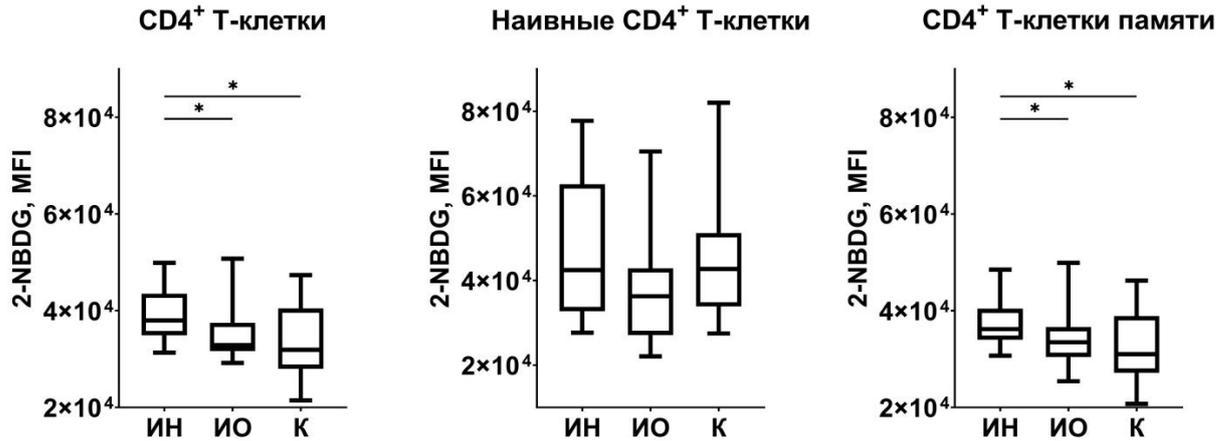


Рисунок 3.2.4 – Интенсивность потребления аналога глюкозы (2-NBDG) делящимися $CD4^+$ Т-лимфоцитами иммунологических неответчиков (ИН, n=18), иммунологических ответчиков (ИО, n=21) и относительно здоровых добровольцев (К, n=22)

Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90 %-ые перцентили (вертикальные отрезки). * – $p < 0,05$. Группы сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; критерий Тьюки. MFI: *англ.* Mean Fluorescence Intensity – средняя интенсивность флуоресценции.

На низкую эффективность метаболических процессов в $CD4^+$ Т-клетках памяти ИН указывает и наличие обратной корреляционной зависимости (рисунок 3.2.5) между интенсивностью захвата глюкозы пролиферирующими $CD4^+$ Т-лимфоцитами памяти и абсолютной численностью $CD4^+$ Т-клеток в крови ВИЧ-инфицированных пациентов.

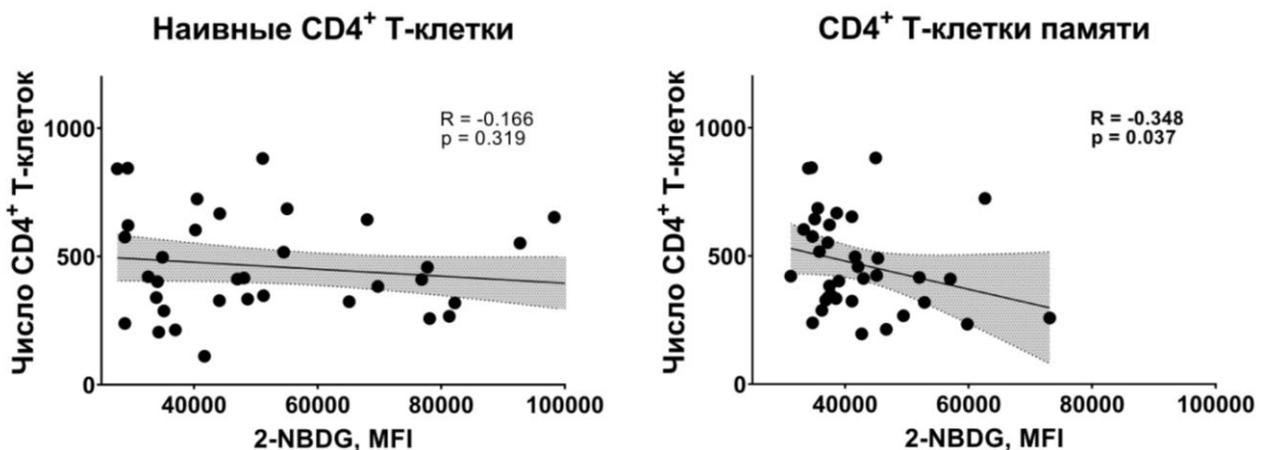


Рисунок 3.2.5 – Связь между уровнем потребления аналога глюкозы (2-NBDG) делящимися $CD4^+$ Т-клетками и абсолютным количеством $CD4^+$ Т-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных доноров (n=39)

Связи между уровнем потребления глюкозы делящимися наивными CD4⁺ Т-лимфоцитами и абсолютным количеством CD4⁺ Т-клеток в крови установлено не было.

Важно отметить, что метод определения потребления глюкозы с использованием ее флуоресцентного аналога 2-NBDG имеет свои ограничения. В частности, исследователи отмечают, что 2-NBDG способен проникать в лимфоциты мыши в присутствии ингибиторов транспортеров глюкозы Glut1 и Glut3 [423]. В этом ключе наиболее вероятным механизмом проникновения 2-NBDG в Т-лимфоциты является трансмембранный перенос через транспортер Glut2, экспрессируемый на поверхности активированных наивных Т-лимфоцитах и Т-клетках памяти [134]. До фактического подтверждения этой гипотезы следует с осторожностью интерпретировать данные о поглощении данного флуоресцентного аналога.

Продуктивная пролиферация CD4⁺ Т-лимфоцитов обеспечивается не только активным захватом глюкозы, но и ее превращением в молочную кислоту в ходе гликолиза. Образование молочной кислоты является необходимым фактором для усиления потока углерода в гликолитический путь и повышения уровня биосинтеза и образования энергии. Молочная кислота, формируемая в ходе гликолиза CD4⁺ Т-клетками, экскретируется во внеклеточное пространство и, в условиях *in vitro*, закисляет его. Поэтому в настоящей работе для определения интенсивности гликолиза в CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти ИН, ИО и здоровых доноров мы использовали технологию анализа внеклеточных потоков, измеряющую скорость ацидификации среды (англ. extracellular acidification rate – ECAR). На базальном уровне скорость ацидификации среды CD4⁺ Т-клетками памяти ВИЧ-инфицированных пациентов была существенно снижена в сравнении с показателями здоровых доноров ($p_{ин} < 0,01$; $p_{ио} < 0,001$; рисунок 3.2.6А).

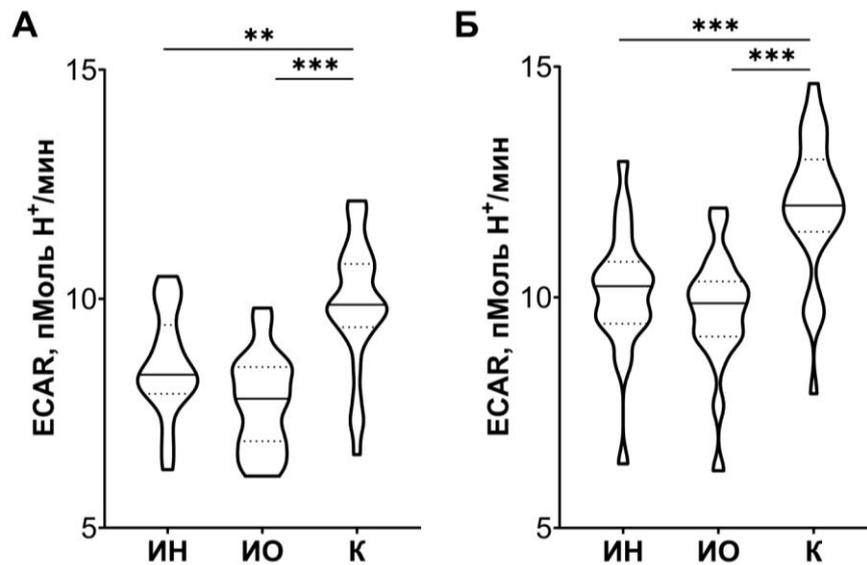


Рисунок 3.2.6 – Скорость закисления среды (ЕСАР) CD4⁺ Т-лимфоцитами памяти до (А) и после (Б) стимуляции фитогемагглютинином

Представлены медианы (сплошные горизонтальные линии) и интерквартильные размахи (пунктирные горизонтальные линии); ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; Группы количественных данных сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки. ИН – иммунологические неответчики ($n=4$, $R=6$), ИО – иммунологические ответчики ($n=4$, $R=6$), К – контрольная группа ($n=4$, $R=6$).

Усиление гликолиза, как правило, происходит вскоре после получения активационного сигнала CD4⁺ Т-лимфоцитами памяти [198]. Мы использовали кратковременную (40 мин) *in vitro* стимуляцию ФГА, чтобы оценить метаболический ответ CD4⁺ Т-клеток памяти, полученных из крови ИН, ИО и здоровых людей, на активацию. Было установлено, что стимуляция CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти ФГА в течение 40 мин приводит к увеличению ЕСАР данных клеток ($p < 0,05$). Тем не менее, в образцах ВИЧ-инфицированных пациентов показатель ЕСАР после кратковременной стимуляции остается сниженным в сравнении с таковым неинфицированных доноров ($p < 0,001$; рисунок 3.2.6Б).

Принято считать, что показатель ЕСАР прямо пропорционален скорости выброса молочной кислоты Т-лимфоцитами. Данное утверждение основано на том, что перенос молочной кислоты реализуется симпортным механизмом, одновременно транспортирующим молекулу молочной кислоты и H⁺, что приводит к закислению внеклеточного пространства [164]. Тем не менее, CO₂,

продуцируемый в ходе работы митохондрий, также может вносить существенный вклад в ацидификацию микроокружения клеток [280, 281]. В связи с этим, для более точной оценки продукции молочной кислоты $CD4^+$ Т-лимфоцитами памяти ИН, ИО и здоровых людей был определен показатель скорости выброса протонов (*англ.* Proton efflux rate – PER), исключающий вклад CO_2 в ацидификацию внеклеточной среды [281].

В результате было установлено, что у ВИЧ-инфицированных пациентов скорость выброса протонов $CD4^+$ Т-клетками памяти на базальном уровне была существенно снижена в сравнении с показателями здоровых доноров ($p < 0,001$; рисунок 3.2.7А).

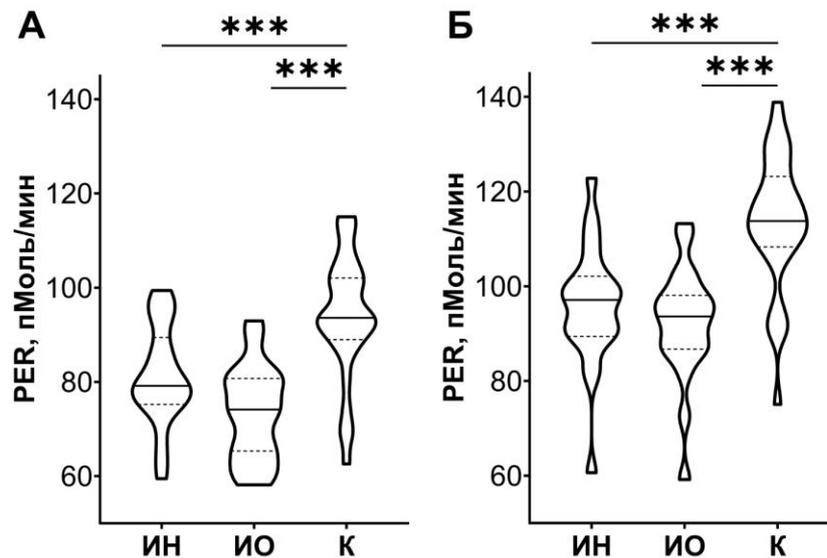


Рисунок 3.2.7 – Скорость выброса протонов (PER) $CD4^+$ Т-лимфоцитами памяти до (А) и после (Б) стимуляции фитогемагглютинином

Представлены медианы (сплошные горизонтальные линии) и интерквартильные размахи (пунктирные горизонтальные линии); *** – $p < 0,001$. Группы количественных данных сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки. ИН – иммунологические неответчики ($n=4$, $R=6$), ИО – иммунологические ответчики ($n=4$, $R=6$), К – контрольная группа ($n=4$, $R=6$).

Как и в случае с ECAR, стимуляция $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти ФГА в течение 40 мин привела к увеличению показателя PER ($p < 0,05$). Тем не менее, даже после кратковременной стимуляции PER в образцах ВИЧ-инфицированных пациентов оставался сниженным в сравнении с таковым неинфицированных

доноров ($p < 0,001$; рисунок 3.2.7Б). Полученные данные с большой вероятностью позволяют предположить, что продукция молочной кислоты в $CD4^+$ Т-лимфоцитах памяти ИН и ИО значительно снижена.

Таким образом, полученные данные выявили несоответствие между интенсивностью потребления глюкозы и продукции молочной кислоты $CD4^+$ Т-лимфоцитами памяти ИН. Несмотря на то, что пролиферирующие $CD4^+$ Т-клетки памяти ИН существенно превосходят аналогичные клетки неинфицированных субъектов по количеству потребляемой ими глюкозы, поглощение этого субстрата $CD4^+$ Т-лимфоцитами памяти ИН не сопровождается активным формированием молочной кислоты в ходе гликолиза. Поскольку усиление гликолиза является необходимым условием для митотического деления $CD4^+$ Т-лимфоцитов [39, 148, 282], можно предположить, что обнаруженное нами несоответствие между высоким уровнем пролиферации, активным потреблением глюкозы и низкой продукцией лактата $CD4^+$ Т-клетками памяти ИН лежит в основе их слабой регенерации.

Представленные сведения поднимают два важных вопроса: почему делящиеся $CD4^+$ Т-лимфоциты памяти ИН усиливают потребление глюкозы, и что препятствует формированию молочной кислоты данными клетками? Известно, что при пролиферации Т-лимфоциты захватывают и метаболизируют глюкозу для обеспечения активного биосинтеза нуклеотидов, белков и липидов (см. раздел 1.2). Исходя из этого, можно предположить, что повышенный уровень потребления глюкозы делящимися $CD4^+$ Т-клетками памяти ИН, по сравнению с аналогичными клетками неинфицированных доноров, обусловлен их более высокой потребностью в биосинтезе.

Для поддержания биосинтетических процессов Т-лимфоциты, как правило, преобразуют синтезируемую в ходе гликолиза пировиноградную кислоту в молочную. Однако мы не зарегистрировали повышения продукции молочной кислоты $CD4^+$ Т-клетками памяти ИН. Более того, уровень аэробного гликолиза в $CD4^+$ Т-лимфоцитах памяти ИН был снижен в сравнении с показателями неинфицированных субъектов. Полученные данные указывают на то, что в $CD4^+$

Т-клетках памяти ИИ метаболические пути, обеспечивающие пролиферацию, могут быть разобщены.

К настоящему моменту наиболее подробно описан один механизм, способный препятствовать усилению гликолиза в активированных Т-лимфоцитах – это проведение сигнала от ингибирующих рецепторов [313, 315]. Ранее мы показали, что у ИИ доля CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти, экспрессирующих ингибиторные рецепторы PD-1 и TIGIT, существенно повышена. Кроме того, увеличена плотность экспрессии данных маркеров на поверхности несущих их клеток (см. раздел 3.1). Таким образом, можно предположить, что относительно низкая интенсивность аэробного гликолиза в CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти ИИ связана с истощением данных клеток на фоне хронической активации. Стоит отметить, что ранее снижение гликолитической активности CD4⁺ Т-лимфоцитов на фоне хронической активации также было описано у пациентов с ревматоидным артритом [407] и рассеянным склерозом [334]. Как и при ВИЧ-инфекции, при этих заболеваниях CD4⁺ Т-клетки подвергаются персистирующей антигенной стимуляции. Таким образом, снижение интенсивности аэробного гликолиза и нарушение процесса пролиферации в CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти ИИ могут быть частью единого механизма адаптации к хронической иммунной активации.

3.3 – Активное потребление метаболических субстратов CD4⁺ Т-лимфоцитами иммунологических неответчиков

Потребление пальмитиновой кислоты

Глюкоза является важным, но не единственным источником биосинтетических субстратов и энергии для CD4⁺ Т-лимфоцитов. Так, CD4⁺ Т-клетки активно используют β-окисление жирных кислот в митохондриях для продукции АТФ. Тем не менее, вопрос о том, необходимы ли экзогенные жирные кислоты для поддержания β-окисления в периферических CD4⁺ Т-лимфоцитах, остается открытым. В данной работе мы использовали флуоресцентный аналог пальмитиновой кислоты BODIPY FL C16, чтобы оценить уровень потребления

экзогенных длинноцепочечных жирных кислот в CD4⁺ Т-клетках здоровых людей, а также ВИЧ-инфицированных ИИ и ИО.

Было установлено, что покоящиеся CD4⁺ Т-лимфоциты используют экзогенные жирные кислоты в качестве одного из метаболических субстратов. Однако доля клеток, потребляющих пальмитиновую кислоту, конъюгированную с BODIPY, была невелика. У здоровых доноров данный показатель составил лишь 7,3 % (4,5-10,1 %). У ВИЧ-позитивных субъектов доля CD4⁺ Т-лимфоцитов, потребляющих аналог пальмитиновой кислоты BODIPY FL C16 из внеклеточной среды, составила 8,9 % (4,53-16,35 %) для ИИ и 8,9 % (5,0-12,8 %) для ИО. Статистически значимых отличий между группами ИИ, ИО и неинфицированных субъектов обнаружено не было.

Как и в случае с глюкозой, на первом этапе исследования в образцах ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на АРТ определяли особенности потребления пальмитиновой кислоты наивными CD4⁺ Т-клетками и CD4⁺ Т-клетками памяти в покоящемся состоянии и при пролиферации. Оценка интенсивности флуоресценции BODIPY FL C16 показала, что среди покоящихся CD4⁺ Т-лимфоцитов клетки памяти поглощают больше пальмитиновой кислоты, чем наивные клетки ($p < 0,001$; рисунок 3.3.1). При пролиферации уровень потребления субстрата возрастал в обеих субпопуляциях CD4⁺ Т-лимфоцитов ($p < 0,001$). При этом захват пальмитиновой кислоты при вступлении наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов в деление значительно увеличивался (медиана 25 %) и существенно превышал соответствующий показатель CD4⁺ Т-клеток памяти (медиана 11 %; $p < 0,001$). У здоровых людей захват пальмитиновой кислоты в субпопуляциях CD4⁺ Т-клеток также изменялся неодинаково: в делящихся наивных CD4⁺ Т-лимфоцитах потребление субстрата увеличивалось почти на 48 %, в то время как в клетках памяти лишь на 13 %.

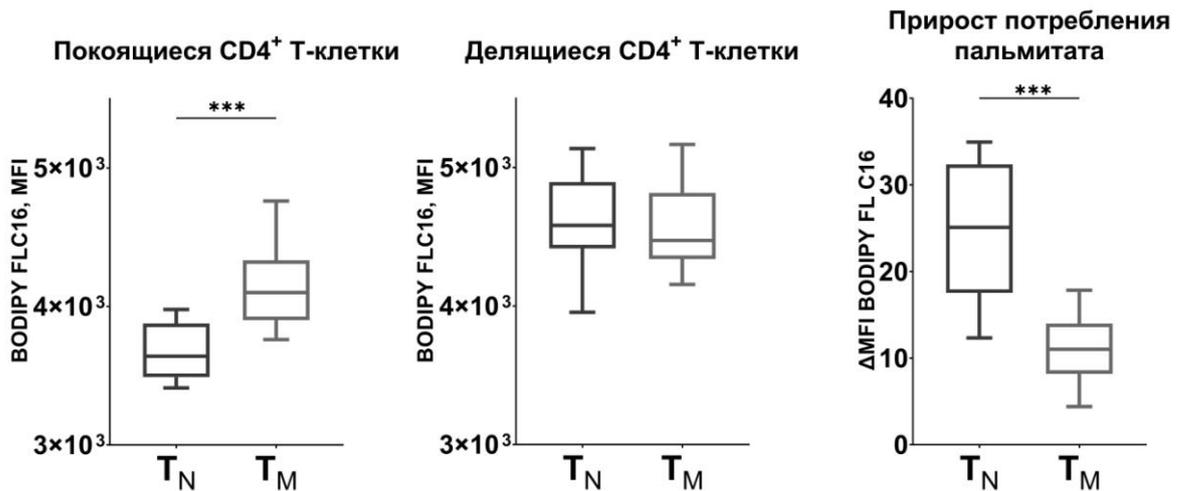


Рисунок 3.3.1 – Уровень поглощения аналога жирных кислот (BODIPY FL C16) наивными CD4⁺ Т-лимфоцитами (T_N) и CD4⁺ Т-клетками памяти (T_M) ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на антиретровирусную терапию (n=18)

Представлены медианы (горизонтальные линии) интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10–90 %-ые интервалы (вертикальные отрезки); *** – $p < 0,001$ (U-критерий Манна-Уитни). MFI (англ. Mean Fluorescence Intensity) – средняя интенсивность флуоресценции. ΔMFI – изменение средней интенсивности флуоресценции. Прирост потребления пальмитата рассчитывали как разницу между средней интенсивностью флуоресценции (ΔMFI) BODIPY FL C16 в пролиферирующих и покоящихся клетках.

Таким образом, на примере пальмитиновой кислоты было показано, что лишь малая часть CD4⁺ Т-лимфоцитов крови потребляет жирные кислоты из внеклеточного пространства. Вероятно, что, как и CD8⁺ Т-клетки памяти, CD4⁺ Т-лимфоциты преимущественно синтезируют жирные кислоты *de novo* из углерода, поступающего с глюкозой [297]. Установление принадлежности CD4⁺ Т-лимфоцитов, потребляющих аналог пальмитата BODIPY FL C16, к определенной субпопуляции в рамках данного исследования не проводилось. В литературе относительно субпопуляционной принадлежности данных клеток также нет единого мнения. Ранее было показано, что инкубация активированных CD4⁺ Т-клеток в среде, содержащей жирные кислоты, приводит к увеличению доли регуляторных CD4⁺ Т-лимфоцитов в общей популяции [271]. Этот факт позволяет предположить, что BODIPY-позитивные CD4⁺ Т-клетки могут относиться к регуляторным Т-лимфоцитам. Тем не менее, Pasella *et al.* продемонстрировали,

что уровень поглощения флуоресцентного аналога пальмитата в регуляторных и конвенциональных CD4⁺ Т-лимфоцитах существенно не отличается [306]. Таким образом, роль экзогенных жирных кислот в жизнедеятельности различных субпопуляций CD4⁺ Т-клеток требует дальнейшего изучения.

Другим важным выводом, который можно сделать исходя из полученных данных, является то, что CD4⁺ Т-клетки памяти ВИЧ-инфицированных пациентов с дискордантным ответом на АРТ при переходе к делению лишь незначительно (на уровне 11 %) усиливают потребление пальмитиновой кислоты. Представленные сведения подтверждают гипотезу, сформулированную ранее: CD4⁺ Т-лимфоциты памяти отличаются от наивных клеток меньшим масштабом метаболической перестройки при активации, что позволяет им быстрее адаптироваться к биосинтетическим потребностям, сопутствующим пролиферации.

Анализ образцов доноров трех групп показал следующее. Несмотря на то, что относительное количество клеток, потребляющих флуоресцентный аналог пальмитиновой кислоты, было сопоставимо во всех исследуемых группах, объем потребления субстрата существенно отличался (рисунок 3.3.2). Так, CD4⁺ Т-лимфоциты ИН потребляли больше пальмитиновой кислоты, чем клетки здоровых доноров ($p < 0,01$). Отличия между здоровыми людьми и ИН в потреблении пальмитиновой кислоты CD4⁺ Т-лимфоцитами были обнаружены как в пуле наивных клеток, так и среди клеток памяти ($p < 0,01$). Полученные данные впервые демонстрируют, что CD4⁺ Т-лимфоциты ИН поглощают существенно больше экзогенных жирных кислот, чем аналогичные клетки неинфицированных людей.

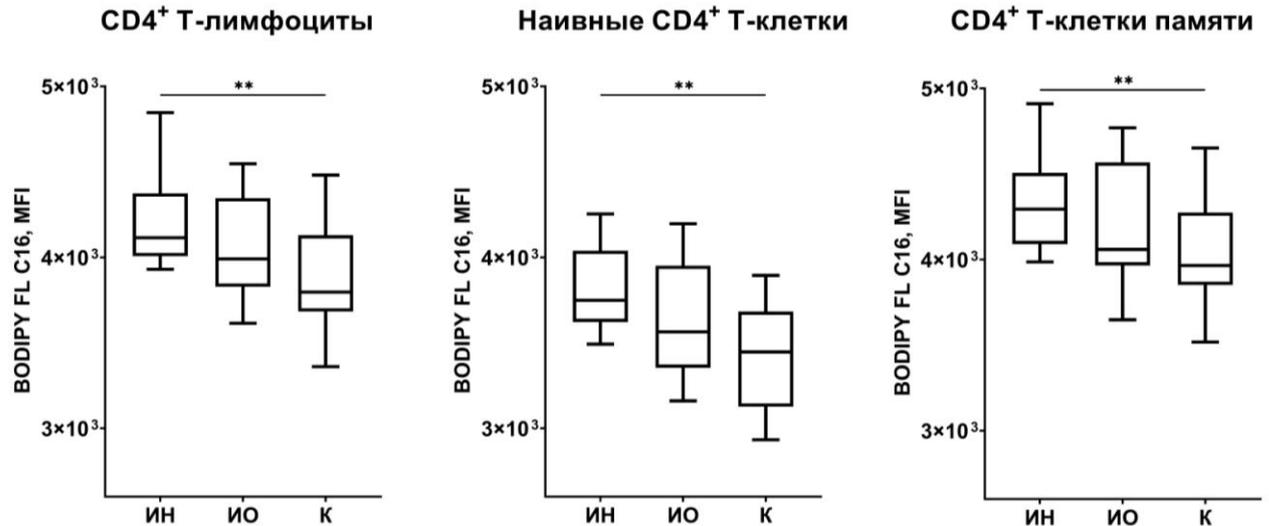


Рисунок 3.3.2 – Потребление аналога пальмитиновой кислоты (BODIPY FL C16) в CD4⁺ Т-лимфоцитах здоровых людей (К, n=22), ВИЧ-инфицированных лиц со стандартным (ИО, n=21) и дискордантным (ИН, n=18) ответом на терапию

Представлены медианы, интерквартильные размахи и 10-90 %-ые перцентили.

** – $p < 0,01$. Группы количественных данных сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки. MFI: *англ.* Mean Fluorescence Intensity – средняя интенсивность флуоресценции.

Во всех исследуемых группах была установлена корреляционная зависимость между уровнем экспрессии CD71 на поверхности CD4⁺ Т-лимфоцитов и интенсивностью потребления пальмитата данными клетками (рисунок 3.3.3).

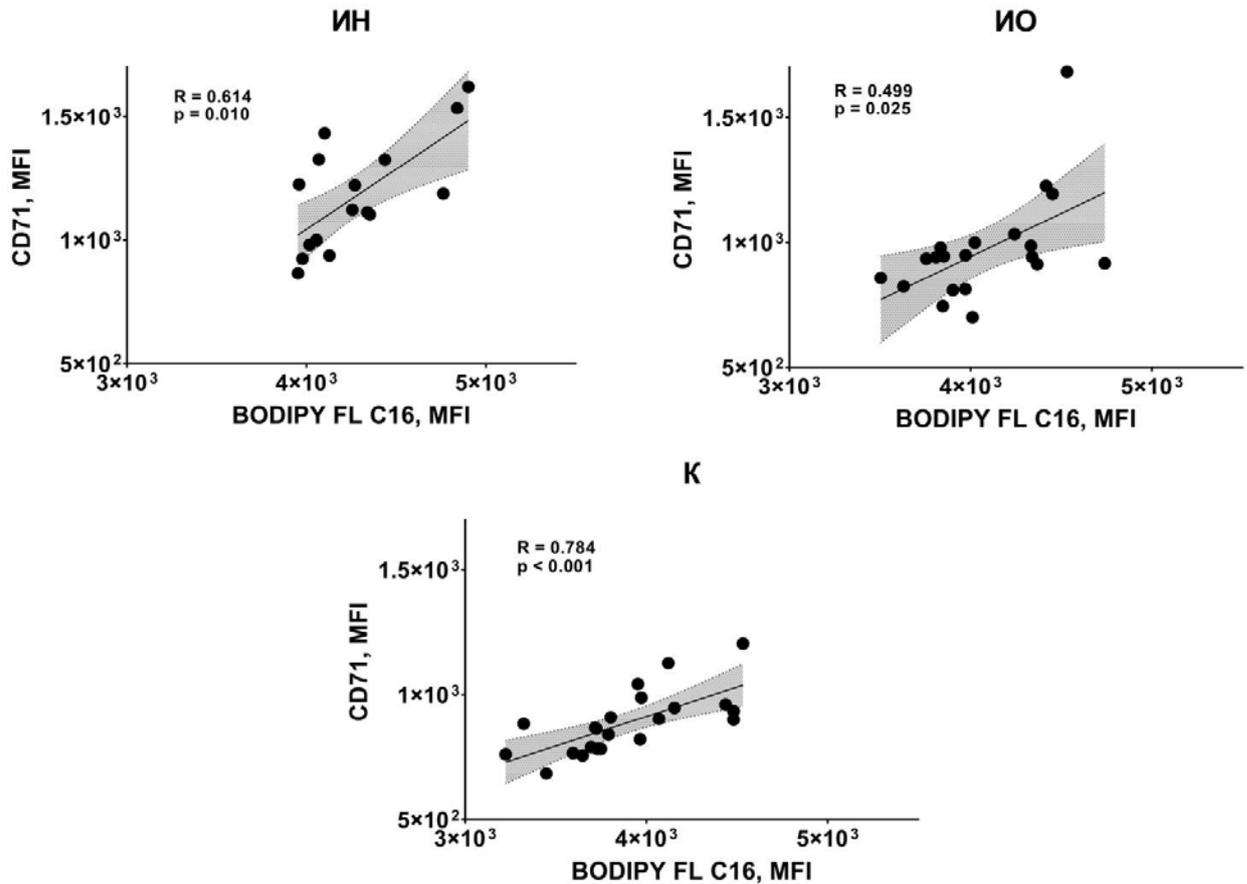


Рисунок 3.3.3 – Связь между интенсивностью потребления аналога пальмитиновой кислоты (BODIPY FL C16) и экспрессией рецептора CD71 в $CD4^+$ Т-лимфоцитах иммунологических неответчиков (ИИ, n=18), иммунологических ответчиков (ИО, n=21) и здоровых добровольцев (К, n=22)

Делящиеся $CD4^+$ Т-лимфоциты ИИ отличались от таковых здоровых людей повышенным потреблением пальмитиновой кислоты ($p < 0,05$; рисунок 3.3.4). Как и в случае с глюкозой, отличия между двумя группами были обусловлены усиленным потреблением пальмитата в субпопуляции делящихся $CD4^+$ Т-клеток памяти ($p < 0,05$). В субпопуляции пролиферирующих наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов статистических отличий в количестве потребляемой пальмитиновой кислоты между ИИ и здоровыми донорами обнаружено не было ($p > 0,05$). Полученные данные позволяют заключить, что $CD4^+$ Т-клеткам памяти ИИ для регенерации требуется существенно больше экзогенных жирных кислот, чем клеткам неинфицированных субъектов.

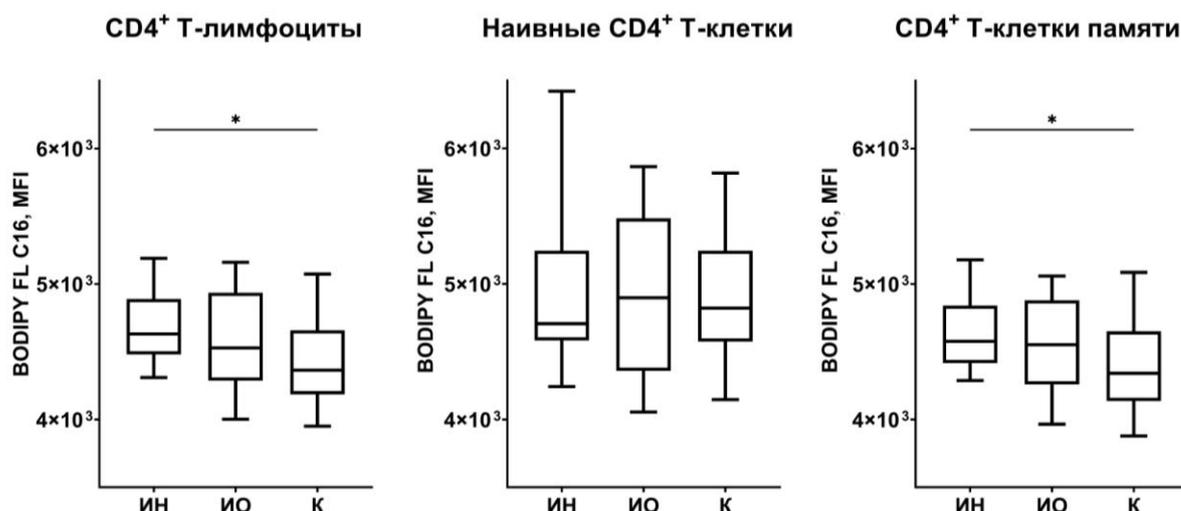


Рисунок 3.3.4 – Интенсивность потребления аналога пальмитиновой кислоты (BODIPY FL C16) пролиферирующими CD4⁺ Т-лимфоцитами иммунологических неответчиков (ИИ, n=18), иммунологических ответчиков (ИО, n=21) и здоровых добровольцев (К, n=22)

Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90 %-ые перцентили (вертикальные отрезки). * – $p < 0,05$. Группы количественных данных сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки. MFI: *англ.* Mean Fluorescence Intensity – средняя интенсивность флуоресценции.

Экспрессия транспортера нейтральных аминокислот – ASCT2

Глутамин является важным источником углерода и азота, как в покоящихся, так и в пролиферирующих CD4⁺ Т-лимфоцитах. Перенос глутамина во внутриклеточное пространство осуществляется целым рядом белков, однако при пролиферации ключевая роль принадлежит транспортеру нейтральных аминокислот ASCT2 [354]. В данном исследовании уровень экспрессии ASCT2 на поверхности CD4⁺ Т-клеток ИИ, ИО и неинфицированных субъектов определяли с помощью флуоресцентных антител.

Оценка экспрессии транспортера ASCT2 в CD4⁺ Т-лимфоцитах ВИЧ-инфицированных пациентов показала следующее (рисунок 3.3.5). Во всех исследуемых группах абсолютное большинство CD4⁺ Т-клеток экспрессировало ASCT2. При этом уровень экспрессии транспортера в CD4⁺ Т-лимфоцитах

здоровых людей и ВИЧ-позитивных пациентов существенно не отличался ($p > 0,05$).

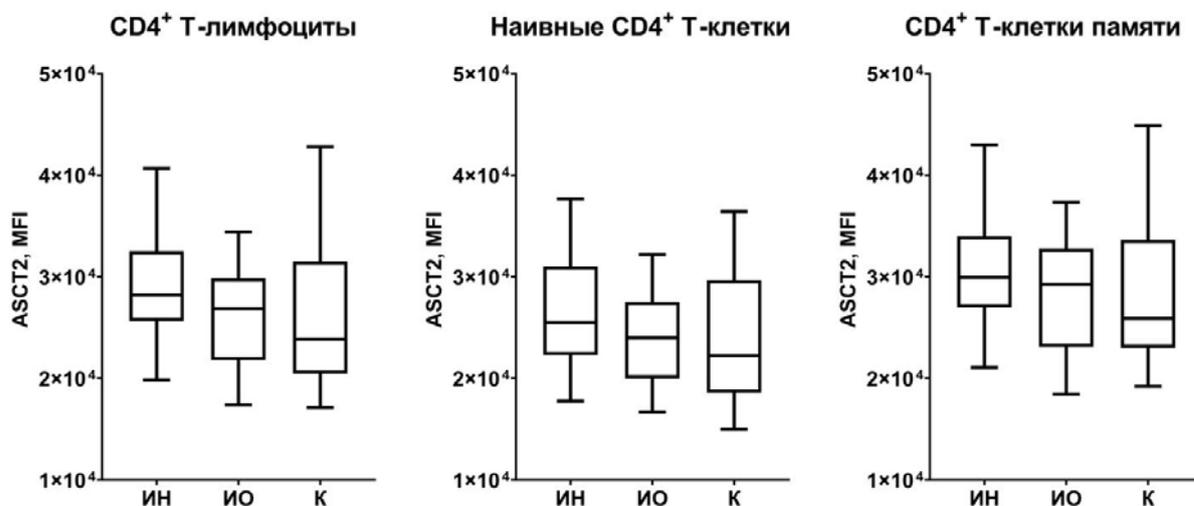


Рисунок 3.3.5 – Экспрессия транспортера глутамин АSCT2 на CD4⁺ Т-лимфоцитах иммунологических неответчиков (ИН, n=18), иммунологических ответчиков (ИО, n=21) и здоровых добровольцев (К, n=22)

Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90 %-ые перцентили (вертикальные отрезки). Группы количественных данных сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки. MFI: *англ.* Mean Fluorescence Intensity – средняя интенсивность флуоресценции.

Во всех исследуемых группах пролиферация CD4⁺ Т-лимфоцитов привела к увеличению экспрессии ASCT2 в данных клетках ($p < 0,001$). Несмотря на то, что пролиферация CD4⁺ Т-клеток сопровождалась усилением экспрессии ASCT2, корреляционной зависимости между уровнями экспрессии CD71 и транспортера нейтральных аминокислот на поверхности CD4⁺ Т-лимфоцитов установлено не было.

Необходимо отметить, что пролиферирующие CD4⁺ Т-лимфоциты ИН отличались от таковых контрольной группы повышенной экспрессией ASCT2 ($p < 0,05$; рисунок 3.3.6). Данные отличия прослеживались как в пуле наивных CD4⁺ Т-клеток, так и среди CD4⁺ Т-клеток памяти ($p < 0,05$).

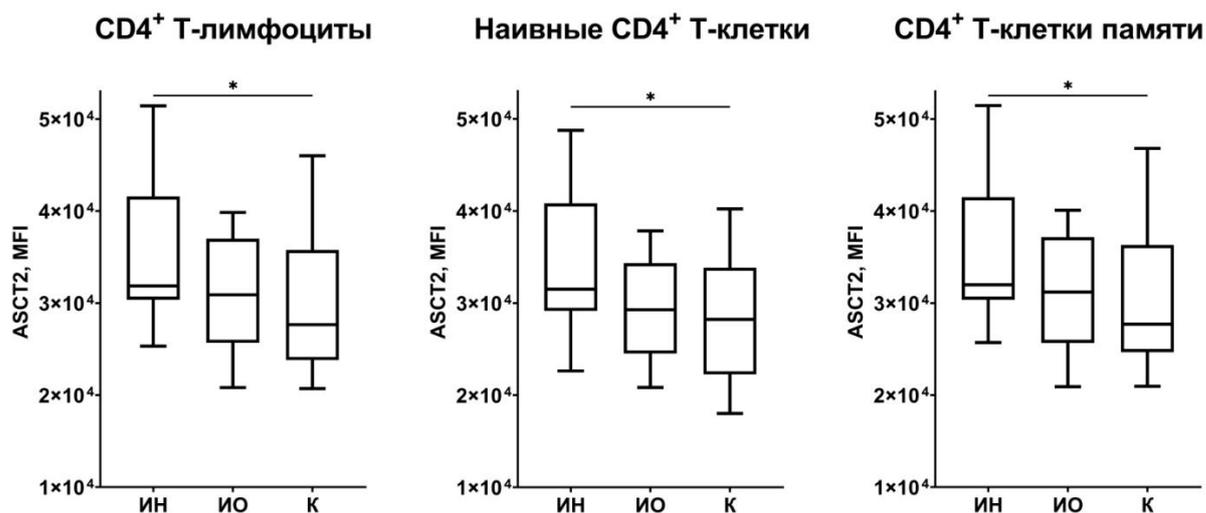


Рисунок 3.3.6 – Уровень экспрессии транспортера глутамина ASCT2 на пролиферирующих CD4⁺ Т-лимфоцитах иммунологических неответчиков (ИН, n=18), иммунологических ответчиков (ИО, n=21) и здоровых добровольцев (К, n=22)

Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90 %-ые перцентили (вертикальные отрезки). * – $p < 0,05$. Группы количественных данных сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки. MFI: *англ.* Mean Fluorescence Intensity – средняя интенсивность флуоресценции.

Из вышесказанного следует, что под контролем АРТ ВИЧ-инфекция не оказывает существенного влияния на экспрессию транспортера ASCT2 на поверхности покоящихся CD4⁺ Т-лимфоцитов. Данное утверждение справедливо как для ВИЧ-инфицированных ИО, так и для ИН. Тем не менее, делящиеся CD4⁺ Т-клетки ИН отличаются от таковых здоровых доноров повышенной экспрессией ASCT2. Исходя из этого, можно предположить, что при делении CD4⁺ Т-лимфоциты ИН испытывают большую потребность в нейтральных аминокислотах, чем клетки здоровых людей.

Уровень аутофагии

Углерод поступает в клетку не только путем поглощения экзогенных субстратов, но и в ходе переработки существующих клеточных компонентов путем аутофагии. Как правило, процесс аутофагии связывают с деградацией и переработкой избыточных или поврежденных материалов [112]. Помимо этого, в

Т-лимфоцитах аутофагия играет важную роль в использовании липидных капель, запасующих нейтральные ацилглицеролы [119]. Для измерения уровня аутофагии в $CD4^+$ Т-лимфоцитах ВИЧ-инфицированных пациентов и здоровых людей мы использовали флуоресцентный краситель на основе монодансилкадаверина, специфично встраивающийся в пре-аутофагосомы, аутофагосомы и аутофаголизосомы [376].

Анализ образцов ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков показал, что среди покоящихся $CD4^+$ Т-лимфоцитов клетки памяти демонстрируют повышенный уровень аутофагии в сравнении с наивными клетками ($p < 0,001$; рисунок 3.3.7).

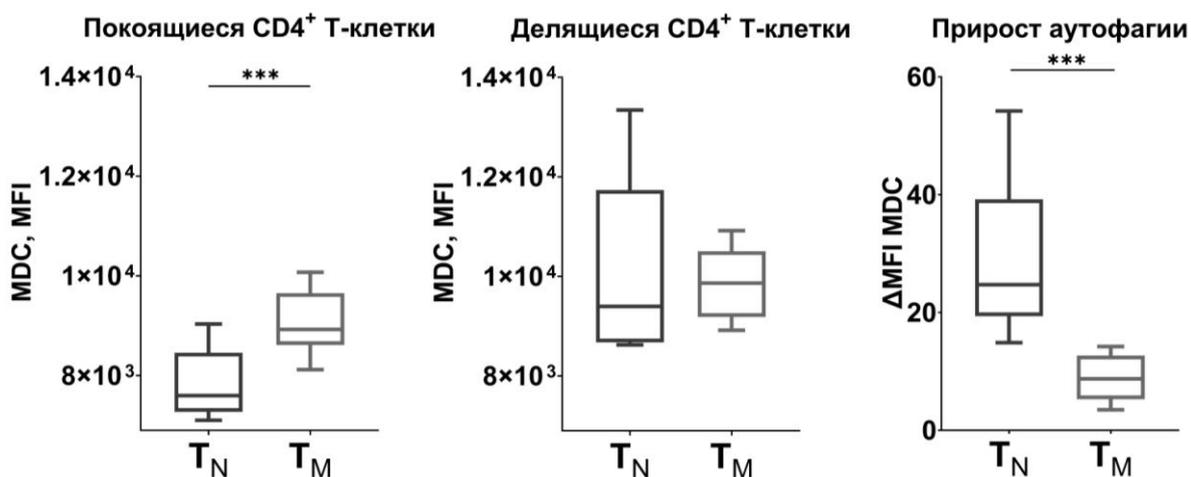


Рисунок 3.3.7 – Уровень аутофагии в наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитах и $CD4^+$ Т-клетках памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на лечение (n=18)

Представлены медианы, интерквартильные размахи и 10–90 %-ые интервалы; *** – $p < 0,001$ (U-критерий Манна-Уитни). Прирост аутофагии рассчитывали как разницу между средней интенсивностью флуоресценции (ΔMFI) производного монодансилкадаверина (MDC) в пролиферирующих и покоящихся клетках.

При переходе к пролиферации уровень аутофагии в обеих субпопуляциях усиливался ($p < 0,001$). В делящихся наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитах и $CD4^+$ Т-клетках памяти содержание аутофагосом было сопоставимым. Как и в случае с глюкозой и жирными кислотами, прирост аутофагии в пролиферирующих наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитах (медиана 24 %) превышал данный показатель в $CD4^+$ Т-клетках памяти (медиана 8 %; $p < 0,001$). Схожие закономерности были

зафиксированы у здоровых людей: в делящихся наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитах содержание аутофагосом увеличивалось почти на 41 %, в клетках памяти – на 10 %. Таким образом, при оценке интенсивности процессов аутофагии в наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитах и $CD4^+$ Т-клетках памяти была установлена та же закономерность, что была отмечена в разделах, посвященных потреблению глюкозы и жирных кислот. В частности, было показано, что, по сравнению с наивными $CD4^+$ Т-лимфоцитами, клеткам памяти для вступления в пролиферацию нужно совершить метаболическую перестройку меньшего масштаба.

В ходе исследования трех клинических групп было установлено, что $CD4^+$ Т-клетки ИН, вовлеченные в процесс аутофагии, содержат существенно больше аутофагосом, чем клетки неинфицированных субъектов ($p < 0,05$; рисунок 3.3.8). При этом повышенный уровень аутофагии наблюдался как в общем пуле $CD4^+$ Т-лимфоцитов ИН, так и среди наивных клеток и клеток памяти.

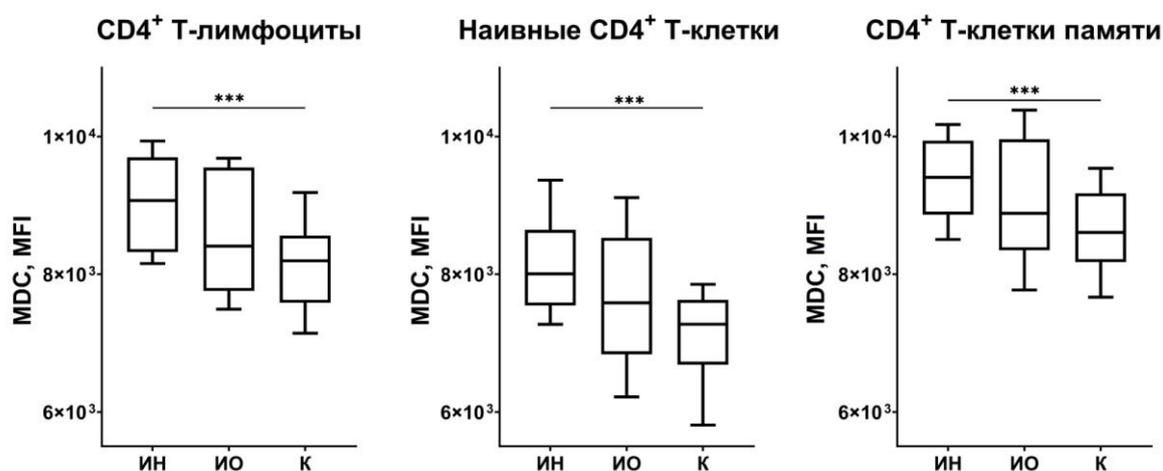


Рисунок 3.3.8 – Уровень аутофагии в $CD4^+$ Т-лимфоцитах иммунологических неответчиков (ИН, n=18), иммунологических ответчиков (ИО, n=21) и здоровых добровольцев (К, n=22)

Представлены медианы, интерквартильные размахи и 10-90 %-ые перцентили. *** – $p < 0,001$. Уровень аутофагии определяли с использованием производного монодансилкадаверина (MDC). MFI: *англ.* Mean Fluorescence Intensity – средняя интенсивность флуоресценции. ANOVA; критерий Тьюки.

Уровень аутофагии в субпопуляции $CD4^+$ Т-клеток прямо коррелировал с экспрессией рецептора трансферрина CD71 на их поверхности (рисунок 3.3.9).

Взаимосвязь между двумя параметрами была установлена как у относительно здоровых добровольцев, так и у ВИЧ-инфицированных ИО и ИН.

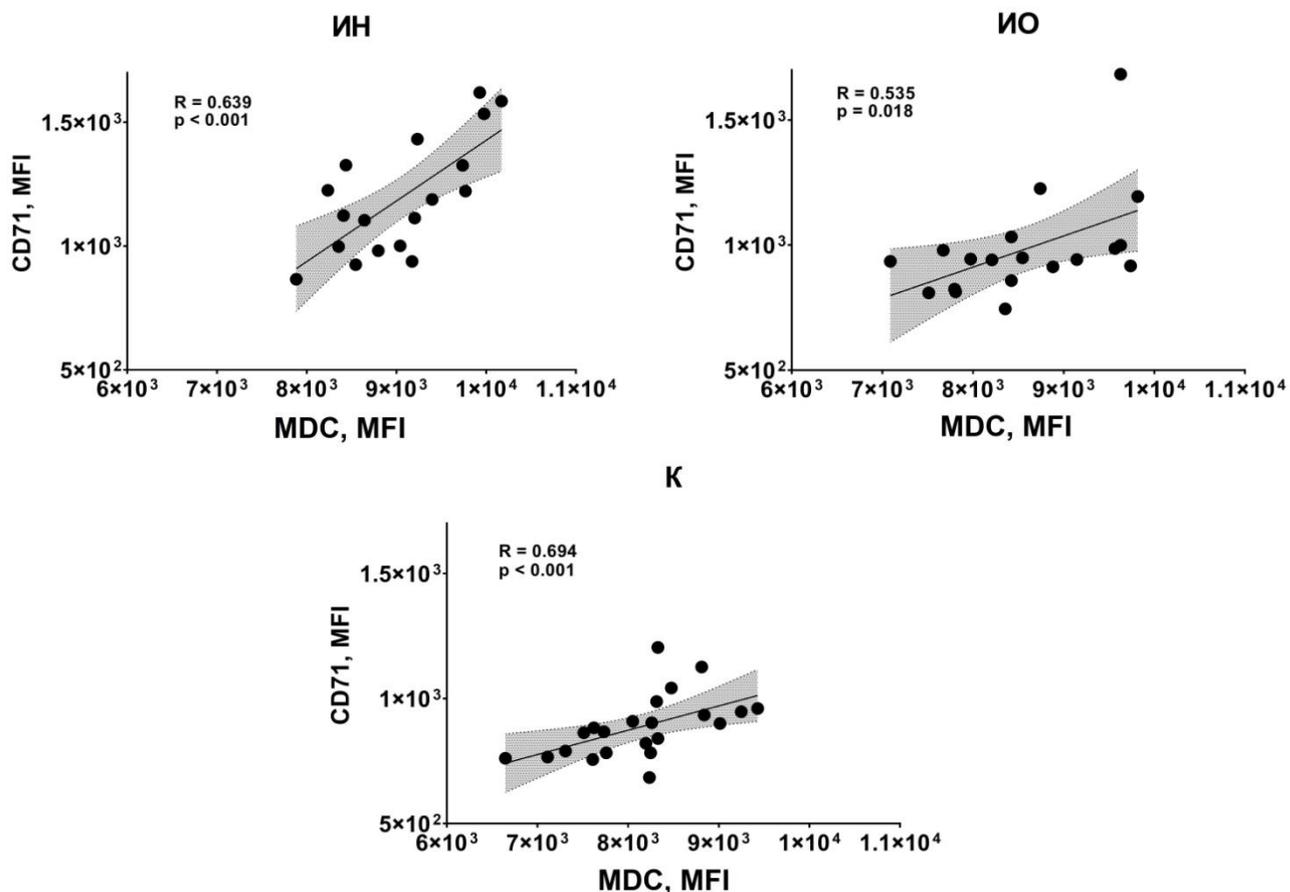


Рисунок 3.3.9 – Взаимосвязь между уровнями аутофагии и экспрессии рецептора CD71 в CD4⁺ Т-лимфоцитах иммунологических неответчиков (ИИ, n=18), иммунологических ответчиков (ИО, n=21) и здоровых добровольцев (К, n=22)

Пролиферирующие CD4⁺ Т-лимфоциты ИИ отличались от таковых здоровых людей повышенным уровнем аутофагии ($p < 0,05$; рисунок 3.3.10). Как и в случае с глюкозой и жирными и кислотами, отличия между группами были обусловлены высоким уровнем аутофагии в пуле клеток памяти ($p < 0,01$). В пуле наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов отличий между группами установлено не было.

Подводя итог, можно заключить, что делящиеся CD4⁺ Т-клетки памяти ИИ характеризуются повышенным потреблением экзогенных и эндогенных метаболитических 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. 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.

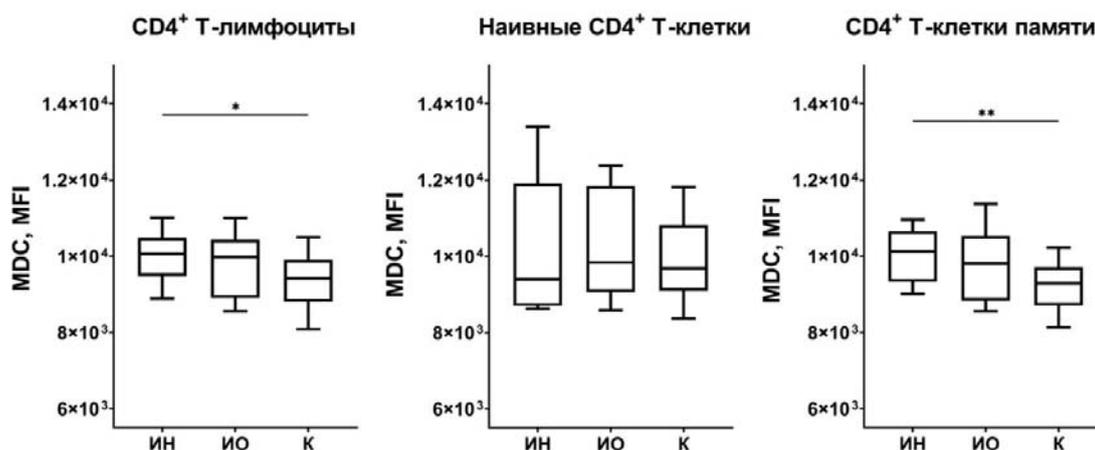


Рисунок 3.3.10 – Уровень аутофагии в пролиферирующих $CD4^+$ Т-лимфоцитах иммунологических неответчиков (ИН, n=18), иммунологических ответчиков (ИО, n=21) и здоровых добровольцев (К, n=22)

Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90 %-ые перцентили (вертикальные отрезки). * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$. Группы количественных данных сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки.

Важно отметить, что усиленное поглощение метаболических субстратов делящимися $CD4^+$ Т-клетками памяти ИН еще не говорит о том, что их утилизация завершается активным биосинтезом. Более того, сниженная активность аэробного гликолиза – одного из магистральных метаболических путей в пролиферирующих клетках – свидетельствует о том, что биосинтетические процессы в $CD4^+$ Т-лимфоцитах памяти ИН могут быть нарушены. В пользу этой гипотезы свидетельствуют и более ранние данные, показавшие, что *in vitro* активация покоящихся $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти, полученных от ИН, приводит к асимметричному делению, завершающемуся формированием различных по размеру клонов [21]. Различия в размере дочерних

CD4⁺ Т-клеток памяти ИН, вероятно, обусловлены недостатком макромолекул в материнских клетках. Вторым магистральным путем, поддерживающим пролиферацию CD4⁺ Т-лимфоцитов, является окислительное фосфорилирование митохондрий. От активности митохондриального дыхания зависит способность делящихся клеток окислять углеродные субстраты в ЦТК и «питать» сопряженные биосинтетические пути [197, 404, 409]. Исследованию функционального состояния митохондрий CD4⁺ Т-клеток памяти ИН будет посвящен следующий раздел данной работы.

3.4 – Нарушение работы митохондрий в CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти иммунологических неответчиков

Активность митохондрий при пролиферации Т-клеток, как правило, усиливается и дополняет гликолиз при синтезе макромолекул и энергии [89]. Ключевая роль в данном процессе принадлежит ЭТЦ, функционирование которой сопряжено с потреблением кислорода из внеклеточного пространства. В связи с этим, в настоящей работе активность дыхательной цепи митохондрий CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти оценивали, измеряя скорость потребления кислорода (*англ.* Oxygen consumption rate – OCR) данными клетками. Как и при исследовании аэробного гликолиза, в этих целях использовали технологию анализа внеклеточных потоков, позволяющую измерять OCR в реальном времени. Измерения проводили на базальном уровне, после кратковременной стимуляции ФГА, а также вслед за внесением ингибиторов митохондриального дыхания (схема эксперимента подробно описана в Главе 2).

Базальная скорость потребления кислорода CD4⁺ Т-клетками памяти, полученными от ИН, была меньше, чем у ИО ($p < 0,05$) и контрольных субъектов ($p < 0,001$; рисунок 3.4.1.А). Кратковременная активация клеток ФГА приводила к увеличению показателя митохондриального дыхания во всех исследуемых группах ($p < 0,01$). Однако активированные CD4⁺ Т-клетки памяти ВИЧ-инфицированных пациентов демонстрировали сниженный уровень OCR, в сравнении с соответствующим показателем здоровых людей ($p_{\text{ИН-К}} < 0,001$; $p_{\text{ИО-}}$

$p < 0,01$; рисунок 3.4.1.Б). Таким образом, в результате проведенного эксперимента было установлено, что у пациентов с дискордантным ответом иммунной системы на антиретровирусную терапию стимулированные $CD4^+$ Т-лимфоциты памяти характеризуется наиболее низкой скоростью потребления кислорода их митохондриями ($p_{ин-ио} < 0,05$).

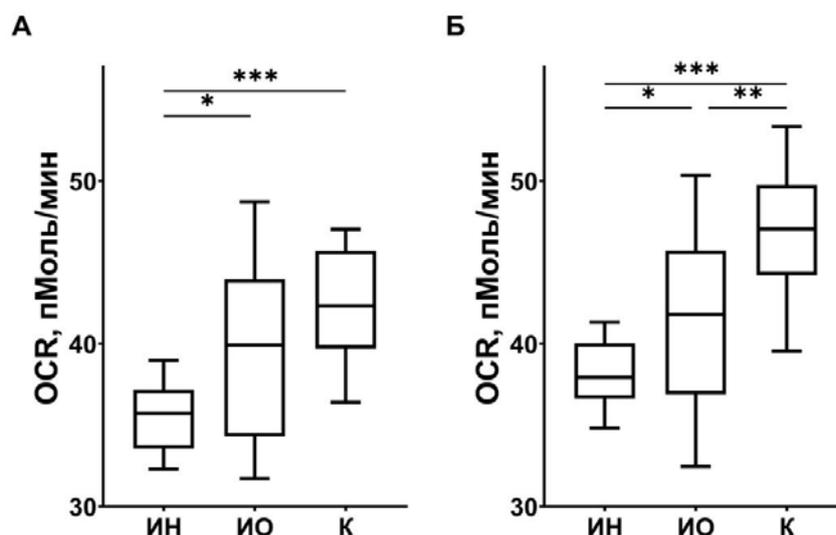


Рисунок 3.4.1 – Базальная скорость потребления кислорода (англ. Oxygen consumption rate – OCR) $CD4^+$ Т-клетками памяти иммунологических неответчиков (ИН, $n=4$, $R=6$), иммунологических ответчиков (ИО, $n=4$, $R=6$) и здоровых субъектов (К, $n=4$, $R=6$) в отсутствии (А) и присутствии фитогемагглютинаина (Б)

Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90 %-ые перцентили (вертикальные отрезки); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$. Группы количественных данных сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки.

Базальная скорость потребления кислорода является важным показателем митохондриального дыхания. Тем не менее, этот параметр динамичен и в значительной мере определяется функциональным состоянием клетки и условиями среды [253]. В связи с этим, для более объективной оценки активности митохондрий $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти был измерен дополнительный показатель – резервная дыхательная емкость митохондрий (spare respiratory capacity – SRC). SRC отражает энергетический потенциал исследуемых клеток, реализуемый в условиях стресса или при высокой потребности в АТФ [292].

Математически SRC выражается как разница между максимальным и базальным уровнями митохондриального дыхания.

В следующем эксперименте для измерения максимальных значений OCR к клеткам вносили протонофорный разобщитель FCCP, вызывающий диссипацию мембранного потенциала и приводящий к разобщению окисления и фосфорилирования в митохондриях [14]. В результате было установлено, что в условиях повышенного запроса на АТФ, созданных внесением протонофорного разобщителя FCCP, митохондрии CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти ИН не способны достичь показателей интенсивности потребления кислорода, характерных для здоровых людей ($p < 0,05$). Что более важно, резервная дыхательная емкость митохондрий таких клеток была существенно снижена в сравнении с показателями ИО ($p < 0,05$; рисунок 3.4.2) и неинфицированных субъектов ($p < 0,01$).

Известно, что окислительное фосфорилирование митохондрий выступает одним из основных источников энергии, запасаемой в форме АТФ. В связи с этим, в данном исследовании определение активности митохондриального дыхания в CD4⁺ Т-клетках памяти было сопряжено с оценкой их энергетического статуса. С этой целью в CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти измеряли общее содержание молекул АТФ и АДФ. Анализ проводили биолюминисцентным методом, основанным на АТФ-зависимой реакции окисления люциферина люциферазой. В результате исследования было установлено, что в обеих группах ВИЧ-инфицированных пациентов соотношение АДФ/АТФ было сопоставимо с показателями неинфицированных субъектов ($p > 0,05$).

Таким образом, полученные данные демонстрируют, что у ИН по сравнению с ИО и здоровыми людьми существенно снижен уровень митохондриального дыхания в CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти. Несмотря на то, что под действием митогенной стимуляции интенсивность окислительного фосфорилирования в CD4⁺ Т-клетках памяти ИН увеличивается, показатели этих пациентов не достигают значений, зафиксированных у ИО и здоровых субъектов. Полученные данные указывают на снижение дыхательной функции в CD4⁺ Т-

лимфоцитах памяти ВИЧ-инфицированных пациентов с неэффективным восстановлением иммунной системы в ответ на АРТ. О нарушении функции митохондрий в $CD4^+$ Т-лимфоцитах памяти ИИ также свидетельствуют данные, полученные при анализе резервной дыхательной емкости митохондрий, SRC. Эти сведения имеют особую важность, поскольку снижение SRC отражает нарушения в работе митохондрий, явно проявляющиеся лишь при предельной нагрузке на дыхательную цепь [70].

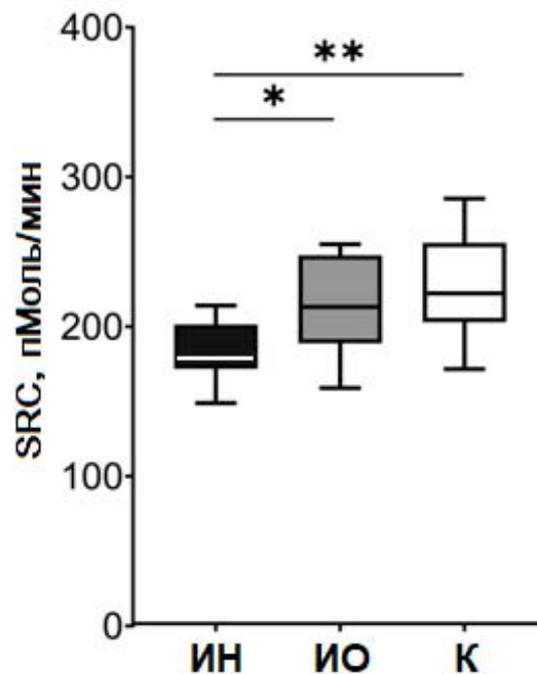


Рисунок 3.4.2 – Резервная дыхательная емкость митохондрий (англ. Spare Respiratory Capacity – SRC) в $CD4^+$ Т-клетках памяти иммунологических неответчиков (ИИ, n=4, R=6), иммунологических ответчиков (ИО, n=4, R=6) и здоровых субъектов (К, n=4, R=6)

Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90 %-ые перцентили (вертикальные отрезки); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$. Группы количественных данных сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки.

Дыхательный резерв митохондрий зависит от целого ряда факторов, среди которых особо выделяют стабильность работы ЭТЦ, целостность митохондриальной мембраны, доступность метаболитических субстратов (в частности, пировиноградной кислоты и жирных кислот), а также активность ЦТК [253]. Ранее было показано, что в делирующихся $CD4^+$ Т-лимфоцитах памяти ИИ

экспрессия генов, кодирующих комплексы дыхательной цепи и ферменты ЦТК, существенно снижена [411]. Таким образом, сведения, представленные в настоящей работе, подтверждают результаты транскриптомного анализа и указывают на глобальное нарушение функции митохондрий в CD4⁺ Т-клетках памяти ИН.

В свете полученных данных возникает закономерный вопрос: какова причина функциональных нарушений в работе митохондрий CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти ИН? Есть основания полагать, что эти изменения, по крайней мере, отчасти, связаны с сигнализацией через ингибиторные рецепторы. При взаимодействии с лигандами, эти рецепторы могут подавлять прохождение сигнала через сигнальный путь, включающий PI3K, АКТ (протеинкиназа В) и mTOR (*англ.* mammalian target of rapamycin – мишень рапамицина млекопитающих). Сигнальный каскад PI3K/АКТ/mTOR оказывает значительное влияние на функцию митохондрий в клетках млекопитающих и, в частности, на их дыхательный резерв. Так, было показано, что инкубация кортикальных нейронов с LY 294002, специфическим ингибитором клеточных фосфоинозитид-3-киназ, приводит к снижению содержания митохондриальной ДНК и показателя SRC в данных клетках [29]. При инкубации гепатоцитов с аналогичным ингибитором наблюдается снижение как SRC, так и базальной OCR [231]. Добавление к гепатоцитам агониста сигнального пути PI3K/АКТ/mTOR, инсулиноподобного фактора роста 1, напротив, приводит к увеличению показателей SRC [231]. В настоящей работе мы показали, что у ИН доля CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти, экспрессирующих ингибиторные рецепторы PD-1 и TIGIT, существенно повышена. В связи с этим можно предположить, что увеличение экспрессии ингибиторных рецепторов и снижение функции митохондрий в CD4⁺ Т-клетках памяти ИН являются взаимосвязанными процессами.

Примечательно, что, несмотря на снижение интенсивности окислительного фосфорилирования, CD4⁺ Т-лимфоциты памяти ИН поддерживают соотношение молекул АДФ и АТФ сопоставимое с таковым у здоровых людей. Это несоответствие, вероятно, может быть объяснено низкой активностью процессов,

потребляющих энергию. В клетках млекопитающих к наиболее энергозатратным и АТФ-зависимым процессам относят синтез макромолекул, в частности – синтез белков и нуклеиновых кислот [76]. В этом контексте нормальное соотношение АДФ/АТФ при низкой активности энергетических путей не опровергает, а подтверждает наличие дисрегуляции метаболических процессов, призванных поддерживать регенерацию CD4⁺ Т-лимфоцитов ИИ.

Важно отметить, что активность митохондриального дыхания *per se* также тесно связана пролиферативным потенциалом Т-клеток. Исследования показали, что внесение ингибитора комплекса II электрон-транспортной цепи в культуру Т-лимфоцитов приводит к снижению мембранного потенциала митохондрий и пролиферативной активности данных клеток [290]. Аналогичный эффект на пролиферацию CD4⁺ Т-клеток оказывает ротенон – ингибитор комплекса I [81]. Кроме того, было продемонстрировано, что нокаут в CD4⁺ Т-лимфоцитах гена *IRF4* (англ. Interferon Regulatory Factor 4 – регуляторный фактор интерферона 4), участвующего в регуляции метаболизма глюкозы и окислительного фосфорилирования, вызывает снижение активности дыхательной цепи и блокирует процесс деления [250]. Представленные данные позволяют заключить, что у иммунологических неответчиков на АРТ низкая регенераторная способность CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти может быть связана с нарушением митохондриального дыхания.

РЕЗЮМЕ

В результате исследования было установлено, что у ИИ на фоне выраженного дефицита CD4⁺ Т-лимфоцитов активно протекает гомеостатическая пролиферация. Основную роль в данном процессе играют CD4⁺ Т-клетки памяти. Важным результатом исследования стало установление того факта, что CD4⁺ Т-лимфоциты памяти ИИ демонстрируют признаки истощения: такие клетки активно экспрессируют ингибиторные рецепторы. Данное утверждение распространяется и на делящиеся CD4⁺ Т-лимфоциты памяти ИИ, составляющие основу регенерации. В рамках данного исследования была установлена

следующая закономерность: чем выше число пролиферирующих клеток в субпопуляции $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти, тем большее количество клеток экспрессирует ингибиторные рецепторы. Исходя из этого, можно предположить, что многократные митозы приводят к истощению регенерирующих $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти ИИ.

Исследование метаболизма $CD4^+$ Т-клеток памяти ИИ выявило несоответствие между интенсивностью потребления глюкозы и продукции молочной кислоты регенерирующими $CD4^+$ Т-лимфоцитами памяти ИИ. Несмотря на то, что пролиферирующие $CD4^+$ Т-клетки памяти ИИ существенно превосходят аналогичные клетки неинфицированных субъектов по количеству потребляемой ими глюкозы, поглощение этого субстрата $CD4^+$ Т-лимфоцитами памяти ИИ не сопровождается активным формированием молочной кислоты в ходе гликолиза. Усиление гликолиза является необходимым условием для митотического деления $CD4^+$ Т-лимфоцитов. Следовательно, обнаруженное нами несоответствие между высоким уровнем пролиферации, активным потреблением глюкозы и низкой продукцией лактата $CD4^+$ Т-клетками памяти ИИ может лежать в основе их слабой регенерации.

Важно отметить, что при регенерации делящиеся $CD4^+$ Т-лимфоциты памяти ИИ 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. Полученные данные указывают на то, что в делящихся $CD4^+$ Т-лимфоцитах памяти ИИ углерод, поступающий с различными метаболическими субстратами, активно утилизируется. В контексте пролиферации допустимо предположить, что поглощаемые субстраты расходуются на метаболические пути, связанные с синтезом макромолекул. Однако усиленное поглощение метаболических субстратов делящимися $CD4^+$ Т-клетками памяти ИИ еще не говорит о том, что их утилизация завершается активным биосинтезом. Более того, сниженная активность гликолиза – одного из магистральных метаболических путей в пролиферирующих клетках – свидетельствует о том, что

биосинтетические процессы в $CD4^+$ Т-лимфоцитах памяти ИН могут быть нарушены.

Вторым магистральным путем, поддерживающим пролиферацию $CD4^+$ Т-лимфоцитов, является окислительное фосфорилирование митохондрий. Полученные нами данные продемонстрировали, что у ИН по сравнению с ИО и неинфицированными субъектами уровень митохондриального дыхания в $CD4^+$ Т-клетках памяти существенно снижен. Несмотря на то, что под действием митогенной стимуляции интенсивность окислительного фосфорилирования в $CD4^+$ Т-клетках памяти ИН увеличивается, показатели этих пациентов не достигают значений, зафиксированных у ИО и здоровых субъектов. Представленные сведения указывают на снижение дыхательной функции в $CD4^+$ Т-лимфоцитах памяти ВИЧ-инфицированных пациентов с неэффективным восстановлением иммунной системы в ответ на АРТ. Примечательно, что, несмотря на снижение интенсивности окислительного фосфорилирования, $CD4^+$ Т-лимфоциты памяти ИН поддерживают соотношение молекул АДФ и АТФ сопоставимое с таковым у здоровых людей.

Таким образом, метаболизм $CD4^+$ 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 $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти в организме ИН. Полученные данные расширяют представление о механизмах, препятствующих продуктивной пролиферации $CD4^+$ Т-клеток памяти у ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на терапию.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В ГЛАВЕ 3

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК и/или индексируемых в международных базах данных WoS, Scopus, RSCI:

1. Метаболические свойства активированных $CD4^+$ 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⁺ 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. Chereshev, 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⁺ 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, К2).

3. Особенности метаболизма наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов и CD4⁺ Т-клеток памяти в покое и при пролиферации / **В.В. Власова**, Е.В. Сайдакова, Л.Б. Королевская, 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. Functional exhaustion of CD4⁺ 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, К1).

5. Особенности экспрессии ингибиторных рецепторов PD-1 и TIGIT на CD4⁺ и CD8⁺ 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, К2).

Публикации в других изданиях:

6. Mitochondrial disorders in activated memory CD4⁺ 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.

7. 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.

8. 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВИЧ-инфекция остается одной из основных проблем глобального общественного здравоохранения. На конец 2023 года около 40 миллионов человек были инфицированы ВИЧ. Характерной чертой ВИЧ-инфекции является формирование глубокого иммунодефицита – феномена, связанного с прогрессирующей гибелью $CD4^+$ Т-лимфоцитов. Вследствие иммунной недостаточности ВИЧ-инфицированные пациенты становятся более уязвимыми к оппортунистическим инфекциям и злокачественным новообразованиям [106]. Присоединение оппортунистических инфекций является основной причиной заболеваемости и смерти ВИЧ-положительных больных [295, 366]. По данным ЮНЭЙДС, с начала эпидемии ВИЧ-инфекции от СПИД-ассоциированных заболеваний погибло не менее 40 миллионов человек [378]. Единственным эффективным средством контроля ВИЧ-инфекции является антиретровирусная терапия, подавляющая репликацию вируса в организме [102]. АРТ была внедрена в клиническую практику в 1996 году, что привело к значительному снижению уровня инфекционных осложнений и смертности среди ВИЧ-инфицированных пациентов [278]. Согласно мировой статистике, к концу 2022 года 76 % всех людей, живущих с ВИЧ, принимали АРТ [378]. Важно отметить, что применение АРТ не только снижает вирусную нагрузку, но и, как правило, способствует восстановлению численности $CD4^+$ Т-лимфоцитов, что определяет сокращение риска клинических проявлений и смерти [380].

Однако уже в 1997-1998 годах Brigitte Autran [46, 47], Christophe Picketty [320] и их коллеги отметили, что у части пациентов, получающих вирусологически эффективную терапию, наблюдается ограниченная способность к восстановлению иммунной системы. В настоящее время, согласно различным данным, от 10 до 40 % ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих вирусологически эффективную АРТ (то есть от 2 до 8 миллионов человек),

характеризуются отсутствием или слабым приростом численности CD4⁺ Т-клеток на фоне лечения [47, 206, 320, 406]. Для обозначения этой клинической группы в литературе используется термин «иммунологические неответчики» [329]. Иммунологический «неответ» на лечение связан с повышенным риском развития СПИД-ассоциированных и СПИД-неассоциированных заболеваний, а также снижением продолжительности жизни ВИЧ-инфицированных больных [141, 321, 362], что обуславливает актуальность данной проблемы. За более чем 25 лет изучения иммунологического неответа был накоплен обширный массив данных, характеризующих этот феномен. В частности, были выявлены факторы, увеличивающие риск развития неответа: высокая вирусная нагрузка до начала лечения [131], пожилой возраст ВИЧ-инфицированных больных [131, 255], наличие коинфекции ВГС [244] и позднее начало терапии [396]. Однако, механизмы, стоящие за неэффективным восстановлением численности CD4⁺ Т-лимфоцитов при дискордантном ответе на терапию, до сих пор не ясны.

Количество CD4⁺ Т-клеток в организме определяется балансом между их гибелью и регенерацией. Поэтому важно понимать, какие CD4⁺ Т-лимфоциты погибают, а какие являются источником их восстановления при ВИЧ-инфекции. Известно, что ВИЧ проникает в CD4⁺ Т-клетки, используя хемокиновый рецептор CCR5, экспрессия которого значительно варьирует в различных субпопуляциях CD4⁺ Т-лимфоцитов. Так, на большинстве наивных клеток данный рецептор отсутствует [273]. На поверхности клеток центральной памяти CCR5 не представлен, либо присутствует в малом количестве [140]. Клетки эффекторной памяти, в свою очередь, характеризуются выраженной экспрессией CCR5, что делает их основной мишенью вируса [140, 300]. В организме человека большая часть всех CD4⁺ Т-клеток эффекторной памяти сконцентрирована в желудочно-кишечном тракте, поэтому в острой фазе заболевания поражается и гибнет большинство этих клеток (до 90 % всех CD4⁺ Т-лимфоцитов эффекторной памяти кишечника) [178, 262].

Основным источником регенерации CD4⁺ Т-лимфоцитов эффекторной памяти являются их предшественники – клетки центральной памяти [299].

Восстановление популяции за счет менее дифференцированных наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов также возможно, но менее продуктивно из-за низкой скорости пролиферации. Наивные лимфоциты имеют более высокий порог активации и больше зависят от ко-стимулирующих сигналов по сравнению с клетками центральной памяти [348]. Поэтому при ВИЧ-инфекции в ответ на опустошение пула CD4⁺ Т-лимфоцитов эффекторной памяти преимущественно активируются и пролиферируют CD4⁺ Т-клетки центральной памяти. В настоящей работе мы подтвердили, что основную роль в регенерации утраченных CD4⁺ Т-лимфоцитов играют CD4⁺ Т-клетки памяти. Так, при дефиците CD4⁺ Т-лимфоцитов уровень пролиферации в субпопуляции CD4⁺ Т-клеток памяти был существенно повышен. Более того, пролиферативная активность CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти прямо коррелировала со степенью выраженности лимфопении. В соответствии с этим, наибольшее процентное содержание делящихся CD4⁺ Т-клеток памяти было установлено у пациентов с неэффективным восстановлением иммунной системы. В такой ситуации естественно возникает вопрос о том, почему у ИИ высокая митотическая активность CD4⁺ Т-клеток памяти не приводит к восполнению численности CD4⁺ Т-лимфоцитов.

Для ответа на этот вопрос сотрудники нашей лаборатории совместно с исследователями из института Кейза поставили ряд экспериментов. В первую очередь, пролиферирующие CD4⁺ Т-клетки памяти были изолированы из крови ИО и ИИ и перенесены в систему *in vitro* для наблюдения. Было установлено, что делящиеся CD4⁺ Т-лимфоциты памяти ИО в таких условиях производили дочерние генерации, в то время как клетки памяти ИИ не способны были завершить более одного цикла деления [411]. В следующем эксперименте CD4⁺ Т-лимфоциты памяти ИО и ИИ подвергли искусственной стимуляции через Т-клеточный рецептор. Это привело к формированию дочерних генераций в обеих группах ВИЧ-инфицированных пациентов, однако у ИИ этот процесс протекал с выраженной асимметрией и давал начало клеткам разного размера [21]. Высокий уровень апоптоза в пуле пролиферирующих CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти ИИ позволяет предположить, что лимфоциты меньшего размера при этом погибали

[345]. В условиях высокого запроса на регенерацию асимметричное деление, сопровождающееся апоптозом, указывало на наличие серьезных нарушений при делении CD4⁺ Т-клеток памяти ИИ.

Известно, что в ходе митотического деления CD4⁺ Т-лимфоцитов все компоненты этих клеток удваиваются в результате масштабной метаболической перестройки [391]. Размер дочерних лимфоцитов прямо определяется активностью обменных процессов, поэтому образование неравноценных клеток при пролиферации CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти ИИ с большой вероятностью связано с нарушением клеточного обмена. Ранее было показано, что в CD4⁺ Т-клетках памяти ИИ, в сравнении с пациентами, давшими стандартный ответ на терапию, экспрессия генов и белков, участвующих в работе митохондрий, углеродном и жировом обмене, существенно снижена [49, 411, 418]. На основе этих фактов была сформулирована гипотеза о том, что в CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти ИИ метаболизм может быть нарушен.

В настоящей работе мы использовали ряд функциональных тестов, чтобы напрямую оценить активность обменных процессов в CD4⁺ Т-лимфоцитах, полученных от пациентов с различной эффективностью восстановления иммунитета в ответ на АРТ. В результате проведенной работы нами было установлено, что делящиеся CD4⁺ Т-клетки памяти ИИ характеризуются повышенным потреблением экзогенных и эндогенных метаболических субстратов. При регенерации CD4⁺ Т-лимфоциты памяти ИИ 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 ИИ углерод, поступающий с различными метаболическими субстратами, активно утилизируется. В контексте пролиферации допустимо предположить, что поглощаемые субстраты расходуются на метаболические пути, связанные с синтезом макромолекул. Однако усиленное поглощение метаболических субстратов делящимися CD4⁺ Т-клетками памяти ИИ не обязательно означает, что их утилизация завершается

активным биосинтезом. Гораздо более значимой является способность $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти задействовать метаболические субстраты в ходе гликолиза и окислительного фосфорилирования.

В настоящей работе мы впервые использовали метод анализа внеклеточных потоков для оценки интенсивности гликолиза и митохондриального дыхания в изолированных $CD4^+$ Т-лимфоцитах памяти, полученных от ВИЧ-инфицированных неответчиков, пациентов со стандартным ответом на терапию и неинфицированных лиц. В результате мы показали, что в $CD4^+$ Т-клетках памяти ИИ значительно снижена интенсивность гликолиза и митохондриального дыхания. Важно отметить, что у ИИ также была снижена резервная дыхательная емкость митохондрий – показатель, отражающий энергетический потенциал клетки в условиях стресса. Полученные данные согласуются с результатами транскриптомного анализа, указывающими на снижение экспрессии компонентов ЭТЦ и ферментов ЦТК в $CD4^+$ Т-лимфоцитах памяти ИИ [411], поскольку эти метаболические пути напрямую связаны с дыхательным резервом митохондрий [253]. Гликолиз и окислительное фосфорилирование митохондрий играют важную роль в биосинтезе макромолекул, а их подавление нередко связывали с остановкой деления [62, 153]. Исходя из этого можно предположить, что в условиях низкой активности этих магистральных метаболических путей $CD4^+$ Т-клетки памяти ИИ не способны произвести достаточно макромолекул для формирования двух равноценных дочерних лимфоцитов. Как следствие, мы наблюдаем малопродуктивное и асимметричное деление клеток памяти, не приводящее к восполнению численности $CD4^+$ Т-лимфоцитов в организме ИИ.

Причины метаболических нарушений в $CD4^+$ Т-лимфоцитах памяти ИИ в настоящий момент не установлены. Группа исследователей из университета Кейза совместно с нашей лабораторией показали, что нарушение функции митохондрий в $CD4^+$ Т-клетках памяти ИИ может быть вызвано воздействием пара-крезол сульфата (*англ.* para-cresol sulfate – PCS) – уремического токсина, продуцируемого микрофлорой кишечника [165, 395]. Известно, что результатом опустошения $CD4^+$ Т-лимфоцитов в ЖКТ является повреждение кишечного

барьера [71]. Повышение проницаемости кишечника, в свою очередь, влечет за собой усиление бактериальной транслокации – перехода микроорганизмов и их продуктов (в том числе, токсинов) из кишечника в кровоток [350]. Показано, что в плазме ИИ существенно повышен уровень PCS [126]. Что более важно, повышенные концентрации PCS наблюдаются в самих CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти ИИ. Исследования *in vitro* продемонстрировали выраженную митохондриальную токсичность PCS в отношении CD4⁺ Т-клеток. Так, было показано, что инкубация CD4⁺ Т-лимфоцитов здоровых доноров с PCS приводит к снижению числа митохондрий в клетке, повышению плотности упаковки крист и увеличению доли митохондрий, заключенных в вакуоли [126]. В таком случае, становится понятной связь между факторами, повышающими риск дискордантного ответа на АРТ, и неэффективным восстановлением численности CD4⁺ Т-клеток. Так, коинфекция ВГС сопровождается увеличением кишечной проницаемости [375], приводит к развитию болезней почек и накоплению уремических токсинов в крови [317]. Высокая продолжительность терапии, включающей такие препараты как атазанавир, долутегравир и триметоприм также может приводить к нарушению работы почек и фильтрации уремических токсинов [120]. В то время как позднее начало терапии может быть связано с более выраженным повреждением кишечного барьера и усилением транслокации микробных продуктов. Все перечисленные факторы повышают вероятность проникновения в кровь ВИЧ-инфицированных больных PCS, угнетающего функцию митохондрий в CD4⁺ Т-лимфоцитах. Тем не менее, токсическим воздействием PCS нельзя объяснить нарушение гликолиза в CD4⁺ Т-клетках памяти ИИ. Следовательно, могут существовать и другие механизмы нарушения метаболизма в CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти пациентов с дискордантным ответом на терапию.

Можно предположить, что эти механизмы связаны со старением или истощением регенерирующих CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти ИИ. Ранее было показано, что у ИИ, при их сравнении с пациентами со стандартным ответом на терапию, повышена доля CD4⁺ Т-клеток памяти, экспрессирующих маркер

старения CD57 [363]. Тем не менее, объективных признаков репликативного старения этих клеток до сих пор обнаружено не было. На данный момент известно лишь то, что у ВИЧ-инфицированных пациентов длина теломер в CD4⁺ Т-лимфоцитах, как правило, меньше, чем у относительно здоровых доноров [120]. При этом было показано, что укорочение теломер происходит уже в момент сероконверсии, а сведения об изменении длины теломер после данной временной точки отсутствуют. Определение уровня истощения CD4⁺ Т-клеток в организме ИН также является нетривиальной и до конца не решенной задачей. В настоящий момент термин «истощение» охватывает широкий спектр процессов, связанных с утратой функциональной активности Т-лимфоцитов вследствие хронической стимуляции ТКР [195]. Однако, существуют разные виды истощения, отличающиеся как по причинам, так и по механизмам формирования [58]. Причины истощения CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти в организме ИН установлены – это транслокация микробных продуктов из кишечника, присутствие коинфицирующих агентов, сторонняя активация и, наконец, многократные циклы деления регенерирующих клеток. Однако мало известно о том, что характеризует истощенные CD4⁺ Т-клетки в условиях ВИЧ-индуцированной лимфопении. Чаще всего об истощении Т-лимфоцитов судят по поверхностной экспрессии ингибиторных рецепторов. Мы показали, что у ИН CD4⁺ Т-клетки памяти активно экспрессируют ингибиторные рецепторы PD-1 и TIGIT. Данное наблюдение распространяется и на делящиеся CD4⁺ Т-лимфоциты памяти ИН, составляющие основу регенерации. Нами была установлена следующая закономерность: чем выше уровень пролиферации в субпопуляции CD4⁺ Т-клеток памяти, тем большее число клеток экспрессирует ингибиторные рецепторы. Исходя из этого можно предположить, что многократные митозы истощают регенерирующие CD4⁺ Т-лимфоциты памяти ИН. Полученные сведения представляют особый интерес, поскольку супрессорные молекулы, экспрессируемые на поверхности истощенных Т-клеток, способны подавлять прохождение сигнала через сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR и угнетать активность гликолиза и окислительного фосфорилирования в Т-лимфоцитах [313, 315].

Таким образом, в широком смысле, проблема иммунологического неответа на терапию – это проблема регенерации CD4⁺ Т-клеток памяти. В организме пациентов с дискордантным ответом на АРТ CD4⁺ Т-лимфоциты памяти делятся малопродуктивно и асимметрично, что препятствует эффективному восстановлению их численности. В настоящем исследовании мы показали, что CD4⁺ Т-клетки памяти ИИ характеризуются метаболическими нарушениями: такие клетки активно потребляют эндогенные и экзогенные субстраты, однако значительно уступают клеткам здоровых людей по интенсивности гликолиза и митохондриального дыхания. Принимая во внимание центральную роль метаболизма в пролиферации Т-лимфоцитов, можно заключить, что низкий регенераторный потенциал CD4⁺ Т-клеток памяти ИИ может быть обусловлен недостаточной эффективностью биоэнергетических путей. Полученные сведения имеют фундаментальное значение, поскольку CD4⁺ Т-лимфоциты памяти играют ключевую роль во вторичном иммунном ответе и определяют эффективность вакцинации. При этом многие вопросы, касающиеся функциональной активности клеток памяти, остаются до конца не изученными. На сегодняшний день дискордантный ответ на АРТ представляет собой единственную модель для изучения процессов регенерации в субпопуляции CD4⁺ Т-клеток памяти.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшая разработка данной темы, на наш взгляд, имеет как минимум три перспективных направления. В первую очередь, следует оценить содержание промежуточных и конечных продуктов биосинтеза нуклеотидов, аминокислот и липидов в CD4⁺ Т-клетках памяти ИИ. Анализ активности биосинтетических процессов в CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти иммунологических неответчиков позволит выявить ключевые точки метаболизма, препятствующие продуктивному делению данных 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.

Представленные сведения могут пролить свет на причины метаболических нарушений в CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти ИИ и открыть возможности для коррекции дискордантного ответа ВИЧ-инфицированных пациентов на терапию.

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 TIGIT-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 ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

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

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

АРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия

ВГС – вирус гепатита С

ВИО – вирус иммунодефицита обезьян

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИН – иммунологические неответчики на лечение

ИО – иммунологические ответчики на терапию

К – контроль

КоА – коэнзим А

ЛПС – липополисахарид

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

Р/АА – раствор ротенона и антимицина А

РНК – рибонуклеиновая кислота

СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита

Трег – регуляторные Т-клетки

ФГА – фитогемагглютинин

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

АКТ – протеинкиназа В

AF – краситель Alexa Fluor

ASCT2 – аланин-серин-цистеин транспортер 2

BODIPY – 4,4-дифтор-5,7-диметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-3
BODIPY FL C16 – (4,4-дифтор-5,7-диметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-3)гексадекановая кислота
BSA – бычий сывороточный альбумин
BV – краситель бриллиантовый фиолетовый
CCR5 – С-С-рецептор хемокина 5
CTLA4 – гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4
DPBS – фосфатно-солевой раствор в модификации Дульбекко
ECAR – скорость ацидификации среды
ICAM-1 – межклеточная молекула адгезии 1
IFI16 – интерферон-гамма-индуцируемый белок 16
IFN – интерферон
Ig – иммуноглобулин
IL – интерлейкин
IRF4 – регуляторный фактор интерферона 4
ITIM – иммунорецепторный ингибиторный мотив на основе тирозина
Fas – Fas-рецептор (так же известен как CD95)
FCCP – карбонилцианид-4-(трифлуорометокси)фенилгидразон
FITC – флуоресцеин-5-изотиоцианат
FSC – прямое светорассеяние
Glut – транспортер глюкозы
Gp120 – гликопротеин 120
LAIR1 – иммуноглобулин-подобный рецептор, ассоциированный с лейкоцитами 1
LAG-3 – белок 3 гена активации лимфоцитов
MFI – средняя интенсивность флуоресценции
mTOR – мишень рапамицина млекопитающих
Nef – негативный фактор
NDUFA6 – НАДН-дегидрогеназа 1 субъединица 6 альфа-субкомплекса
OCR – скорость поглощения кислорода
PCS – пара-крезол сульфат

PD-1 – белок программируемой гибели 1

PE – фикоэритрин

PER – скорость выброса протонов

PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа

PGC-1 α – коактиватор 1- α -рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом

RLU – относительные единицы света

sCD14 – растворимый CD14

SRC – резервная дыхательная емкость митохондрий

SSC – боковое светорассеяние

sTNFR2 – растворимый рецептор фактора некроза опухоли 2

Tat – транс-активатор транскрипции

Th – Т-хелпер

TIGIT – Т-клеточный иммуноглобулин и тирозинсодержащий ингибиторный мотив иммунорецепторов

Tim-3 – Т-клеточный иммуноглобулин и домен муцина-3

TGF – трансформирующий фактор роста

TLR – толл-подобные рецепторы

TNF – фактор некроза опухолей

VCAM-1 – васкулярная молекула клеточной адгезии 1

ZAP70 – zeta-ассоциированный протеин 70

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адгамов, Р.Р. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации: современные тенденции диагностики / Р. Р. Адгамов, А. А. Антонова, Д. А. Огаркова [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2024. – V. 16. – № 1. – P. 45–59.
2. Азовцева, О.В. Особенности клинического течения новой коронавирусной инфекции у ВИЧ-инфицированных больных / О. В. Азовцева, Т. Н. Ткаченко, Е. А. Курбатова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2024. – V. 16. – № 2. – P. 60–80.
3. Антонова, А.А. Генетическое разнообразие ВИЧ-1 на современном этапе эпидемии в Российской Федерации: увеличение распространенности рекомбинантных форм / А. А. Антонова, А. И. Кузнецова, Е. Н. Ожмегова [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2023. – V. 15. – № 3. – P. 61–72.
4. Антонова, А.А. Вариабельность белка VPU ВИЧ-1 суб-субтипа А6 у пациентов с различными стадиями ВИЧ-инфекции / А. А. Антонова, А. В. Лебедев, Е. В. Казеннова [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2024. – V. 16. – № 2. – P. 40–50.
5. Боева, Е.В. Синдром восстановления иммунитета при ВИЧ-инфекции / Е. В. Боева, Н. А. Беляков // Инфекция и иммунитет – 2018. – V. 8. – № 2. – P. 139–149.
6. Браженко, О.Н. Анализ вариабельности сердечного ритма при оценке вегетативного статуса больных туберкулезом и при сочетании с ВИЧ-инфекцией / О. Н. Браженко, А. И. Лощакова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2024. – V. 16. – № 2. – P. 85–93.
7. Браженко, О.Н. Психологические и социальные особенности больных туберкулезом с сочетанной ВИЧ-инфекцией в современных условиях / О. Н. Браженко, К. А. Солодилина, А. И. Лощакова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2024. – V. 16. – № 1. – P. 23–35.

8. Волкова, С.Б. Демографические и клинические характеристики ВИЧ-инфицированных пациентов г. Екатеринбурга / С. Б. Волкова, А. С. Подымова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2023. – V. 15. – № 4. – P. 73–85.

9. Дессау, М.И. Эффективность лечения больных ВИЧ-инфекцией в зависимости от приверженности диспансерному наблюдению и антиретровирусной терапии / М. И. Дессау, С. Л. Николаенко, Д. А. Лиознов // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2024. – V. 16. – № 1. – P. 36–44.

10. Загдын, З.М. Факторы, влияющие на показатели выявляемости туберкулеза среди людей, живущих с ВИЧ, в регионах Северо-Западного федерального округа Российской Федерации / З. М. Загдын, Е. В. Вербицкая, Е. Г. Соколович [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2021. – V. 13. – № 2. – P. 94–100.

11. Загдын, З.М. Влияние мер по профилактике туберкулеза и возможностей противотуберкулезных учреждений на заболеваемость ВИЧ/ТБ в Российской Арктике / З. М. Загдын, В. В. Цветков, И. Чжао // Журнал медико-биологических исследований – 2022. – V. 10. – № 1. – P. 34–43.

12. Киреев, Д.Е. Сравнительная оценка тест-систем ИФА/ИХЛА 4-го поколения, применяемых в Российской Федерации для диагностики ВИЧ-инфекции / Д. Е. Киреев, Г. А. Шипулин, А. В. Семенов [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2019. – V. 11. – № 2. – P. 103–113.

13. Конькова-Рейдман, А.Б. Анализ случаев центрального понтинного миелинолиза у ВИЧ-инфицированных пациентов / А. Б. Конькова-Рейдман, Т. В. Михеева, П. А. Рейдман [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2024. – V. 16. – № 1. – P. 70–78.

14. Котова, Е.А. 50 лет изучения протонофоров: разобщение митохондрий как основа терапевтического действия / Е. А. Котова, Ю. Н. Антоненко // Acta Naturae – 2022. – V. 14. – № 1. – P. 4–13.

15. Кузнецова, А.И. Генетическое разнообразие капсидного белка (p24) у вариантов вируса иммунодефицита первого типа (ВИЧ-1), циркулирующих в

Российской Федерации / А. И. Кузнецова, Я. М. Мунчак, А. В. Лебедев [и др.] // Вопросы вирусологии – 2023. – V. 68. – № 1. – P. 66–78.

16. Монахов, Н.Э. Молекулярно-генетический мониторинг циркулирующих вариантов ВИЧ-1 в Санкт-Петербурге / Н. Э. Монахов, А. И. Ермаков, Е. С. Обижаева [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2024. – V. 16. – № 2. – P. 106–117.

17. Олейник, А.Ф. Причины иммунологической неэффективности антиретровирусной терапии у пациентов с ВИЧ-инфекцией / А. Ф. Олейник, В. Х. Фазылов // Казанский медицинский журнал – 2014. – V. 95. – № 4. – P. 581–588.

18. Онищенко, Г.Г. Эпидемиологическая ситуация, основные приоритеты и задачи по противодействию эпидемии ВИЧ/СПИДА / Г. Г. Онищенко // Здравоохранение Российской Федерации – 2005. – № 2. – P. 11–18.

19. Рындич, А.А. Тенденции и факторы развития эпидемического процесса ВИЧ-инфекции на юге России / А. А. Рындич, А. Г. Сухова, А. Г. Суладзе [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2019. – V. 11. – № 2. – P. 48–57.

20. Савченко, М.А. Сочетание первичной лимфомы ЦНС и микобактериоза головного мозга на фоне ВИЧ-инфекции. / М. А. Савченко, Н. Е. Воинов, Д. А. Ситовская [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2023. – V. 15. – № 2. – P. 106–113.

21. Сайдакова, Е.В. Пролiferация CD4+ Т-лимфоцитов при развитии дискордантного ответа иммунной системы на антиретровирусную терапию у ВИЧ-инфицированных больных / Е. В. Сайдакова, К. В. Шмагель, Л. Б. Королевская [и др.] // Цитология – 2018. – V. 60. – № 12. – P. 1029–1036.

22. Фазылов, В.Х. COVID-19 у пациентов с ВИЧ-инфекцией: серия клинических наблюдений / В. Х. Фазылов, А. Ф. Олейник, Ч. Г. Реватхи [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2022. – V. 14. – № 4. – P. 87–92.

23. Хохлова, Г.Н. Когнитивный тренинг как технология защиты и восстановления функций центральной нервной системы у пациентов с инфекционной патологией / Г. Н. Хохлова, О. В. Кольцова, Е. Р. Исаева [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2023. – V. 15. – № 2. – P. 19–36.

24. Цыбикова, Э.Б. Диагностика ВИЧ-инфекции в России: оценка эффективности и перспективы / Э. Б. Цыбикова, М. Ю. Котловский, С. О. Фадеева [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2023. – V. 15. – № 3. – P. 50–60.
25. Цыбикова, Э.Б. Смертность от туберкулеза и ВИЧ-инфекции в России в период до и во время пандемии COVID-19 / Э. Б. Цыбикова, И. С. Лапшина // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2023. – V. 15. – № 2. – P. 90–99.
26. Черешнев, В.А. Влияние коинфекции вирусом гепатита С на активацию и апоптоз Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих антиретровирусную терапию / В. А. Черешнев, К. В. Шмагель, Л. Б. Королевская [и др.] // Иммунология – 2013. – V. 34. – № 5. – P. 236–241.
27. Шмагель, К.В. Дискордантный ответ CD4⁺ Т-лимфоцитов на антиретровирусную терапию / К. В. Шмагель // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии – 2019. – V. 11. – № 1. – P. 16–30.
28. Adeva-Andany, M. Comprehensive review on lactate metabolism in human health / M. Adeva-Andany, M. López-Ojén, R. Funcasta-Calderón [et al.] // Mitochondrion – 2014. – V. 17. – P. 76–100.
29. Agostini, M. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation / M. Agostini, F. Romeo, S. Inoue [et al.] // Cell Death Differ. – 2016. – V. 23. – № 9. – P. 1502–14.
30. Ahmad, R. Contribution of platelet activation to plasma IL-18 concentrations in HIV-infected AIDS patients / R. Ahmad, A. Iannello, S. Samarani [et al.] // AIDS – 2006. – V. 20. – № 14. – P. 1907–9.
31. Ahn, C.S. Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation / C. S. Ahn, C. M. Metallo // Cancer Metab. – 2015. – V. 3. – № 1. – P. 1.
32. Ahuja, S.K. CCL3L1-CCR5 genotype influences durability of immune recovery during antiretroviral therapy of HIV-1-infected individuals / S. K. Ahuja, H. Kulkarni, G. Catano [et al.] // Nat. Med. – 2008. – V. 14. – № 4. – P. 413–20.
33. Akie, T.E. OXPHOS-Mediated Induction of NAD⁺ Promotes Complete Oxidation of Fatty Acids and Interdicts Non-Alcoholic Fatty Liver Disease / T. E. Akie, L. Liu, M. Nam [et al.] // PLoS One – 2015. – V. 10. – № 5. – P. e0125617.

34. Alcamí, J. Advances in the immunopathology of HIV infection / J. Alcamí // *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* – 2004. – V. 22. – № 8. – P. 486–96.
35. Alimonti, J.B. Mechanisms of CD4⁺ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS / J. B. Alimonti, T. B. Ball, K. R. Fowke // *J. Gen. Virol.* – 2003. – V. 84. – № Pt 7. – P. 1649–1661.
36. Alter, G. Single-stranded RNA derived from HIV-1 serves as a potent activator of NK cells / G. Alter, T. J. Suscovich, N. Teigen [et al.] // *J. Immunol.* – 2007. – V. 178. – № 12. – P. 7658–66.
37. Ananworanich, J. HIV DNA Set Point is Rapidly Established in Acute HIV Infection and Dramatically Reduced by Early ART / J. Ananworanich, N. Chomont, L. A. Eller [et al.] // *EBioMedicine* – 2016. – V. 11. – P. 68–72.
38. Ancuta, P. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients / P. Ancuta, A. Kamat, K. J. Kunstman [et al.] // *PLoS One* – 2008. – V. 3. – № 6. – P. e2516.
39. Angiari, S. Pharmacological Activation of Pyruvate Kinase M2 Inhibits CD4⁺ T Cell Pathogenicity and Suppresses Autoimmunity / S. Angiari, M. C. Runtsch, C. E. Sutton [et al.] // *Cell Metab.* – 2020. – V. 31. – № 2. – P. 391-405.e8.
40. Antoine, P. Functional exhaustion of CD4⁺ T lymphocytes during primary cytomegalovirus infection / P. Antoine, V. Orlislagers, A. Huygens [et al.] // *J. Immunol.* – 2012. – V. 189. – № 5. – P. 2665–72.
41. Apostolova, N. Enhanced oxidative stress and increased mitochondrial mass during efavirenz-induced apoptosis in human hepatic cells / N. Apostolova, L. J. Gomez-Sucerquia, A. Moran [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2010. – V. 160. – № 8. – P. 2069–84.
42. Araújo, J.R. Folates and aging: Role in mild cognitive impairment, dementia and depression / J. R. Araújo, F. Martel, N. Borges [et al.] // *Ageing Res. Rev.* – 2015. – V. 22. – P. 9–19.
43. Aries, S.P. Fas (CD95) expression on CD4⁺ T cells from HIV-infected patients increases with disease progression / S. P. Aries, B. Schaaf, C. Müller [et al.] // *J. Mol. Med. (Berl).* – 1995. – V. 73. – № 12. – P. 591–3.

44. Ascher, M.S. AIDS as immune system activation: a model for pathogenesis / M. S. Ascher, H. W. Sheppard // *Clin. Exp. Immunol.* – 1988. – V. 73. – № 2. – P. 165–7.
45. Atassi, H. HIV envelope protein is recognized as an alloantigen by human DR-specific alloreactive T cells / H. Atassi, M. Z. Atassi // *Hum. Immunol.* – 1992. – V. 34. – № 1. – P. 31–8.
46. Autran, B. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease / B. Autran, G. Carcelain, T. S. Li [et al.] // *Science* – 1997. – V. 277. – № 5322. – P. 112–6.
47. Autran, B. Restoration of the immune system with anti-retroviral therapy / B. Autran, G. Carcelain, T. S. Li [et al.] // *Immunol. Lett.* – 1999. – V. 66. – № 1–3. – P. 207–11.
48. Aziz, N. Stability of plasma levels of cytokines and soluble activation markers in patients with human immunodeficiency virus infection / N. Aziz, P. Nishanian, J. M. G. Taylor [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 1999. – V. 179. – № 4. – P. 843–8.
49. Azzam, S. Proteome and Protein Network Analyses of Memory T Cells Find Altered Translation and Cell Stress Signaling in Treated Human Immunodeficiency Virus Patients Exhibiting Poor CD4 Recovery / S. Azzam, D. Schlatzer, S. Maxwell [et al.] // *Open forum Infect. Dis.* – 2016. – V. 3. – № 2. – P. ofw037.
50. Badley, A.D. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis / A. D. Badley, A. A. Pilon, A. Landay [et al.] // *Blood* – 2000. – V. 96. – № 9. – P. 2951–64.
51. Baenziger, S. Triggering TLR7 in mice induces immune activation and lymphoid system disruption, resembling HIV-mediated pathology / S. Baenziger, M. Heikenwalder, P. Johansen [et al.] // *Blood* – 2009. – V. 113. – № 2. – P. 377–88.
52. Baggott, J.E. Folate-Dependent Purine Nucleotide Biosynthesis in Humans / J. E. Baggott, T. Tamura // *Adv. Nutr.* – 2015. – V. 6. – № 5. – P. 564–71.
53. Bangs, S.C. Bystander T cell activation--implications for HIV infection and other diseases / S. C. Bangs, A. J. McMichael, X.-N. Xu // *Trends Immunol.* – 2006. – V. 27. – № 11. – P. 518–24.

54. Bannoud, N. Hypoxia Supports Differentiation of Terminally Exhausted CD8 T Cells / N. Bannoud, T. Dalotto-Moreno, L. Kindgard [et al.] // *Front. Immunol.* – 2021. – V. 12. – P. 660944.

55. Bastidas, S. CD8⁺ T cells are activated in an antigen-independent manner in HIV-infected individuals / S. Bastidas, F. Graw, M. Z. Smith [et al.] // *J. Immunol.* – 2014. – V. 192. – № 4. – P. 1732–44.

56. Beignon, A.-S. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions / A.-S. Beignon, K. McKenna, M. Skoberne [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2005. – V. 115. – № 11. – P. 3265–75.

57. Bengsch, B. Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion / B. Bengsch, A. L. Johnson, M. Kurachi [et al.] // *Immunity* – 2016. – V. 45. – № 2. – P. 358–73.

58. Bengsch, B. Epigenomic-Guided Mass Cytometry Profiling Reveals Disease-Specific Features of Exhausted CD8 T Cells / B. Bengsch, T. Ohtani, O. Khan [et al.] // *Immunity* – 2018. – V. 48. – № 5. – P. 1029-1045.e5.

59. Benveniste, O. Possible mechanism of toxicity of zidovudine by induction of apoptosis of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in vivo / O. Benveniste, J. Estaquier, J. D. Lelièvre [et al.] // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2001. – V. 20. – № 12. – P. 896–7.

60. Berod, L. De novo fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells / L. Berod, C. Friedrich, A. Nandan [et al.] // *Nat. Med.* – 2014. – V. 20. – № 11. – P. 1327–33.

61. Biancotto, A. Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1 / A. Biancotto, J.-C. Grivel, S. J. Iglehart [et al.] // *Blood* – 2007. – V. 109. – № 10. – P. 4272–9.

62. Birsoy, K. An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis / K. Birsoy, T. Wang, W. W. Chen [et al.] // *Cell* – 2015. – V. 162. – № 3. – P. 540–51.

63. Birx, D.L. Induction of interleukin-6 during human immunodeficiency virus infection / D. L. Birx, R. R. Redfield, K. Tencer [et al.] // *Blood* – 1990. – V. 76. – № 11. – P. 2303–10.
64. Blackburn, S.D. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection / S. D. Blackburn, H. Shin, W. N. Haining [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2009. – V. 10. – № 1. – P. 29–37.
65. Blas-Garcia, A. Oxidative stress and mitochondrial impairment after treatment with anti-HIV drugs: clinical implications / A. Blas-Garcia, N. Apostolova, J. V Esplugues // *Curr. Pharm. Des.* – 2011. – V. 17. – № 36. – P. 4076–86.
66. Borst, J. CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy / J. Borst, T. Ahrends, N. Bąbała [et al.] // *Nat. Rev. Immunol.* – 2018. – V. 18. – № 10. – P. 635–647.
67. Bosch, R.J. Changes in the slope of the CD4 cell count increase after initiation of potent antiretroviral treatment / R. J. Bosch, R. Wang, F. Vaida [et al.] // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 2006. – V. 43. – № 4. – P. 433–5.
68. Boulougoura, A. HIV infection and immune activation: the role of coinfections / A. Boulougoura, I. Sereti // *Curr. Opin. HIV AIDS* – 2016. – V. 11. – № 2. – P. 191–200.
69. Brand, K. Glutamine and glucose metabolism during thymocyte proliferation. Pathways of glutamine and glutamate metabolism / K. Brand // *Biochem. J.* – 1985. – V. 228. – № 2. – P. 353–61.
70. Brand, M.D. Assessing mitochondrial dysfunction in cells / M. D. Brand, D. G. Nicholls // *Biochem. J.* – 2011. – V. 435. – № 2. – P. 297–312.
71. Brenchley, J.M. HIV infection and the gastrointestinal immune system / J. M. Brenchley, D. C. Douek // *Mucosal Immunol.* – 2008. – V. 1. – № 1. – P. 23–30.
72. Brenchley, J.M. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract / J. M. Brenchley, T. W. Schacker, L. E. Ruff [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2004. – V. 200. – № 6. – P. 749–59.

73. Bucy, R.P. Initial increase in blood CD4(+) lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues / R. P. Bucy, R. D. Hockett, C. A. Derdeyn [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1999. – V. 103. – № 10. – P. 1391–8.
74. Burnet, F.M. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection / F. M. Burnet // *CA. Cancer J. Clin.* – 1976. – V. 26. – № 2. – P. 119–21.
75. Bussolino, F. Interactions between endothelial cells and HIV-1 / F. Bussolino, S. Mitola, G. Serini [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2001. – V. 33. – № 4. – P. 371–90.
76. Buttgereit, F. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells / F. Buttgereit, M. D. Brand // *Biochem. J.* – 1995. – V. 312 (Pt 1. – № Pt 1. – P. 163–7.
77. Cai, C.W. Residual immune dysfunction under antiretroviral therapy / C. W. Cai, I. Sereti // *Semin. Immunol.* – 2021. – P. 101471.
78. Cai, R. Caspase-1 Activity in CD4 T Cells Is Downregulated Following Antiretroviral Therapy for HIV-1 Infection / R. Cai, L. Liu, B. Luo [et al.] // *AIDS Res. Hum. Retroviruses* – 2017. – V. 33. – № 2. – P. 164–171.
79. Cantó, C. NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus / C. Cantó, K. J. Menzies, J. Auwerx // *Cell Metab.* – 2015. – V. 22. – № 1. – P. 31–53.
80. Cantor, J. Recruitment and activation of macrophages by pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes: evidence for involvement of CCR8 and CCL1 / J. Cantor, K. Haskins // *J. Immunol.* – 2007. – V. 179. – № 9. – P. 5760–7.
81. Cao, Y. Metabolic reprogramming towards aerobic glycolysis correlates with greater proliferative ability and resistance to metabolic inhibition in CD8 versus CD4 T cells / Y. Cao, J. C. Rathmell, A. N. Macintyre // *PLoS One* – 2014. – V. 9. – № 8. – P. e104104.
82. Carr, E.L. Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation / E. L. Carr, A. Kelman, G. S. Wu [et al.] // *J. Immunol.* – 2010. – V. 185. – № 2. – P. 1037–44.

83. Casotti, J.A.S. Factors associated with paradoxical immune response to antiretroviral therapy in HIV infected patients: a case control study / J. A. S. Casotti, L. N. Passos, F. J. P. Oliveira [et al.] // *BMC Infect. Dis.* – 2011. – V. 11. – P. 306.

84. Catakovic, K. T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy / K. Catakovic, E. Klieser, D. Neureiter [et al.] // *Cell Commun. Signal.* – 2017. – V. 15. – № 1. – P. 1.

85. Catalfamo, M. HIV infection-associated immune activation occurs by two distinct pathways that differentially affect CD4 and CD8 T cells / M. Catalfamo, M. Di Mascio, Z. Hu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – V. 105. – № 50. – P. 19851–6.

86. Cauley, L.S. Cutting edge: virus-specific CD4⁺ memory T cells in nonlymphoid tissues express a highly activated phenotype / L. S. Cauley, T. Cookenham, T. B. Miller [et al.] // *J. Immunol.* – 2002. – V. 169. – № 12. – P. 6655–8.

87. Cenderello, G. Discordant responses to cART in HIV-1 patients in the era of high potency antiretroviral drugs: clinical evaluation, classification, management prospects / G. Cenderello, A. De Maria // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* – 2016. – V. 14. – № 1. – P. 29–40.

88. Chakrabarti, R. Interrelationships between mevalonate metabolism and the mitogenic signaling pathway in T lymphocyte proliferation / R. Chakrabarti, E. G. Engleman // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266. – № 19. – P. 12216–22.

89. Chapman, N.M. Metabolic coordination of T cell quiescence and activation / N. M. Chapman, M. R. Boothby, H. Chi // *Nat. Rev. Immunol.* – 2020. – V. 20. – № 1. – P. 55–70.

90. Chapman, T.J. Antigen-specific and non-specific CD4⁺ T cell recruitment and proliferation during influenza infection / T. J. Chapman, M. R. Castrucci, R. C. Padrick [et al.] // *Virology* – 2005. – V. 340. – № 2. – P. 296–306.

91. Chavan, S.J. Reduction in T cell apoptosis in patients with HIV disease following antiretroviral therapy / S. J. Chavan, S. L. Tamma, M. Kaplan [et al.] // *Clin. Immunol.* – 1999. – V. 93. – № 1. – P. 24–33.

92. Chege, D. Sigmoid Th17 populations, the HIV latent reservoir, and microbial translocation in men on long-term antiretroviral therapy / D. Chege, P. M. Sheth, T. Kain [et al.] // *AIDS* – 2011. – V. 25. – № 6. – P. 741–9.

93. Chemnitz, J.M. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation / J. M. Chemnitz, R. V. Parry, K. E. Nichols [et al.] // *J. Immunol.* – 2004. – V. 173. – № 2. – P. 945–54.

94. Chen, A.M. Virus-specific and bystander CD8 T cells recruited during virus-induced encephalomyelitis / A. M. Chen, N. Khanna, S. A. Stohlman [et al.] // *J. Virol.* – 2005. – V. 79. – № 8. – P. 4700–8.

95. Choudhary, S.K. Low Immune Activation despite High Levels of Pathogenic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Results in Long-Term Asymptomatic Disease / S. K. Choudhary, N. Vrisekoop, C. A. Jansen [et al.] // *J. Virol.* – 2007.

96. Cioccoloni, G. Fatty acid synthase inhibitor orlistat impairs cell growth and down-regulates PD-L1 expression of a human T-cell leukemia line / G. Cioccoloni, A. Aquino, M. Notarnicola [et al.] // *J. Chemother.* – 2020. – V. 32. – № 1. – P. 30–40.

97. Clark, E. Tat is a multifunctional viral protein that modulates cellular gene expression and functions / E. Clark, B. Nava, M. Caputi // *Oncotarget* – 2017. – V. 8. – № 16. – P. 27569–27581.

98. Clarke, T.B. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity / T. B. Clarke, K. M. Davis, E. S. Lysenko [et al.] // *Nat. Med.* – 2010. – V. 16. – № 2. – P. 228–31.

99. Clerc, I. Entry of glucose- and glutamine-derived carbons into the citric acid cycle supports early steps of HIV-1 infection in CD4 T cells / I. Clerc, D. A. Moussa, Z. Vahlas [et al.] // *Nat. Metab.* – 2019. – V. 1. – № 7. – P. 717–730.

100. Cobos Jiménez, V. T-Cell Activation Independently Associates With Immune Senescence in HIV-Infected Recipients of Long-term Antiretroviral Treatment / V. Cobos Jiménez, F. W. N. M. Wit, M. Joerink [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2016. – V. 214. – № 2. – P. 216–25.

101. Cockerham, L.R. Programmed death-1 expression on CD4+ and CD8+ T cells in treated and untreated HIV disease / L. R. Cockerham, V. Jain, E. Sinclair [et al.] // *AIDS* – 2014. – V. 28. – № 12. – P. 1749–58.

102. Collier, A.C. Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine. AIDS Clinical Trials Group / A. C. Collier, R. W. Coombs, D. A. Schoenfeld [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1996. – V. 334. – № 16. – P. 1011–7.

103. Corbeau, P. Immune reconstitution under antiretroviral therapy: the new challenge in HIV-1 infection / P. Corbeau, J. Reynes // *Blood* – 2011. – V. 117. – № 21. – P. 5582–90.

104. Costin, J.M. Cytopathic mechanisms of HIV-1 / J. M. Costin // *Virology* – 2007. – V. 4. – P. 100.

105. Croft, M. Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells / M. Croft, L. M. Bradley, S. L. Swain // *J. Immunol.* – 1994. – V. 152. – № 6. – P. 2675–85.

106. Crowe, S.M. Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons / S. M. Crowe, J. B. Carlin, K. I. Stewart [et al.] // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 1991. – V. 4. – № 8. – P. 770–6.

107. Czibik, G. Citric acid cycle intermediates in cardioprotection / G. Czibik, V. Steeples, A. Yavari [et al.] // *Circ. Cardiovasc. Genet.* – 2014. – V. 7. – № 5. – P. 711–9.

108. Dalglish, A.G. The pathogenesis of AIDS: classical and alternative views / A. G. Dalglish // *J. R. Coll. Physicians Lond.* – 1992. – V. 26. – № 2. – P. 152–8.

109. DeBerardinis, R.J. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer / R. J. DeBerardinis, T. Cheng // *Oncogene* – 2010. – V. 29. – № 3. – P. 313–24.

110. DeBerardinis, R.J. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide

synthesis / R. J. DeBerardinis, A. Mancuso, E. Daikhin [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2007. – V. 104. – № 49. – P. 19345–50.

111. Desdín-Micó, G. Mitochondrial activity in T cells / G. Desdín-Micó, G. Soto-Herederó, M. Mittelbrunn // Mitochondrion – 2018. – V. 41. – P. 51–57.

112. Dikic, I. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy / I. Dikic, Z. Elazar // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2018. – V. 19. – № 6. – P. 349–364.

113. Dobbmeyer, T.S. Decreased function of monocytes and granulocytes during HIV-1 infection correlates with CD4 cell counts / T. S. Dobbmeyer, B. Raffel, J. M. Dobbmeyer [et al.] // Eur. J. Med. Res. – 1995. – V. 1. – № 1. – P. 9–15.

114. Doitsh, G. Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue / G. Doitsh, M. Cavrois, K. G. Lassen [et al.] // Cell – 2010. – V. 143. – № 5. – P. 789–801.

115. Doitsh, G. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection / G. Doitsh, N. L. K. Galloway, X. Geng [et al.] // Nature – 2014. – V. 505. – № 7484. – P. 509–14.

116. Doitsh, G. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection / G. Doitsh, W. C. Greene // Cell Host Microbe – 2016. – V. 19. – № 3. – P. 280–91.

117. Douek, D.C. T cell dynamics in HIV-1 infection / D. C. Douek, L. J. Picker, R. A. Koup // Annu. Rev. Immunol. – 2003. – V. 21. – P. 265–304.

118. Drobyshevskaya, E. Factors Associated with Fatal COVID-19 Outcomes among People Living with HIV: A Cohort Study / E. Drobyshevskaya, A. Lebedev, A. Pronin [et al.] // Curr. HIV Res. – 2023.

119. Ecker, C. Differential Reliance on Lipid Metabolism as a Salvage Pathway Underlies Functional Differences of T Cell Subsets in Poor Nutrient Environments / C. Ecker, L. Guo, S. Voicu [et al.] // Cell Rep. – 2018. – V. 23. – № 3. – P. 741–755.

120. Engel, T. HIV and Aging - Perhaps Not as Dramatic as We Feared? / T. Engel, M. Raffenberg, C. Marzolini [et al.] // Gerontology – 2018. – V. 64. – № 5. – P. 446–456.

121. Epple, H.-J. Impairment of the intestinal barrier is evident in untreated but absent in suppressively treated HIV-infected patients / H.-J. Epple, T. Schneider, H. Troeger [et al.] // *Gut* – 2009. – V. 58. – № 2. – P. 220–7.

122. Estaquier, J. Effects of antiretroviral drugs on human immunodeficiency virus type 1-induced CD4(+) T-cell death / J. Estaquier, J.-D. Lelièvre, F. Petit [et al.] // *J. Virol.* – 2002. – V. 76. – № 12. – P. 5966–73.

123. Estes, J.D. Simian immunodeficiency virus-induced lymphatic tissue fibrosis is mediated by transforming growth factor beta 1-positive regulatory T cells and begins in early infection / J. D. Estes, S. Wietgreffe, T. Schacker [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2007. – V. 195. – № 4. – P. 551–61.

124. Fabrikant, J.I. The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver / J. I. Fabrikant // *J. Cell Biol.* – 1968. – V. 36. – № 3. – P. 551–65.

125. Fenwick, C. T-cell exhaustion in HIV infection / C. Fenwick, V. Joo, P. Jacquier [et al.] // *Immunol. Rev.* – 2019. – V. 292. – № 1. – P. 149–163.

126. Ferrari, B. Gut-derived bacterial toxins impair memory CD4+ T cell mitochondrial function in HIV-1 infection / B. Ferrari, A. C. Da Silva, K. H. Liu [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2022. – V. 132. – № 9.

127. Finkel, T.H. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes / T. H. Finkel, G. Tudor-Williams, N. K. Banda [et al.] // *Nat. Med.* – 1995. – V. 1. – № 2. – P. 129–34.

128. Finkelstein, J.D. Methionine metabolism in mammals / J. D. Finkelstein // *J. Nutr. Biochem.* – 1990. – V. 1. – № 5. – P. 228–37.

129. Fisicaro, P. Targeting mitochondrial dysfunction can restore antiviral activity of exhausted HBV-specific CD8 T cells in chronic hepatitis B / P. Fisicaro, V. Barili, B. Montanini [et al.] // *Nat. Med.* – 2017. – V. 23. – № 3. – P. 327–336.

130. Fleury, S. Long-term kinetics of T cell production in HIV-infected subjects treated with highly active antiretroviral therapy / S. Fleury, G. P. Rizzardì, A. Chapuis [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2000. – V. 97. – № 10. – P. 5393–8.

131. Florence, E. Factors associated with a reduced CD4 lymphocyte count response to HAART despite full viral suppression in the EuroSIDA study / E. Florence, J. Lundgren, C. Dreezen [et al.] // *HIV Med.* – 2003. – V. 4. – № 3. – P. 255–62.

132. Franco, F. Metabolic and epigenetic regulation of T-cell exhaustion / F. Franco, A. Jaccard, P. Romero [et al.] // *Nat. Metab.* – 2020. – V. 2. – № 10. – P. 1001–1012.

133. Freeman, B.E. Regulation of innate CD8⁺ T-cell activation mediated by cytokines / B. E. Freeman, E. Hammarlund, H.-P. Raué [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2012. – V. 109. – № 25. – P. 9971–6.

134. Fu, H. The glucose transporter 2 regulates CD8⁺ T cell function via environment sensing / H. Fu, J. Vuononvirta, S. Fanti [et al.] // *Nat. Metab.* – 2023. – V. 5. – № 11. – P. 1969–1985.

135. Fuchs, D. Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in HIV infection / D. Fuchs, A. Hausen, G. Reibnegger [et al.] // *Immunol. Today* – 1988. – V. 9. – № 5. – P. 150–5.

136. Funderburg, N. Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis / N. Funderburg, A. A. Luciano, W. Jiang [et al.] // *PLoS One* – 2008. – V. 3. – № 4. – P. e1915.

137. Gaardbo, J.C. Incomplete immune recovery in HIV infection: mechanisms, relevance for clinical care, and possible solutions / J. C. Gaardbo, H. J. Hartling, J. Gerstoft [et al.] // *Clin. Dev. Immunol.* – 2012. – V. 2012. – P. 670957.

138. Gandhi, R.T. HIV-1 directly kills CD4⁺ T cells by a Fas-independent mechanism / R. T. Gandhi, B. K. Chen, S. E. Straus [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1998. – V. 187. – № 7. – P. 1113–22.

139. Gangcuangco, L.M.A. Mitochondrial oxidative phosphorylation in peripheral blood mononuclear cells is decreased in chronic HIV and correlates with immune dysregulation / L. M. A. Gangcuangco, B. I. Mitchell, C. Siriwardhana [et al.] // *PLoS One* – 2020. – V. 15. – № 4. – P. e0231761.

140. Gartner, M.J. Longitudinal analysis of subtype C envelope tropism for memory CD4⁺ T cell subsets over the first 3 years of untreated HIV-1 infection / M. J.

Gartner, P. R. Gorry, C. Tumpach [et al.] // *Retrovirology* – 2020. – V. 17. – № 1. – P. 24.

141. Gazzola, L. The absence of CD4+ T cell count recovery despite receipt of virologically suppressive highly active antiretroviral therapy: clinical risk, immunological gaps, and therapeutic options / L. Gazzola, C. Tincati, G. M. Bellistri [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2009. – V. 48. – № 3. – P. 328–37.

142. Ge, T. The Role of the Pentose Phosphate Pathway in Diabetes and Cancer / T. Ge, J. Yang, S. Zhou [et al.] // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2020. – V. 11. – P. 365.

143. Gergely, P. Drug-induced lymphopenia: focus on CD4+ and CD8+ cells / P. Gergely // *Drug Saf.* – 1999. – V. 21. – № 2. – P. 91–100.

144. Gerriets, V.A. Foxp3 and Toll-like receptor signaling balance Treg cell anabolic metabolism for suppression / V. A. Gerriets, R. J. Kishton, M. O. Johnson [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2016. – V. 17. – № 12. – P. 1459–1466.

145. Gibellini, L. The protease inhibitor atazanavir triggers autophagy and mitophagy in human preadipocytes / L. Gibellini, S. De Biasi, M. Pinti [et al.] // *AIDS* – 2012. – V. 26. – № 16. – P. 2017–26.

146. Giorgi, J. V. Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study / J. V. Giorgi, Z. Liu, L. E. Hultin [et al.] // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 1993. – V. 6. – № 8. – P. 904–12.

147. Goes, L.R. The V2 loop of HIV gp120 delivers costimulatory signals to CD4+ T cells through Integrin $\alpha 4\beta 7$ and promotes cellular activation and infection / L. R. Goes, A. Sajani, A. Sivo [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2020. – V. 117. – № 51. – P. 32566–32573.

148. Goto, M. Oligomeric Procyanidins Interfere with Glycolysis of Activated T Cells. A Novel Mechanism for Inhibition of T Cell Function / M. Goto, M. Wakagi, T. Shoji [et al.] // *Molecules* – 2015. – V. 20. – № 10. – P. 19014–26.

149. Gougeon, M.L. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells

correlates with lymphocyte activation and with disease progression / M. L. Gougeon, H. Lecoecur, A. Dulioust [et al.] // *J. Immunol.* – 1996. – V. 156. – № 9. – P. 3509–20.

150. Grabmeier-Pfistershammer, K. Identification of PD-1 as a unique marker for failing immune reconstitution in HIV-1-infected patients on treatment / K. Grabmeier-Pfistershammer, P. Steinberger, A. Rieger [et al.] // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 2011. – V. 56. – № 2. – P. 118–24.

151. Grassian, A.R. Erk regulation of pyruvate dehydrogenase flux through PDK4 modulates cell proliferation / A. R. Grassian, C. M. Metallo, J. L. Coloff [et al.] // *Genes Dev.* – 2011. – V. 25. – № 16. – P. 1716–33.

152. Gresele, P. Endothelial and platelet function alterations in HIV-infected patients / P. Gresele, E. Falcinelli, M. Sebastiano [et al.] // *Thromb. Res.* – 2012. – V. 129. – № 3. – P. 301–8.

153. Griffiths, M. The role of glutamine and glucose analogues in metabolic inhibition of human myeloid leukaemia in vitro / M. Griffiths, D. Keast, G. Patrick [et al.] // *Int. J. Biochem.* – 1993. – V. 25. – № 12. – P. 1749–55.

154. Grossman, Z. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? / Z. Grossman, M. Meier-Schellersheim, A. E. Sousa [et al.] // *Nat. Med.* – 2002. – V. 8. – № 4. – P. 319–23.

155. Groux, H. Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals / H. Groux, G. Torpier, D. Monté [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1992. – V. 175. – № 2. – P. 331–40.

156. Grumont, R. The mitogen-induced increase in T cell size involves PKC and NFAT activation of Rel/NF-kappaB-dependent c-myc expression / R. Grumont, P. Lock, M. Mollinari [et al.] // *Immunity* – 2004. – V. 21. – № 1. – P. 19–30.

157. Guerrero, S. HIV-1 replication and the cellular eukaryotic translation apparatus / S. Guerrero, J. Batisse, C. Libre [et al.] // *Viruses* – 2015. – V. 7. – № 1. – P. 199–218.

158. Guihot, A. Immune and virological benefits of 10 years of permanent viral control with antiretroviral therapy / A. Guihot, R. Tubiana, G. Breton [et al.] // *AIDS* – 2010. – V. 24. – № 4. – P. 614–7.

159. Gumber, D. Improving CAR-T immunotherapy: Overcoming the challenges of T cell exhaustion / D. Gumber, L. D. Wang // *EBioMedicine* – 2022. – V. 77. – P. 103941.
160. Guo, H. Multi-omics analyses reveal that HIV-1 alters CD4+ T cell immunometabolism to fuel virus replication / H. Guo, Q. Wang, K. Ghneim [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2021. – V. 22. – № 4. – P. 423–433.
161. Gurling, M. The DEP domain-containing protein TOE-2 promotes apoptosis in the Q lineage of *C. elegans* through two distinct mechanisms / M. Gurling, K. Talavera, G. Garriga // *Development* – 2014. – V. 141. – № 13. – P. 2724–34.
162. Haase, A.T. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues / A. T. Haase // *Annu. Rev. Immunol.* – 1999. – V. 17. – P. 625–56.
163. Hakim, F.T. Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells / F. T. Hakim, R. Cepeda, S. Kaimei [et al.] // *Blood* – 1997. – V. 90. – № 9. – P. 3789–98.
164. Halestrap, A.P. The monocarboxylate transporter family--role and regulation / A. P. Halestrap, M. C. Wilson // *IUBMB Life* – 2012. – V. 64. – № 2. – P. 109–19.
165. Han, H. p-Cresyl sulfate aggravates cardiac dysfunction associated with chronic kidney disease by enhancing apoptosis of cardiomyocytes / H. Han, J. Zhu, Z. Zhu [et al.] // *J. Am. Heart Assoc.* – 2015. – V. 4. – № 6. – P. e001852.
166. Harper, M.E. Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization / M. E. Harper, L. M. Marselle, R. C. Gallo [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1986. – V. 83. – № 3. – P. 772–6.
167. Haruta, I. Lipoteichoic acid may affect the pathogenesis of PBC-like bile duct damage and might be involved in systemic multifocal epithelial inflammations in chronic colitis-harboring TCRalpha-/-xAIM-/- mice / I. Haruta, E. Hashimoto, N. Shibata [et al.] // *Autoimmunity* – 2007. – V. 40. – № 5. – P. 372–9.

168. Hashizume, O. Epigenetic regulation of the nuclear-coded GCAT and SHMT2 genes confers human age-associated mitochondrial respiration defects / O. Hashizume, S. Ohnishi, T. Mito [et al.] // *Sci. Rep.* – 2015. – V. 5. – P. 10434.

169. Hatzivassiliou, G. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth / G. Hatzivassiliou, F. Zhao, D. E. Bauer [et al.] // *Cancer Cell* – 2005. – V. 8. – № 4. – P. 311–21.

170. Havlir, D. V. Effect of potent antiretroviral therapy on immune responses to *Mycobacterium avium* in human immunodeficiency virus-infected subjects / D. V. Havlir, R. D. Schrier, F. J. Torriani [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2000. – V. 182. – № 6. – P. 1658–63.

171. Hayashi, J. Nuclear but not mitochondrial genome involvement in human age-related mitochondrial dysfunction. Functional integrity of mitochondrial DNA from aged subjects / J. Hayashi, S. Ohta, Y. Kagawa [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – № 9. – P. 6878–83.

172. Heaton, R.K. HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study / R. K. Heaton, D. B. Clifford, D. R. Franklin [et al.] // *Neurology* – 2010. – V. 75. – № 23. – P. 2087–96.

173. Hedekov, C.J. Early effects of phytohaemagglutinin on glucose metabolism of normal human lymphocytes / C. J. Hedekov // *Biochem. J.* – 1968. – V. 110. – № 2. – P. 373–80.

174. Heiden, M.G. Vander Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation / M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, C. B. Thompson // *Science* – 2009. – V. 324. – № 5930. – P. 1029–33.

175. Heiden, M.G. Vander Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation / M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, C. B. Thompson // *Science*. – 2009. – V. 324. – № 5930. – P. 1029–1033.

176. Hellerstein, M. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans / M. Hellerstein, M. B. Hanley, D. Cesar [et al.] // *Nat. Med.* – 1999. – V. 5. – № 1. – P. 83–9.

177. Henrick, B.M. HIV-1 Structural Proteins Serve as PAMPs for TLR2 Heterodimers Significantly Increasing Infection and Innate Immune Activation / B. M. Henrick, X.-D. Yao, K. L. Rosenthal [et al.] // *Front. Immunol.* – 2015. – V. 6. – P. 426.

178. Hingrat, Q. Le The Hitchhiker Guide to CD4+ T-Cell Depletion in Lentiviral Infection. A Critical Review of the Dynamics of the CD4+ T Cells in SIV and HIV Infection / Q. Le Hingrat, I. Sereti, A. L. Landay [et al.] // *Front. Immunol.* – 2021. – V. 12. – P. 695674.

179. Homann, D. Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory / D. Homann, L. Teyton, M. B. A. Oldstone // *Nat. Med.* – 2001. – V. 7. – № 8. – P. 913–9.

180. Hommel, M. Dynamic changes during the immune response in T cell-antigen-presenting cell clusters isolated from lymph nodes / M. Hommel, B. Kyewski // *J. Exp. Med.* – 2003. – V. 197. – № 3. – P. 269–80.

181. Hong, J.J. Re-evaluation of PD-1 expression by T cells as a marker for immune exhaustion during SIV infection / J. J. Hong, P. K. Amancha, K. Rogers [et al.] // *PLoS One* – 2013. – V. 8. – № 3. – P. e60186.

182. Howie, D. The Role of Lipid Metabolism in T Lymphocyte Differentiation and Survival / D. Howie, A. Ten Bokum, A. S. Necula [et al.] // *Front. Immunol.* – 2017. – V. 8. – P. 1949.

183. Huang, B. Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities / B. Huang, B.-L. Song, C. Xu // *Nat. Metab.* – 2020. – V. 2. – № 2. – P. 132–141.

184. Hughes, P.D. Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity / P. D. Hughes, G. T. Belz, K. A. Fortner [et al.] // *Immunity* – 2008. – V. 28. – № 2. – P. 197–205.

185. Hume, D.A. Aerobic glycolysis and lymphocyte transformation / D. A. Hume, J. L. Radik, E. Ferber [et al.] // *Biochem. J.* – 1978. – V. 174. – № 3. – P. 703–9.

186. Hunt, P.W. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence

of therapy / P. W. Hunt, J. Brechley, E. Sinclair [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2008. – V. 197. – № 1. – P. 126–33.

187. Hunt, P.W. A low T regulatory cell response may contribute to both viral control and generalized immune activation in HIV controllers / P. W. Hunt, A. L. Landay, E. Sinclair [et al.] // *PLoS One* – 2011. – V. 6. – № 1. – P. e15924.

188. Hunt, P.W. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy / P. W. Hunt, J. N. Martin, E. Sinclair [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2003. – V. 187. – № 10. – P. 1534–43.

189. Hunt, P.W. Valganciclovir reduces T cell activation in HIV-infected individuals with incomplete CD4+ T cell recovery on antiretroviral therapy / P. W. Hunt, J. N. Martin, E. Sinclair [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2011. – V. 203. – № 10. – P. 1474–83.

190. Ivanov, A. V. Oxidative Stress during HIV Infection: Mechanisms and Consequences / A. V. Ivanov, V. T. Valuev-Elliston, O. N. Ivanova [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2016. – V. 2016. – P. 8910396.

191. Jacobs, S.R. Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways / S. R. Jacobs, C. E. Herman, N. J. Maciver [et al.] // *J. Immunol.* – 2008. – V. 180. – № 7. – P. 4476–86.

192. Jaffe, H.W. Immune reconstitution and risk of Kaposi sarcoma and non-Hodgkin lymphoma in HIV-infected adults / H. W. Jaffe, B. L. De Stavola, L. M. Carpenter [et al.] // *AIDS* – 2011. – V. 25. – № 11. – P. 1395–403.

193. Jakobsen, M.R. IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication / M. R. Jakobsen, R. O. Bak, A. Andersen [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2013. – V. 110. – № 48. – P. E4571-80.

194. Janssen, O. Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations / O. Janssen, R. Sanzenbacher, D. Kabelitz // *Cell Tissue Res.* – 2000. – V. 301. – № 1. – P. 85–99.

195. Jenkins, E. The current state and future of T-cell exhaustion research / E. Jenkins, T. Whitehead, M. Fellermeier [et al.] // *Oxford open Immunol.* – 2023. – V. 4. – № 1. – P. iqad006.
196. Joller, N. Cutting edge: TIGIT has T cell-intrinsic inhibitory functions / N. Joller, J. P. Hafler, B. Brynedal [et al.] // *J. Immunol.* – 2011. – V. 186. – № 3. – P. 1338–42.
197. Jones, N. Metabolic Adaptation of Human CD4+ and CD8+ T-Cells to T-Cell Receptor-Mediated Stimulation / N. Jones, J. G. Cronin, G. Dolton [et al.] // *Front. Immunol.* – 2017. – V. 8. – P. 1516.
198. Jones, N. Akt and STAT5 mediate naïve human CD4+ T-cell early metabolic response to TCR stimulation / N. Jones, E. E. Vincent, J. G. Cronin [et al.] // *Nat. Commun.* – 2019. – V. 10. – № 1. – P. 2042.
199. Kalhan, S.C. Resurgence of serine: an often neglected but indispensable amino Acid / S. C. Kalhan, R. W. Hanson // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287. – № 24. – P. 19786–91.
200. Kang, S. HIV-1 Infection and Glucose Metabolism Reprogramming of T Cells: Another Approach Toward Functional Cure and Reservoir Eradication / S. Kang, H. Tang // *Front. Immunol.* – 2020. – V. 11. – P. 572677.
201. Karamchand, L. Lymphocyte mitochondrial depolarization and apoptosis in HIV-1-infected HAART patients / L. Karamchand, H. Dawood, A. A. Chuturgoon // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 2008. – V. 48. – № 4. – P. 381–8.
202. Kassu, A. Regulation of virus-specific CD4+ T cell function by multiple costimulatory receptors during chronic HIV infection / A. Kassu, R. A. Marcus, M. B. D'Souza [et al.] // *J. Immunol.* – 2010. – V. 185. – № 5. – P. 3007–18.
203. Kasten, S. Positive influence of the Delta32CCR5 allele on response to highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV-1 infected patients / S. Kasten, A. Goldwisch, M. Schmitt [et al.] // *Eur. J. Med. Res.* – 2000. – V. 5. – № 8. – P. 323–8.
204. Katsikis, P.D. Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals / P. D. Katsikis, E.

S. Wunderlich, C. A. Smith [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1995. – V. 181. – № 6. – P. 2029–36.

205. Keir, M. The role of IL-22 in intestinal health and disease / M. Keir, T. Yi, T. Lu [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2020. – V. 217. – № 3. – P. e20192195.

206. Kelley, C.F. Incomplete peripheral CD4+ cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment / C. F. Kelley, C. M. R. Kitchen, P. W. Hunt [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2009. V. 48. – № 6. – P. 787-794.

207. Kim, C.J. A role for mucosal IL-22 production and Th22 cells in HIV-associated mucosal immunopathogenesis / C. J. Kim, A. Nazli, O. L. Rojas [et al.] // *Mucosal Immunol.* – 2012. – V. 5. – № 6. – P. 670–80.

208. Kireev, D. Alarming Rise of Primary HIV Drug Resistance in Major Regions of Russia / D. Kireev, A. Kirichenko, A. Lebedev [et al.] // *Curr. HIV Res.* – 2023. – V. 21. – № 6. – P. 347–353.

209. Kirichenko, A. HIV-1 Drug Resistance among Treatment-Naïve Patients in Russia: Analysis of the National Database, 2006-2022 / A. Kirichenko, D. Kireev, I. Lapovok [et al.] // *Viruses* – 2023. – V. 15. – № 4. – P. 991.

210. Korencak, M. Effect of HIV infection and antiretroviral therapy on immune cellular functions / M. Korencak, M. Byrne, E. Richter [et al.] // *JCI insight* – 2019. – V. 4. – № 12.

211. Korin, Y.D. Nonproductive human immunodeficiency virus type 1 infection in nucleoside-treated G0 lymphocytes / Y. D. Korin, J. A. Zack // *J. Virol.* – 1999. – V. 73. – № 8. – P. 6526–32.

212. Kornfeld, C. Antiinflammatory profiles during primary SIV infection in African green monkeys are associated with protection against AIDS / C. Kornfeld, M. J. Y. Ploquin, I. Pandrea [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2005. – V. 115. – № 4. – P. 1082–91.

213. Krishnaswamy, G. Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease / G. Krishnaswamy, J. Kelley, L. Yerra [et al.] // *J. Interferon Cytokine Res.* – 1999. – V. 19. – № 2. – P. 91–104.

214. Kuang, Y.-Q. Editorial: Challenges and solutions for the incomplete immune restoration in HIV-infected patients under antiretroviral therapy / Y.-Q. Kuang, C. Sun, D. R. Ram [et al.] // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2023. – V. 13. – P. 1232699.

215. Kuri-Cervantes, L. Activation of NK cells is associated with HIV-1 disease progression / L. Kuri-Cervantes, G. S.-M. de Oca, S. Avila-Ríos [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2014. – V. 96. – № 1. – P. 7–16.

216. Kushner, L.E. Immune biomarker differences and changes comparing HCV mono-infected, HIV/HCV co-infected, and HCV spontaneously cleared patients / L. E. Kushner, A. M. Wendelboe, L. C. Lazzeroni [et al.] // *PLoS One* – 2013. – V. 8. – № 4. – P. e60387.

217. Kuznetsova, A. V. Barriers and Facilitators of HIV Care Engagement: Results of a Qualitative Study in St. Petersburg, Russia / A. V. Kuznetsova, A. Y. Meylakhs, Y. A. Amirkhanian [et al.] // *AIDS Behav.* – 2016. – V. 20. – № 10. – P. 2433–2443.

218. Lackner, A.A. HIV pathogenesis: the host / A. A. Lackner, M. M. Lederman, B. Rodriguez // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2012. – V. 2. – № 9. – P. a007005.

219. Ladha, J.S. Mitochondrial complex I activity is impaired during HIV-1-induced T-cell apoptosis / J. S. Ladha, M. K. Tripathy, D. Mitra // *Cell Death Differ.* – 2005. – V. 12. – № 11. – P. 1417–28.

220. Le, A. The Metabolic Interplay between Cancer and Other Diseases / A. Le, S. Udupa, C. Zhang // *Trends in cancer* – 2019. – V. 5. – № 12. – P. 809–821.

221. Lederman, M.M. Immunologic Failure Despite Suppressive Antiretroviral Therapy Is Related to Activation and Turnover of Memory CD4 Cells / M. M. Lederman, L. Calabrese, N. T. Funderburg [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2011. – V. 204. – № 8. – P. 1217–1226.

222. Lederman, M.M. Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and ritonavir: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315 / M. M. Lederman, E. Connick, A. Landay [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 1998. – V. 178. – № 1. – P. 70–9.

223. Lee, B. HIV provides ample PAMPs for innate immune sensing / B. Lee // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2013. – V. 110. – № 48. – P. 19183–4.
224. Lee, J. Reinvigorating Exhausted T Cells by Blockade of the PD-1 Pathway / J. Lee, E. Ahn, H. T. Kissick [et al.] // *For. Immunopathol. Dis. Therap.* – 2015. – V. 6. – № 1–2. – P. 7–17.
225. Lee, J. Substrate channeling in the glycerol-3-phosphate pathway regulates the synthesis, storage and secretion of glycerolipids / J. Lee, N. D. Ridgway // *Biochim. Biophys. acta. Mol. cell Biol. lipids* – 2020. – V. 1865. – № 1. – P. 158438.
226. Lee, J. Regulator of fatty acid metabolism, acetyl coenzyme a carboxylase 1, controls T cell immunity / J. Lee, M. C. Walsh, K. L. Hoehn [et al.] // *J. Immunol.* – 2014. – V. 192. – № 7. – P. 3190–9.
227. Lehman, J.J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis / J. J. Lehman, P. M. Barger, A. Kovacs [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2000. – V. 106. – № 7. – P. 847–56.
228. Lemire, J. Mitochondrial lactate dehydrogenase is involved in oxidative-energy metabolism in human astrocytoma cells (CCF-STTG1) / J. Lemire, R. J. Mailloux, V. D. Appanna // *PLoS One* – 2008. – V. 3. – № 2. – P. e1550.
229. Leonard, R. Cytopathic effect of human immunodeficiency virus in T4 cells is linked to the last stage of virus infection / R. Leonard, D. Zagury, I. Desportes [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1988. – V. 85. – № 10. – P. 3570–4.
230. Li, C. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein / C. Li, D. Friedman, C. Wang, V. Metelev [et al.] // *Science (80-.)*. – 1995. – V. 268. – № 5209. – P. 429–431.
231. Li, C. PI3K/AKT signaling regulates bioenergetics in immortalized hepatocytes / C. Li, Y. Li, L. He [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2013. – V. 60. – P. 29–40.
232. Li, K. Airway epithelial regeneration requires autophagy and glucose metabolism / K. Li, M. Li, W. Li [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2019. – V. 10. – № 12. – P. 875.

233. Li, Q. Peak SIV replication in resting memory CD4⁺ T cells depletes gut lamina propria CD4⁺ T cells / Q. Li, L. Duan, J. D. Estes [et al.] // *Nature* – 2005. – V. 434. – № 7037. – P. 1148–52.

234. Li, X.-B. Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy / X.-B. Li, J.-D. Gu, Q.-H. Zhou // *Thorac. cancer* – 2015. – V. 6. – № 1. – P. 17–24.

235. Liang, W.S. Alzheimer's disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons / W. S. Liang, E. M. Reiman, J. Valla [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – V. 105. – № 11. – P. 4441–6.

236. Liberti, M. V. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? / M. V. Liberti, J. W. Locasale // *Trends Biochem. Sci.* – 2016. – V. 41. – № 3. – P. 211–218.

237. Lin, S.-J. Programmed death-1 (PD-1) defines a transient and dysfunctional oligoclonal T cell population in acute homeostatic proliferation / S.-J. Lin, C. D. Peacock, K. Bahl [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2007. – V. 204. – № 10. – P. 2321–33.

238. Liovat, A.-S. African non human primates infected by SIV - why don't they get sick? Lessons from studies on the early phase of non-pathogenic SIV infection / A.-S. Liovat, B. Jacquelin, M. J. Ploquin [et al.] // *Curr. HIV Res.* – 2009. – V. 7. – № 1. – P. 39–50.

239. Liu, Z. Elevated relative fluorescence intensity of CD38 antigen expression on CD8⁺ T cells is a marker of poor prognosis in HIV infection: results of 6 years of follow-up / Z. Liu, L. E. Hultin, W. G. Cumberland [et al.] // *Cytometry* – 1996. – V. 26. – № 1. – P. 1–7.

240. Locasale, J.W. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle / J. W. Locasale // *Nat. Rev. Cancer* – 2013. – V. 13. – № 8. – P. 572–83.

241. Lok, J.J. Long-term increase in CD4⁺ T-cell counts during combination antiretroviral therapy for HIV-1 infection / J. J. Lok, R. J. Bosch, C. A. Benson [et al.] // *AIDS* – 2010. – V. 24. – № 12. – P. 1867–76.

242. Lozano, E. The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function / E. Lozano, M. Dominguez-Villar, V. Kuchroo [et al.] // *J. Immunol.* – 2012. – V. 188. – № 8. – P. 3869–75.
243. Lunt, S.Y. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation / S. Y. Lunt, M. G. Vander Heiden // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2011. – V. 27. – P. 441–64.
244. Macías, J. Impaired recovery of CD4⁺ cell counts following highly active antiretroviral therapy in drug-naïve patients coinfecting with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus / J. Macías, J. A. Pineda, F. Lozano [et al.] // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2003. – V. 22. – № 11. – P. 675–80.
245. Macintyre, A.N. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function / A. N. Macintyre, V. A. Gerriets, A. G. Nichols [et al.] // *Cell Metab.* – 2014. – V. 20. – № 1. – P. 61–72.
246. Macintyre, A.N. Activated lymphocytes as a metabolic model for carcinogenesis / A. N. Macintyre, J. C. Rathmell // *Cancer Metab.* – 2013. – V. 1. – № 1. – P. 5.
247. Mackall, C.L. Distinctions between CD8⁺ and CD4⁺ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy / C. L. Mackall, T. A. Fleisher, M. R. Brown [et al.] // *Blood* – 1997. – V. 89. – № 10. – P. 3700–7.
248. MacLeod, M. CD4 memory T cells survive and proliferate but fail to differentiate in the absence of CD40 / M. MacLeod, M. J. Kwakkenbos, A. Crawford [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2006. – V. 203. – № 4. – P. 897–906.
249. MacLeod, M.K.L. Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-assignment / M. K. L. MacLeod, J. W. Kappler, P. Marrack // *Immunology* – 2010. – V. 130. – № 1. – P. 10–5.
250. Mahnke, J. Interferon Regulatory Factor 4 controls TH1 cell effector function and metabolism / J. Mahnke, V. Schumacher, S. Ahrens [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. – P. 35521.

251. Marchetti, G. Microbial translocation predicts disease progression of HIV-infected antiretroviral-naive patients with high CD4+ cell count / G. Marchetti, A. Cozzi-Lepri, E. Merlini [et al.] // AIDS – 2011. – V. 25. – № 11. – P. 1385–94.

252. Marchetti, G. Comparative analysis of T-cell turnover and homeostatic parameters in HIV-infected patients with discordant immune-virological responses to HAART / G. Marchetti, A. Gori, A. Casabianca [et al.] // AIDS – 2006. – V. 20. – № 13. – P. 1727–36.

253. Marchetti, P. Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells / P. Marchetti, Q. Fovez, N. Germain [et al.] // FASEB J. – 2020. – V. 34. – № 10. – P. 13106–13124.

254. Maresca, M. The virotoxin model of HIV-1 enteropathy: involvement of GPR15/Bob and galactosylceramide in the cytopathic effects induced by HIV-1 gp120 in the HT-29-D4 intestinal cell line / M. Maresca, R. Mahfoud, N. Garmy [et al.] // J. Biomed. Sci. – 2003. – V. 10. – № 1. – P. 156–66.

255. Marimoutou, C. Prognostic factors of combined viral load and CD4+ cell count responses under triple antiretroviral therapy, Aquitaine cohort, 1996-1998 / C. Marimoutou, G. Chêne, P. Mercié [et al.] // J. Acquir. Immune Defic. Syndr. – 2001. – V. 27. – № 2. – P. 161–7.

256. Márquez, M. Immune activation response in chronic HIV-infected patients: influence of Hepatitis C virus coinfection / M. Márquez, P. Romero-Cores, M. Montes-Oca [et al.] // PLoS One – 2015. – V. 10. – № 3. – P. e0119568.

257. Martínez-Reyes, I. Mitochondrial ubiquinol oxidation is necessary for tumour growth / I. Martínez-Reyes, L. R. Cardona, H. Kong [et al.] // Nature – 2020. – V. 585. – № 7824. – P. 288–292.

258. Massanella, M. CD4 T-cell hyperactivation and susceptibility to cell death determine poor CD4 T-cell recovery during suppressive HAART / M. Massanella, E. Negredo, N. Pérez-Álvarez [et al.] // AIDS – 2010.

259. Masson, J.J.R. Polymorphism rs1385129 Within Glut1 Gene SLC2A1 Is Linked to Poor CD4+ T Cell Recovery in Antiretroviral-Treated HIV+ Individuals / J. J.

R. Masson, C. L. Cherry, N. M. Murphy [et al.] // *Front. Immunol.* – 2018. – V. 9. – P. 900.

260. Masson, J.J.R. Assessment of metabolic and mitochondrial dynamics in CD4⁺ and CD8⁺ T cells in virologically suppressed HIV-positive individuals on combination antiretroviral therapy / J. J. R. Masson, A. J. Murphy, M. K. S. Lee [et al.] // *PLoS One* – 2017. – V. 12. – № 8. – P. e0183931.

261. Masur, H. HIV-Related Opportunistic Infections Are Still Relevant in 2015. / H. Masur // *Top. Antivir. Med.* – 2015. – V. 23. – № 3. – P. 116–9.

262. Mattapallil, J.J. Massive infection and loss of memory CD4⁺ T cells in multiple tissues during acute SIV infection / J. J. Mattapallil, D. C. Douek, B. Hill [et al.] // *Nature* – 2005. – V. 434. – № 7037. – P. 1093–7.

263. McKinney, E.F. Metabolic exhaustion in infection, cancer and autoimmunity / E. F. McKinney, K. G. C. Smith // *Nat. Immunol.* – 2018. – V. 19. – № 3. – P. 213–221.

264. McLeod, I.X. Roles of autophagy in lymphocytes: reflections and directions / I. X. McLeod, Y. He // *Cell. Mol. Immunol.* – 2010. – V. 7. – № 2. – P. 104–7.

265. McMichael, A.J. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development / A. J. McMichael, P. Borrow, G. D. Tomaras [et al.] // *Nat. Rev. Immunol.* – 2010. – V. 10. – № 1. – P. 11–23.

266. Mehandru, S. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4⁺ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract / S. Mehandru, M. A. Poles, K. Tenner-Racz [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2004. – V. 200. – № 6. – P. 761–70.

267. Meier, A. Upregulation of PD-L1 on monocytes and dendritic cells by HIV-1 derived TLR ligands / A. Meier, A. Bagchi, H. K. Sidhu [et al.] // *AIDS* – 2008. – V. 22. – № 5. – P. 655–8.

268. Mercurio, V. Persistent Immune Activation in HIV-1-Infected Ex Vivo Model Tissues Subjected to Antiretroviral Therapy: Soluble and Extracellular Vesicle-Associated Cytokines / V. Mercurio, W. Fitzgerald, I. Molodtsov [et al.] // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 2020. – V. 84. – № 1. – P. 45–53.

269. Mercurio, V. Mechanisms of residual immune activation in HIV-1-infected human lymphoid tissue ex vivo / V. Mercurio, W. Fitzgerald, C. Vanpouille [et al.] // *AIDS* – 2021. – V. 35. – № 8. – P. 1179–1190.

270. Meyerhans, A. Restriction and enhancement of human immunodeficiency virus type 1 replication by modulation of intracellular deoxynucleoside triphosphate pools / A. Meyerhans, J. P. Vartanian, C. Hultgren [et al.] // *J. Virol.* – 1994. – V. 68. – № 1. – P. 535–40.

271. Michalek, R.D. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets / R. D. Michalek, V. A. Gerriets, S. R. Jacobs [et al.] // *J. Immunol.* – 2011. – V. 186. – № 6. – P. 3299–303.

272. Miller, E.S. Inhibition of murine splenic T lymphocyte proliferation by 2-deoxy-D-glucose-induced metabolic stress / E. S. Miller, J. C. Klinger, C. Akin [et al.] // *J. Neuroimmunol.* – 1994. – V. 52. – № 2. – P. 165–73.

273. Mo, H. Expression patterns of the HIV type 1 coreceptors CCR5 and CXCR4 on CD4⁺ T cells and monocytes from cord and adult blood / H. Mo, S. Monard, H. Pollack [et al.] // *AIDS Res. Hum. Retroviruses* – 1998. – V. 14. – № 7. – P. 607–17.

274. Mohammed, F. Rotenone-induced reactive oxygen species signal the recruitment of STAT3 to mitochondria / F. Mohammed, M. Gorla, V. Bisoyi [et al.] // *FEBS Lett.* – 2020.

275. Moir, S. Pathogenic mechanisms of HIV disease / S. Moir, T.-W. Chun, A. S. Fauci // *Annu. Rev. Pathol.* – 2011. – V. 6. – P. 223–48.

276. Molina, J.M. Production of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta by monocytic cells infected with human immunodeficiency virus / J. M. Molina, D. T. Scadden, R. Byrn [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1989. – V. 84. – № 3. – P. 733–7.

277. Monroe, K.M. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV / K. M. Monroe, Z. Yang, J. R. Johnson [et al.] // *Science* – 2014. – V. 343. – № 6169. – P. 428–32.

278. Montaner, J.S.G. The case for expanding access to highly active antiretroviral therapy to curb the growth of the HIV epidemic / J. S. G. Montaner, R. Hogg, E. Wood [et al.] // *Lancet* (London, England) – 2006. – V. 368. – № 9534. – P. 531–6.

279. Montufar-Solis, D. T-cell activation in the intestinal mucosa / D. Montufar-Solis, T. Garza, J. R. Klein // *Immunol. Rev.* – 2007. – V. 215. – P. 189–201.

280. Mookerjee, S.A. Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements / S. A. Mookerjee, A. A. Gerencser, D. G. Nicholls [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2017. – V. 292. – № 17. – P. 7189–7207.

281. Mookerjee, S.A. Determining Maximum Glycolytic Capacity Using Extracellular Flux Measurements / S. A. Mookerjee, D. G. Nicholls, M. D. Brand // *PLoS One* – 2016. – V. 11. – № 3. – P. e0152016.

282. Moschovaki Filippidou, F. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonism Improves Nephrotoxic Serum Nephritis by Inhibiting T-Cell Proliferation / F. Moschovaki Filippidou, A. H. Kirsch, M. Thelen [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2020. – V. 190. – № 2. – P. 400–411.

283. Motamedi, M. Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers / M. Motamedi, L. Xu, S. Elahi // *J. Immunol. Methods* – 2016.

284. Mueller, S.N. High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection / S. N. Mueller, R. Ahmed // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2009. – V. 106. – № 21. – P. 8623–8.

285. Murao, A. Release mechanisms of major DAMPs / A. Murao, M. Aziz, H. Wang [et al.] // *Apoptosis* – 2021. – V. 26. – № 3–4. – P. 152–162.

286. Muroski, M.E. Fatty Acid Uptake in T Cell Subsets Using a Quantum Dot Fatty Acid Conjugate / M. E. Muroski, J. Miska, A. L. Chang [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 5790.

287. Musich, T. Monoclonal Antibodies Specific for the V2, V3, CD4-Binding Site, and gp41 of HIV-1 Mediate Phagocytosis in a Dose-Dependent Manner / T. Musich, L. Li, L. Liu [et al.] // *J. Virol.* – 2017. – V. 91. – № 8.

288. Nabatanzi, R. Effects of HIV infection and ART on phenotype and function of circulating monocytes, natural killer, and innate lymphoid cells / R. Nabatanzi, S. Cose, M. Joloba [et al.] // *AIDS Res. Ther.* – 2018. – V. 15. – № 1. – P. 7.

289. Nasi, M. Genetic polymorphisms of Fas (CD95) and Fas ligand (CD178) influence the rise in CD4+ T cell count after antiretroviral therapy in drug-naïve HIV-positive patients / M. Nasi, M. Pinti, R. Bugarini [et al.] // *Immunogenetics* – 2005. – V. 57. – № 9. – P. 628–35.

290. Nastasi, C. Inhibition of succinate dehydrogenase activity impairs human T cell activation and function / C. Nastasi, A. Willerlev-Olsen, K. Dalhoff [et al.] // *Sci. Rep.* – 2021. – V. 11. – № 1. – P. 1458.

291. Nazli, A. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation / A. Nazli, O. Chan, W. N. Dobson-Belaire [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2010. – V. 6. – № 4. – P. e1000852.

292. Nicholls, D.G. Spare respiratory capacity, oxidative stress and excitotoxicity / D. G. Nicholls // *Biochem. Soc. Trans.* – 2009. – V. 37. – № Pt 6. – P. 1385–8.

293. Nicklin, P. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy / P. Nicklin, P. Bergman, B. Zhang [et al.] // *Cell* – 2009. – V. 136. – № 3. – P. 521–34.

294. Nicoli, F. The HIV-1 Tat protein induces the activation of CD8+ T cells and affects in vivo the magnitude and kinetics of antiviral responses / F. Nicoli, V. Finessi, M. Sicurella [et al.] // *PLoS One* – 2013. – V. 8. – № 11. – P. e77746.

295. Nissapatorn, V. Lessons learned about opportunistic infections in southeast Asia / V. Nissapatorn // *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* – 2008. – V. 39. – № 4. – P. 625–41.

296. O'Brien, M. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection / M. O'Brien, O. Manches, N. Bhardwaj // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2013. – V. 762. – P. 71–107.

297. O'Sullivan, D. Memory CD8(+) T cells use cell-intrinsic lipolysis to support the metabolic programming necessary for development / D. O'Sullivan, G. J. W. van der Windt, S. C.-C. Huang [et al.] // *Immunity* – 2014. – V. 41. – № 1. – P. 75–88.

298. Obst, R. The Timing of T Cell Priming and Cycling / R. Obst // *Front. Immunol.* – 2015. – V. 6. – P. 563.

299. Okoye, A. Progressive CD4+ central memory T cell decline results in CD4+ effector memory insufficiency and overt disease in chronic SIV infection / A. Okoye, M. Meier-Schellersheim, J. M. Brenchley [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2007. – V. 204. – № 9. – P. 2171–85.

300. Okoye, A.A. CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure / A. A. Okoye, L. J. Picker // *Immunol. Rev.* – 2013. – V. 254. – № 1. – P. 54–64.

301. Okoye, A.A. Naive T cells are dispensable for memory CD4+ T cell homeostasis in progressive simian immunodeficiency virus infection / A. A. Okoye, M. Rohankhedkar, C. Abana [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2012. – V. 209. – № 4. – P. 641–51.

302. Ostler, T. “Bystander” recruitment of systemic memory T cells delays the immune response to respiratory virus infection / T. Ostler, H. Pircher, S. Ehl // *Eur. J. Immunol.* – 2003. – V. 33. – № 7. – P. 1839–48.

303. Ott, M. Immune hyperactivation of HIV-1-infected T cells mediated by Tat and the CD28 pathway / M. Ott, S. Emiliani, C. Van Lint [et al.] // *Science* – 1997. – V. 275. – № 5305. – P. 1481–5.

304. Ou, G. Polarized myosin produces unequal-size daughters during asymmetric cell division / G. Ou, N. Stuurman, M. D'Ambrosio [et al.] // *Science*. – 2010. – V. 330. – № 6004. – P. 677–680.

305. Owen, O.E. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function / O. E. Owen, S. C. Kalhan, R. W. Hanson // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – № 34. – P. 30409–12.

306. Pacella, I. Fatty acid metabolism complements glycolysis in the selective regulatory T cell expansion during tumor growth / I. Pacella, C. Procaccini, C.

Focaccetti [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2018. – V. 115. – № 28. – P. E6546–E6555.

307. Paiardini, M. HIV-associated chronic immune activation / M. Paiardini, M. Müller-Trutwin // Immunol. Rev. – 2013. – V. 254. – № 1. – P. 78–101.

308. Pallett, L.J. T cell metabolism in chronic viral infection / L. J. Pallett, N. Schmidt, A. Schurich // Clin. Exp. Immunol. – 2019. – V. 197. – № 2. – P. 143–152.

309. Palmer, C.S. Metabolically active CD4⁺ T cells expressing Glut1 and OX40 preferentially harbor HIV during in vitro infection / C. S. Palmer, G. A. Duette, M. C. E. Wagner [et al.] // FEBS Lett. – 2017. – V. 591. – № 20. – P. 3319–3332.

310. Palmer, C.S. Increased glucose metabolic activity is associated with CD4⁺ T-cell activation and depletion during chronic HIV infection / C. S. Palmer, M. Ostrowski, M. Gouillou [et al.] // AIDS – 2014. – V. 28. – № 3. – P. 297–309.

311. Palmieri, F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications / F. Palmieri // Pflugers Arch. – 2004. – V. 447. – № 5. – P. 689–709.

312. Pardee, A.B. A restriction point for control of normal animal cell proliferation / A. B. Pardee // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1974. – V. 71. – № 4. – P. 1286–90.

313. Parry, R. V. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms / R. V. Parry, J. M. Chemnitz, K. A. Frauwirth [et al.] // Mol. Cell. Biol. – 2005. – V. 25. – № 21. – P. 9543–53.

314. Patel, D. A Late G1 Lipid Checkpoint That Is Dysregulated in Clear Cell Renal Carcinoma Cells / D. Patel, D. Salloum, M. Saqcena [et al.] // J. Biol. Chem. – 2017. – V. 292. – № 3. – P. 936–944.

315. Patsoukis, N. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation / N. Patsoukis, K. Bardhan, P. Chatterjee [et al.] // Nat. Commun. – 2015. – V. 6. – № 1. – P. 6692.

316. Pelletier, J. Nucleotide depletion reveals the impaired ribosome biogenesis checkpoint as a barrier against DNA damage / J. Pelletier, F. Riaño-Canalias, E. Almacellas [et al.] // EMBO J. – 2020. – V. 39. – № 13. – P. e103838.

317. Perico, N. Hepatitis C infection and chronic renal diseases. / N. Perico, D. Cattaneo, B. Bikbov, G. Remuzzi // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2009. – V. 4. – № 1. – P. 207–20.

318. Pesini, A. Brain pyrimidine nucleotide synthesis and Alzheimer disease / A. Pesini, E. Iglesias, M. P. Bayona-Bafaluy [et al.] // *Aging (Albany, NY).* – 2019. – V. 11. – № 19. – P. 8433–8462.

319. Phillips, A.N. The role of HIV in serious diseases other than AIDS / A. N. Phillips, J. Neaton, J. D. Lundgren // *AIDS* – 2008. – V. 22. – № 18. – P. 2409–18.

320. Piketty, C. Discrepant responses to triple combination antiretroviral therapy in advanced HIV disease / C. Piketty, P. Castiel, L. Belec [et al.] // *AIDS* – 1998. – V. 12. – № 7. – P. 745–50.

321. Piketty, C. Long-term clinical outcome of human immunodeficiency virus-infected patients with discordant immunologic and virologic responses to a protease inhibitor-containing regimen / C. Piketty, L. Weiss, F. Thomas [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2001. – V. 183. – № 9. – P. 1328–35.

322. Pilon, A.A. Induction of apoptosis by a nonnucleoside human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor / A. A. Pilon, J. J. Lum, J. Sanchez-Dardon [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2002. – V. 46. – № 8. – P. 2687–91.

323. Poonia, B. Role of the Fas/FasL pathway in HIV or SIV disease / B. Poonia, C. D. Pauza, M. S. Salvato // *Retrovirology* – 2009. – V. 6. – P. 91.

324. Presicce, P. Myeloid dendritic cells isolated from tissues of SIV-infected Rhesus macaques promote the induction of regulatory T cells / P. Presicce, J. M. Shaw, C. J. Miller [et al.] // *AIDS* – 2012. – V. 26. – № 3. – P. 263–73.

325. Procaccini, C. The Proteomic Landscape of Human Ex Vivo Regulatory and Conventional T Cells Reveals Specific Metabolic Requirements / C. Procaccini, F. Carbone, D. Di Silvestre [et al.] // *Immunity* – 2016. – V. 44. – № 2. – P. 406–21.

326. Rajasuriar, R. The role of SNPs in the α -chain of the IL-7R gene in CD4⁺ T-cell recovery in HIV-infected African patients receiving suppressive cART / R.

Rajasuriar, D. R. Booth, M. Gouillou [et al.] // *Genes Immun.* – 2012. – V. 13. – № 1. – P. 83–93.

327. Raphael, I. Memory CD4+ T Cells in Immunity and Autoimmune Diseases / I. Raphael, R. R. Joern, T. G. Forsthuber // *Cells* – 2020. – V. 9. – № 3.

328. Raupach, B. Caspase-1-mediated activation of interleukin-1beta (IL-1beta) and IL-18 contributes to innate immune defenses against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection / B. Raupach, S.-K. Peuschel, D. M. Monack [et al.] // *Infect. Immun.* – 2006. – V. 74. – № 8. – P. 4922–6.

329. Rb-Silva, R. Definition of Immunological Nonresponse to Antiretroviral Therapy: A Systematic Review / R. Rb-Silva, A. Goios, C. Kelly [et al.] // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 2019. – V. 82. – № 5. – P. 452–461.

330. Reid, M.A. Serine synthesis through PHGDH coordinates nucleotide levels by maintaining central carbon metabolism / M. A. Reid, A. E. Allen, S. Liu [et al.] // *Nat. Commun.* – 2018. – V. 9. – № 1. – P. 5442.

331. Ren, W. Amino-acid transporters in T-cell activation and differentiation / W. Ren, G. Liu, J. Yin [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2017. – V. 8. – № 3. – P. e2655.

332. Reyskens, K.M.S.E. HIV protease inhibitors and onset of cardiovascular diseases: a central role for oxidative stress and dysregulation of the ubiquitin-proteasome system / K. M. S. E. Reyskens, M. F. Essop // *Biochim. Biophys. Acta* – 2014. – V. 1842. – № 2. – P. 256–68.

333. Riley, J.L. PD-1 signaling in primary T cells / J. L. Riley // *Immunol. Rev.* – 2009. – V. 229. – № 1. – P. 114–25.

334. Rocca, C. La Immunometabolic profiling of T cells from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis reveals an impairment in glycolysis and mitochondrial respiration / C. La Rocca, F. Carbone, V. De Rosa [et al.] // *Metabolism.* – 2017. – V. 77. – P. 39–46.

335. Roederer, M. HIV does not replicate in naive CD4T cells stimulated with CD3/CD28 / M. Roederer, P. A. Raju, D. K. Mitra [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1997. – V. 99. – № 7. – P. 1555–64.

336. Roger, P.M. Highly active anti-retroviral therapy (HAART) is associated with a lower level of CD4+ T cell apoptosis in HIV-infected patients / P. M. Roger, J. P. Breittmayer, C. Arlotto [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* – 1999. – V. 118. – № 3. – P. 412–6.

337. Ron-Harel, N. Defective respiration and one-carbon metabolism contribute to impaired naïve T cell activation in aged mice / N. Ron-Harel, G. Notarangelo, J. M. Ghergurovich [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2018. – V. 115. – № 52. – P. 13347–13352.

338. Ron-Harel, N. Mitochondrial Biogenesis and Proteome Remodeling Promote One-Carbon Metabolism for T Cell Activation / N. Ron-Harel, D. Santos, J. M. Ghergurovich [et al.] // *Cell Metab.* – 2016. – V. 24. – № 1. – P. 104–17.

339. Røsok, B.I. Reduced CD4 cell counts in blood do not reflect CD4 cell depletion in tonsillar tissue in asymptomatic HIV-1 infection / B. I. Røsok, L. Bostad, P. Voltersvik [et al.] // *AIDS* – 1996.

340. Rutz, S. IL-22, not simply a Th17 cytokine / S. Rutz, C. Eidenschenk, W. Ouyang // *Immunol. Rev.* – 2013. – V. 252. – № 1. – P. 116–32.

341. Ryan, E.S. Loss of Function of Intestinal IL-17 and IL-22 Producing Cells Contributes to Inflammation and Viral Persistence in SIV-Infected Rhesus Macaques / E. S. Ryan, L. Micci, R. Fromentin [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2016. – V. 12. – № 2. – P. e1005412.

342. Ryoo, H.D. The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer / H. D. Ryoo, A. Bergmann // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2012. – V. 4. – № 8. – P. a008797.

343. Sáez-Cirión, A. Immunometabolism and HIV-1 pathogenesis: food for thought / A. Sáez-Cirión, I. Sereti // *Nat. Rev. Immunol.* – 2021. – V. 21. – № 1. – P. 5–19.

344. Saggerson, D. Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells / D. Saggerson // *Annu. Rev. Nutr.* – 2008. – V. 28. – P. 253–72.

345. Saidakova, E. Memory CD4+ T-cells in HIV-Infected Immunological Nonresponders are Prone to Apoptosis When Cycling / E. Saidakova, L. Korolevskaya, K. Shmagel // *Lect. Notes Networks Syst.* – 2023. – P. 437–443.

346. Saidakova, E. V. Lymphopenia-induced proliferation of CD4 T-cells is associated with CD4 T-lymphocyte exhaustion in treated HIV-infected patients / E. V. Saidakova, K. V Shmagel, L. B. Korolevskaya [et al.] // *Indian J. Med. Res.* – 2018. – V. 147. – № 4. – P. 376–383.

347. Sakaguchi, S. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases / S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano [et al.] // *J. Immunol.* – 1995. – V. 155. – № 3. – P. 1151–64.

348. Sallusto, F. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance / F. Sallusto, J. Geginat, A. Lanzavecchia // *Annu. Rev. Immunol.* – 2004. – V. 22. – P. 745–63.

349. Sánchez-Wandelmer, J. Inhibition of cholesterol biosynthesis disrupts lipid raft/caveolae and affects insulin receptor activation in 3T3-L1 preadipocytes / J. Sánchez-Wandelmer, A. Dávalos, E. Herrera [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta* – 2009. – V. 1788. – № 9. – P. 1731–9.

350. Sandler, N.G. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities / N. G. Sandler, D. C. Douek // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2012. – V. 10. – № 9. – P. 655–66.

351. Sandler, N.G. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection / N. G. Sandler, H. Wand, A. Roque [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2011. – V. 203. – № 6. – P. 780–90.

352. Sansonetti, P.J. Caspase-1 Activation of IL-1 β and IL-18 Are Essential for *Shigella flexneri*-Induced Inflammation / P. J. Sansonetti, A. Phalipon, J. Arondel [et al.] // *Immunity* – 2000. – V. 12. – № 5. – P. 581–590.

353. Scagnolari, C. Type I interferon and HIV: Subtle balance between antiviral activity, immunopathogenesis and the microbiome / C. Scagnolari, G. Antonelli // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2018.

354. Scalise, M. The Human SLC1A5 (ASCT2) Amino Acid Transporter: From Function to Structure and Role in Cell Biology / M. Scalise, L. Pochini, L. Console [et al.] // *Front. cell Dev. Biol.* – 2018. – V. 6. – P. 96.

355. Schank, M. The Impact of HIV- and ART-Induced Mitochondrial Dysfunction in Cellular Senescence and Aging / M. Schank, J. Zhao, J. P. Moorman [et al.] // *Cells* – 2021. – V. 10. – № 1.

356. Scharping, N.E. The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction / N. E. Scharping, A. V. Menk, R. S. Moreci [et al.] // *Immunity* – 2016. – V. 45. – № 2. – P. 374–88.

357. Scharping, N.E. Mitochondrial stress induced by continuous stimulation under hypoxia rapidly drives T cell exhaustion / N. E. Scharping, D. B. Rivadeneira, A. V. Menk [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2021. – V. 22. – № 2. – P. 205–215.

358. Schiaffino, S. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy / S. Schiaffino, K. A. Dyar, S. Ciciliot [et al.] // *FEBS J.* – 2013. – V. 280. – № 17. – P. 4294–314.

359. Schnittman, S.M. Preferential infection of CD4+ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals / S. M. Schnittman, H. C. Lane, J. Greenhouse [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1990. – V. 87. – № 16. – P. 6058–62.

360. Schurich, A. Distinct Metabolic Requirements of Exhausted and Functional Virus-Specific CD8 T Cells in the Same Host / A. Schurich, L. J. Pallett, D. Jajbhay [et al.] // *Cell Rep.* – 2016. – V. 16. – № 5. – P. 1243–1252.

361. Serrano-Villar, S. HIV-infected individuals with low CD4/CD8 ratio despite effective antiretroviral therapy exhibit altered T cell subsets, heightened CD8+ T cell activation, and increased risk of non-AIDS morbidity and mortality / S. Serrano-Villar, T. Sainz, S. A. Lee [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2014. – V. 10. – № 5. – P. e1004078.

362. Shete, A. Incomplete functional T-cell reconstitution in immunological non-responders at one year after initiation of antiretroviral therapy possibly predisposes

them to infectious diseases / A. Shete, S. Dhayarkar, S. Sangale [et al.] // *Int. J. Infect. Dis.* – 2019. – V. 81. – P. 114–122.

363. Shive, C.L. Markers of T Cell Exhaustion and Senescence and Their Relationship to Plasma TGF- β Levels in Treated HIV+ Immune Non-responders / C. L. Shive, M. L. Freeman, S.-A. Younes [et al.] // *Front. Immunol.* – 2021. – V. 12. – P. 638010.

364. Silvestri, G. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia / G. Silvestri, D. L. Sodora, R. A. Koup [et al.] // *Immunity* – 2003. – V. 18. – № 3. – P. 441–52.

365. Skaper, S.D. The influence of ammonia on purine and pyrimidine nucleotide biosynthesis in rat liver and brain in vitro / S. D. Skaper, W. E. O'Brien, I. A. Schafer // *Biochem. J.* – 1978. – V. 172. – № 3. – P. 457–64.

366. Smurzynski, M. Relationship between CD4+ T-cell counts/HIV-1 RNA plasma viral load and AIDS-defining events among persons followed in the ACTG longitudinal linked randomized trials study / M. Smurzynski, K. Wu, C. A. Benson [et al.] // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 2010. – V. 55. – № 1. – P. 117–27.

367. Sölder, B.M. HIV and HIV-infected cells differentially activate the human complement system independent of antibody / B. M. Sölder, T. F. Schulz, P. Hengster [et al.] // *Immunol. Lett.* – 1989. – V. 22. – № 2. – P. 135–45.

368. Sullivan, Z.A. Latent and Active Tuberculosis Infection Increase Immune Activation in Individuals Co-Infected with HIV / Z. A. Sullivan, E. B. Wong, T. Ndung'u [et al.] // *EBioMedicine* – 2015. – V. 2. – № 4. – P. 334–340.

369. Swain, S.L. Generation and in vivo persistence of polarized Th1 and Th2 memory cells / S. L. Swain // *Immunity* – 1994. – V. 1. – № 7. – P. 543–52.

370. Teng, X. Epithelial homeostasis: Cell size shapes cell fate / X. Teng, Y. Toyama // *Curr. Biol.* – 2023. – V. 33. – № 22. – P. R1205–R1207.

371. Tong, X. The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells / X. Tong, F. Zhao, C. B. Thompson // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2009. – V. 19. – № 1. – P. 32–7.

372. Trentham, D.R. Rate-determining processes and the number of simultaneously active sites of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase / D. R. Trentham // *Biochem. J.* – 1971. – V. 122. – № 1. – P. 71–7.

373. Tretter, L. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress / L. Tretter, V. Adam-Vizi // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2005. – V. 360. – № 1464. – P. 2335–45.

374. Tsygankova, A.E. Previously Diagnosed HIV Infection in Patients with COVID-19 and Advanced HIV Disease Improves Their Survival / A. E. Tsygankova, A. N. Gerasimov, V. P. Chulanov [et al.] // *Arch. Clin. Infect. Dis.* – 2023. – V. 18. – № 5.

375. Tudesq, J.-J. Microbial translocation is correlated with HIV evolution in HIV-HCV co-infected patients / J.-J. Tudesq, C. Dunyach-Remy, C. Combescure [et al.] // *PLoS One* – 2017. – V. 12. – № 9. – P. e0183372.

376. Tuskorn, O. Mitochondrial division inhibitor-1 potentiates cisplatin-induced apoptosis via the mitochondrial death pathway in cholangiocarcinoma cells / O. Tuskorn, T. Khunluck, A. Prawan [et al.] // *Biomed. Pharmacother.* – 2019. – V. 111. – P. 109–118.

377. UNAIDS Global HIV Statistics Fact sheet 2021, preliminary epidemiological estimates / UNAIDS // *Fact Sheet 2021 – 2021.*

378. UNAIDS Fact Sheet 2023, Global Statistics / UNAIDS // *Fact Sheet 2023 – 2023.*

379. Unutmaz, D. Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes / D. Unutmaz, V. N. KewalRamani, S. Marmon [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1999. – V. 189. – № 11. – P. 1735–46.

380. Valdez, H. Changing spectrum of mortality due to human immunodeficiency virus: analysis of 260 deaths during 1995--1999 / H. Valdez, T. K. Chowdhry, R. Asaad [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2001. – V. 32. – № 10. – P. 1487–93.

381. Valiathan, R. Increase in frequencies of circulating Th-17 cells correlates with microbial translocation, immune activation and exhaustion in HIV-1 infected

patients with poor CD4 T-cell reconstitution / R. Valiathan, D. Asthana // *Immunobiology* – 2016. – V. 221. – № 5. – P. 670–8.

382. Valle-Casuso, J.C. Cellular Metabolism Is a Major Determinant of HIV-1 Reservoir Seeding in CD4+ T Cells and Offers an Opportunity to Tackle Infection / J. C. Valle-Casuso, M. Angin, S. Volant [et al.] // *Cell Metab.* – 2019. – V. 29. – № 3. – P. 611-626.e5.

383. Vardhana, S.A. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation limits the self-renewal of T cells exposed to persistent antigen / S. A. Vardhana, M. A. Hwee, M. Berisa [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2020. – V. 21. – № 9. – P. 1022–1033.

384. Veazey, R.S. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection / R. S. Veazey, M. DeMaria, L. V. Chalifoux [et al.] // *Science* – 1998. – V. 280. – № 5362. – P. 427–31.

385. Veen, J.N. van der The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease / J. N. van der Veen, J. P. Kennelly, S. Wan [et al.] // *Biochim. Biophys. acta. Biomembr.* – 2017. – V. 1859. – № 9 Pt B. – P. 1558–1572.

386. Vega, R.B. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes / R. B. Vega, J. M. Huss, D. P. Kelly // *Mol. Cell. Biol.* – 2000. – V. 20. – № 5. – P. 1868–76.

387. Velardi, E. T cell regeneration after immunological injury / E. Velardi, J. J. Tsai, M. R. M. van den Brink // *Nat. Rev. Immunol.* – 2021. – V. 21. – № 5. – P. 277–291.

388. Visekruna, A. Intestinal development and homeostasis require activation and apoptosis of diet-reactive T cells / A. Visekruna, S. Hartmann, Y. R. Sillke [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2019. – V. 129. – № 5. – P. 1972–1983.

389. Wallet, M.A. Microbial translocation induces persistent macrophage activation unrelated to HIV-1 levels or T-cell activation following therapy / M. A. Wallet, C. A. Rodriguez, L. Yin [et al.] // *AIDS* – 2010. – V. 24. – № 9. – P. 1281–90.

390. Wang, R. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation / R. Wang, C. P. Dillon, L. Z. Shi [et al.] // *Immunity* – 2011. – V. 35. – № 6. – P. 871–82.
391. Wang, R. Metabolic checkpoints in activated T cells / R. Wang, D. R. Green // *Nat. Immunol.* – 2012. – V. 13. – № 10. – P. 907–15.
392. Wang, S. Modeling the Slow CD4+ T Cell Decline in HIV-Infected Individuals / S. Wang, P. Hottz, M. Schechter [et al.] // *PLoS Comput. Biol.* – 2015. – V. 11. – № 12. – P. e1004665.
393. Wang, X. Distinct expression patterns of CD69 in mucosal and systemic lymphoid tissues in primary SIV infection of rhesus macaques / X. Wang, H. Xu, X. Alvarez [et al.] // *PLoS One* – 2011. – V. 6. – № 11. – P. e27207.
394. Warburg, O. Metabolism of leukocytes / O. Warburg, K. Gawehn, A. W. Geissler // *Zeitschrift für Naturforschung. Tl. B, Chemie, Biochem. Biophys. Biol. und verwandte Gebiete* – 1958. – V. 13B. – № 8. – P. 515–516.
395. Watanabe, H. P-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase / H. Watanabe, Y. Miyamoto, D. Honda [et al.] // *Kidney Int.* – 2013.
396. Waters, L. Late HIV presentation: epidemiology, clinical implications and management / L. Waters, C. A. Sabin // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* – 2011. – V. 9. – № 10. – P. 877–89.
397. Watson, J.A. Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. Fatty acid synthesis by a combination of cytoplasm and mitochondria / J. A. Watson, J. M. Lowenstein // *J. Biol. Chem.* – 1970. – V. 245. – № 22. – P. 5993–6002.
398. Wendland, T. HAART in HIV-infected patients: restoration of antigen-specific CD4 T-cell responses in vitro is correlated with CD4 memory T-cell reconstitution, whereas improvement in delayed type hypersensitivity is related to a decrease in viraemia / T. Wendland, H. Furrer, P. L. Vernazza [et al.] // *AIDS* – 1999. – V. 13. – № 14. – P. 1857–62.

399. Westendorp, M.O. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120 / M. O. Westendorp, R. Frank, C. Ochsenbauer [et al.] // *Nature* – 1995. – V. 375. – № 6531. – P. 497–500.

400. Wherry, E.J. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion / E. J. Wherry, M. Kurachi // *Nat. Rev. Immunol.* – 2015. – V. 15. – № 8. – P. 486–99.

401. Whitmire, J.K. Tentative T cells: memory cells are quick to respond, but slow to divide / J. K. Whitmire, B. Eam, J. L. Whitton // *PLoS Pathog.* – 2008. – V. 4. – № 4. – P. e1000041.

402. Williamson, J.R. Inhibition of glycolysis by pyruvate in relation to the accumulation of citric acid cycle intermediates in the perfused rat heart / J. R. Williamson, E. A. Jones // *Nature* – 1964. – V. 203. – P. 1171–3.

403. Wu, Z. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1 / Z. Wu, P. Puigserver, U. Andersson [et al.] // *Cell* – 1999. – V. 98. – № 1. – P. 115–24.

404. Xie, N. NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential / N. Xie, L. Zhang, W. Gao [et al.] // *Signal Transduct. Target. Ther.* – 2020. – V. 5. – № 1. – P. 227.

405. Yanes, R.E. Metabolic reprogramming in memory CD4 T cell responses of old adults / R. E. Yanes, H. Zhang, Y. Shen [et al.] // *Clin. Immunol.* – 2019. – V. 207. – P. 58–67.

406. Yang, X. Incomplete immune reconstitution in HIV/AIDS patients on antiretroviral therapy: Challenges of immunological non-responders / X. Yang, B. Su, X. Zhang [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2020. – V. 107. – № 4. – P. 597–612.

407. Yang, Z. Phosphofructokinase deficiency impairs ATP generation, autophagy, and redox balance in rheumatoid arthritis T cells / Z. Yang, H. Fujii, S. V. Mohan [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2013. – V. 210. – № 10. – P. 2119–34.

408. Yao, C.-H. Exogenous Fatty Acids Are the Preferred Source of Membrane Lipids in Proliferating Fibroblasts / C.-H. Yao, R. Fowle-Grider, N. G. Mahieu [et al.] // *Cell Chem. Biol.* – 2016. – V. 23. – № 4. – P. 483–93.

409. Yao, C.-H. Mitochondrial fusion supports increased oxidative phosphorylation during cell proliferation / C.-H. Yao, R. Wang, Y. Wang [et al.] // *Elife* – 2019. – V. 8. – P. e41351.
410. Yen, A. Arrested states produced by isoleucine deprivation and their relationship to the low serum produced arrested state in Swiss 3T3 cells / A. Yen, A. B. Pardee // *Exp. Cell Res.* – 1978. – V. 114. – № 2. – P. 389–95.
411. Younes, S.-A. Cycling CD4+ T cells in HIV-infected immune nonresponders have mitochondrial dysfunction / S.-A. Younes, A. Talla, S. Pereira Ribeiro [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2018. – V. 128. – № 11. – P. 5083–5094.
412. Young, V.R. Glutamine: the emperor or his clothes? / V. R. Young, A. M. Ajami // *J. Nutr.* – 2001. – V. 131. – № 9 Suppl. – P. 2449S–59S; discussion 2486S–7S.
413. Youssefian, T. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation / T. Youssefian, A. Drouin, J.-M. Massé [et al.] // *Blood* – 2002. – V. 99. – № 11. – P. 4021–9.
414. Yu, F. Distinct Mitochondrial Disturbance in CD4+T and CD8+T Cells From HIV-Infected Patients / F. Yu, Y. Hao, H. Zhao [et al.] // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 2017. – V. 74. – № 2. – P. 206–212.
415. Zanoni, B.C. Update on opportunistic infections in the era of effective antiretroviral therapy / B. C. Zanoni, R. T. Gandhi // *Infect. Dis. Clin. North Am.* – 2014. – V. 28. – № 3. – P. 501–18.
416. Zeng, M. Lymphoid tissue structure and HIV-1 infection: life or death for T cells / M. Zeng, A. T. Haase, T. W. Schacker // *Trends Immunol.* – 2012. – V. 33. – № 6. – P. 306–14.
417. Zeng, M. Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections / M. Zeng, A. J. Smith, S. W. Wietgreffe [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2011. – V. 121. – № 3. – P. 998–1008.
418. Zhao, J. Mitochondrial Functions Are Compromised in CD4 T Cells From ART-Controlled PLHIV / J. Zhao, M. Schank, L. Wang [et al.] // *Front. Immunol.* – 2021. – V. 12. – P. 658420.

419. Zheng, Y.-H. Nef increases the synthesis of and transports cholesterol to lipid rafts and HIV-1 progeny virions / Y.-H. Zheng, A. Plemenitas, C. J. Fielding [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2003. – V. 100. – № 14. – P. 8460–5.

420. Zhong, D. HIV protease inhibitor ritonavir induces cytotoxicity of human endothelial cells / D. Zhong, X. Lu, B. S. Conklin [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2002. – V. 22. – № 10. – P. 1560–6.

421. Zhu, J. CD4 T cells: fates, functions, and faults / J. Zhu, W. E. Paul // *Blood* – 2008. – V. 112. – № 5. – P. 1557–69.

422. Ziegler, T.R. Detectable serum flagellin and lipopolysaccharide and upregulated anti-flagellin and lipopolysaccharide immunoglobulins in human short bowel syndrome / T. R. Ziegler, M. Luo, C. F. Estívariz [et al.] // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2008. – V. 294. – № 2. – P. R402-10.

423. Sinclair, L. V Single Cell Glucose Uptake Assays: A Cautionary Tale / L. V Sinclair, C. Barthelemy, D. A. Cantrell // *Immunometabolism* – 2020. – V. 2. – № 4. – P. e200029.