

## АРКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

О.В. Зубаткина, Л.К. Добродеева, С.Д. Круглов

**ИЗМЕНЕНИЕ ИММУННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И УРОВНЯ АТФ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У СЕВЕРЯН ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ ХОЛОДОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ**

DOI 10.25789/УМЖ.2020.72.22

УДК 612.014.43: 612.112.94

С целью установления характера иммунного реагирования на кратковременное холодное воздействие с учетом уровня АТФ в лимфоцитах периферической крови у практически здоровых северян были обследованы жители г. Архангельска обоего пола, средний возраст которых составил 35 (8,7) лет.

Для одной группы обследуемых с изначально более высоким уровнем АТФ в лимфоцитах ответ на гипотермию охарактеризовался снижением концентрации АТФ при неизменяющемся общем количестве лимфоцитов и снижением преимущественно фенотипа CD16+ клеток-киллеров. Реакция другой группы проявилась ростом концентрации АТФ при уменьшении числа лимфоцитов и выраженным снижением CD4+ клеток-хелперов и CD71+ клеток с рецептором к трансферрину. Также в первой группе повысилось содержание провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  и IL-6, в то время как во второй группе наблюдалось снижение уровня лимфоцитактивирующего цитокина IL-1 $\beta$ .

**Ключевые слова:** гипотермия, адаптация, Т-клетки, механизмы сигналинга, АТФ.

**Summary.** The immune system constantly responds to various environmental stimuli. The aim of the study was to investigate immune effects of short-term cold exposure taking into account ATP level in peripheral blood lymphocytes in healthy residents of the North. So, the total number of lymphocytes and their phenotypes, as well as the content of cytokines and the concentration of ATP in the lymphocytes were determined in 38 volunteers twice (before and after their short-term stay for 5 minutes in a cold chamber at  $t = -25^{\circ}\text{C}$ ). Cluster analysis revealed two statistically different groups. The first group with an initially higher ATP level in lymphocytes responded to hypothermia by lower ATP concentration with the unchanging total number of lymphocytes as well as by a decrease in predominantly CD16+ killer-cells. The other group reacted by an increase in ATP concentration with a decrease in the number of lymphocytes and by a pronounced decrease in CD4+ helper-cells and in CD71+ cells with a transferrin receptor. Also, the proinflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL-6 increased in the first group, while the second group showed a decrease in the level of lymphocyte-activating cytokine IL-1 $\beta$ . It can be assumed that the response to hypothermia in the first group is provided through the CIRP-NF $\kappa$ B-TNF $\alpha$  axis and leads to an increase in the risk of non-infectious inflammation. For the second group, a protective mechanism is triggered to restrain lymphocyte activity and the development of T-cell-mediated inflammation through regulation by means of T-effector and T-regulatory cells AMPK balance, autophagy, mitophagy and mitochondrial biogenesis. The study of the immune response to hypothermia is important for understanding the cellular mechanisms of adaptation as well as for the search of targets to correct the immune response.

**Keywords:** hypothermia, adaptation, T-cells, signaling mechanisms, ATP.

**Введение.** Ключевым звеном адаптивного процесса является быстрое включение переходных краткосрочных реакций, которые участвуют в корректровке гомеостаза, необходимой организму, чтобы приспособиться к меняющимся условиям среды [10]. Иммунная система оказывает значительное влияние на успешность адаптации организма к факторам среды, и ответные реакции системы иммунитета на неиммунологические стимулы продолжают всесторонне изучаться. Метаболизм лимфоцитов обладает достаточной пластичностью для обеспечения энергетических и синтетиче-

ских потребностей Т-клеток, которые меняются в зависимости от их состояния и функции. Центральную роль в этом играют ключевые внутриклеточные регуляторы метаболизма, одним из них является АМФ-активируемая протеинкиназа (AMP-activated protein kinase, AMPK) – энергетический сенсор клетки. AMPK участвует в сохранении энергетического баланса клеток, активируя метаболические пути продукции АТФ с участием окислительного фосфорилирования (OXPHOS) и подавляя энергозатратные биосинтетические процессы [7], стимулирует аутофагию через положительную регуляцию ULK1 (unc-51-like autophagy-activating kinase 1) и комплексов инициации и формирования аутофагосом [2], способствует митофагии, запуская путем активации фактора MFF (mitochondrial fission factor) процесс митохондриального сортирования [11]. Важную роль в метаболических перестройках Т-клеток играют высокочувствительные к изменениям во внешней среде рецепторы семейства TRP (transient receptor potential) [3], которые помимо своей ион-каналь-

ной функции способствуют, в частности TRPV3,4 и TRPM8, активации стимулируемых холодом белков CIPs (cold-inducible proteins), оказывающих протекторное действие на клетки при холодом, гипоксическом и других видах стресса [8]. Исследование иммунных реакций на холодное воздействие важно для понимания механизмов адаптации к условиям Севера и разработки путей повышения сопротивляемости организма к низким температурам.

**Целью** исследования явилось установление характера иммунного реагирования на кратковременное холодное воздействие с учетом уровня АТФ в лимфоцитах периферической крови у практически здоровых северян.

**Материалы и методы исследования.** Были обследованы 38 волонтеров - жителей г. Архангельска обоего пола, средний возраст которых составил 35 (8,7) лет. Все волонтеры дали свое согласие на участие и были проинформированы о ходе исследования в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной

Институт физиологии природных адаптаций ФГБУН ФИЦ комплексного изучения Арктики им. акад. Н.П. Лаверова УрО РАН: **ЗУБАТКИНА Ольга Владимировна** – д.б.н., проф., с.н.с., ozbiochem@gmail.com. SPIN 1581-5178; ORCID 0000-0002-5039-2220, **ДОБРОДЕЕВА Лилия Константиновна** – д.м.н., проф., гл.н.с., директор Института, SPIN 4518-6925; ORCID 0000-0001-5080-6502, **КРУГЛОВ Сергей Дмитриевич** – аспирант, stees67@yandex.ru. SPIN 2532-9912; ORCID 0000-0002-4085-409X.

медицинской ассоциации об этических принципах проведения медицинских исследований (2000).

У волонтеров дважды забиралась венозная кровь для исследования (до и после их кратковременного нахождения в течение 5 мин при  $t = -25^{\circ}\text{C}$  в холодильной камере). Определялись общее количество лимфоцитов и их отдельные фенотипы, содержание цитокинов, измерялась концентрация аденозинтрифосфата (АТФ) в лимфоцитах.

Комплекс иммунологического исследования включал выделение лимфоцитарной фракции крови с последующим определением фенотипов лимфоцитов периферической крови (CD3+, CD4+, CD8+, CD10+, CD16+, CD71+, CD23+, CD25+, CD95+, HLA DR) методом непрямой иммунопероксидазной реакции (реактивы ООО «Сорбент», Россия). Содержание цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10) в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа на автоматическом анализаторе «Evolis» фирмы «Bio-RAD» (Германия). Концентрацию АТФ в лимфоцитах измеряли с помощью люминометра и набора реагентов ООО «Люмтек» (Россия) методом биолюминесценции с использованием люциферин-люциферазной реакции.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась в программе «Statistica 10.0» («StatSoft»,

США). В модуле Многомерный разведочный анализ проводилась кластеризация данных методом К средних. В модуле Описательные статистики вычислялись средние значения (M), стандартное отклонение (SD), для проверки данных на нормальность распределения использовались критерии нормальности Колмогорова-Смирнова и Лиллиефорса. При распределении значений, близких к нормальному, для сравнения результатов выборок вычислялся Т-критерий Стьюдента, различия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Проведенный статистический анализ полученных данных с использованием описательной статистики и кластеризации методом «К средних» помог выделить две группы, статистически различающиеся по уровню АТФ в лимфоцитах и большинству определяемых показателей, содержание которых после холодого воздействия изменялось не однозначно (таблица).

Данные таблицы показывают, что после холодого воздействия в группе первого кластера уровень АТФ в лимфоцитах статистически значимо снизился, в то время как их общее количество в периферической крови не изменилось, при этом статистически значимо уменьшилось содержание клеток-хелперов (CD4+), клеток-киллеров (CD16+) и клеток с рецептором к IL-2

(CD25+), содержание остальных определяемых фенотипов осталось на том же уровне. В группе второго кластера концентрация АТФ после холодого воздействия, наоборот, увеличилась на фоне статистически значимого снижения как общего числа лимфоцитов, так и всех определяемых фенотипов. Направленность изменений общего количества лимфоцитов и уровня АТФ в лимфоцитах при холодого воздействии на организм представлена на комбинированной диаграмме (рис. 1).

В цитокиновом профиле плазмы у первой группы фоновое содержание про-воспалительных цитокинов IL-6 и TNF- $\alpha$  статистически значимо возросло относительно их значений до холодого воздействия, во второй группе снизилась концентрации лимфоцитарного фактора IL-1 $\beta$ , а уровень других цитокинов не изменился.

Расчет относительного содержания фенотипов лимфоцитов внутри групп показал, что для большинства их доля в группах была равнозначной, однако в группе первого кластера, по сравнению с группой второго кластера, удельный вес CD16+ клеток и CD25+ клеток был выше на 4,6 и 2,4% соответственно, а клеток CD71+ с рецептором к трансферрину – ниже на 2,5%. После холодого воздействия произошли изменения в составе лимфоцитов, которые имели свои особенности для каждой группы. В первой группе наблюдалось

#### Изменение определяемых показателей в группах до и после холодого воздействия

Показатель	До холодого воздействия			После холодого воздействия			
	кластер1 (N=11)	кластер2 (N=27)	уровень знач. P	кластер1 (N=11)	уровень знач. P*	кластер2 (N=27)	уровень знач. P**
АТФ, мкмоль /10 <sup>6</sup> кл	3,81 (1,389)	0,77 (0,563)	0,00002	2,59 (1,415)	0,0272	1,58 (1,544)	0,0071
Лимф. $\times 10^6$ кл/мл	1,06 (0,344)	1,81 (0,780)	0,0002	0,94 (0,260)	0,187	1,34 (0,503)	0,0087
CD4 $\times 10^6$ кл/мл	0,21 (0,085)	0,34 (0,176)	0,0052	0,15 (0,080)	0,0436	0,10 (0,087)	0,0002
CD8 $\times 10^6$ кл/мл	0,20 (0,102)	0,31 (0,149)	0,0095	0,15 (0,077)	0,119	0,17 (0,073)	0,0001
CD10 $\times 10^6$ кл/мл	0,20 (0,067)	0,32 (0,123)	0,0008	0,15 (0,089)	0,094	0,20 (0,093)	0,0004
CD95 $\times 10^6$ кл/мл	0,15 (0,058)	0,27 (0,103)	0,0007	0,12 (0,051)	0,142	0,17 (0,083)	0,0011
CD16 $\times 10^6$ кл/мл	0,23 (0,105)	0,31 (0,144)	0,058	0,15 (0,065)	0,0257	0,19 (0,093)	0,0008
CD23 $\times 10^6$ кл/мл	0,18 (0,058)	0,32 (0,131)	0,0004	0,17 (0,113)	0,372	0,22 (0,107)	0,0069
CD25 $\times 10^6$ кл/мл	0,20 (0,061)	0,30 (0,142)	0,0072	0,15 (0,061)	0,0415	0,21 (0,104)	0,0143
CD71 $\times 10^6$ кл/мл	0,19 (0,058)	0,37 (0,163)	0,00002	0,15 (0,072)	0,083	0,21 (0,091)	0,00003
HLA DR $\times 10^6$ кл/мл	0,21 (0,081)	0,32 (0,153)	0,0073	0,18 (0,093)	0,267	0,23 (0,114)	0,0205
IL-1 $\beta$ пг/мл	5,34 (0,497)	5,88 (0,876)	0,0250	5,36 (0,303)	0,454	5,40 (0,713)	0,0163
IL-6 пг/мл	0,57 (0,416)	1,18 (0,877)	0,0081	1,41 (0,563)	0,0005	1,28 (1,141)	0,365
IL-10 пг/мл	3,04 (1,549)	4,20 (3,159)	0,139	2,90 (2,128)	0,434	3,57 (2,852)	0,225
TNF- $\alpha$ пг/мл	1,20 (0,867)	2,11 (1,544)	0,0398	2,18 (1,209)	0,0287	2,49 (2,535)	0,279

Примечание. Относительно значений до холодого воздействия \*- кластера 1; \*\*- кластера 2.

преимущественное снижение удельного веса CD16+ клеток-киллеров, CD4+ клеток-хелперов и активированных CD25+ клеток с рецептором к IL-2 – на 5,8, 3,9 и 3% соответственно (рис. 2). Во второй группе значительно (на 11,2%) снизилась доля CD4+ клеток, удельный вес цитотоксических клеток CD8+ и клеток CD71+ с рецептором к трансферрину стал меньше на 4,4 и 4,7% соответственно (рис.2). Для других типов клеток различия были меньшими как внутри каждой из групп, так и между группами.

**Обсуждение результатов.** Адаптивная реакция на холодное воздействие приводит к индукции так называемых белков холодового шока. Как только организм подвергается воздействию низких температур, эти специфические белки немедленно реагируют, чтобы обеспечить клеткам возможность быстро адаптироваться к

условиям среды. Одним из них является индуцируемый холодом РНК связывающий белок (cold-inducible RNA binding protein, CIRP), активность которого повышено регулируется при гипотермии и, кроме того, CIRP способствует целевой трансляции некоторых специфических мРНК [17]. Установлено, что в условиях низких температур, вне зависимости от глобального подавления экспрессии белковых молекул, транскрипция CIRP мРНК многократно повышается за счет собственной CIRP-опосредованной транскрипционной активации альтернативных промоторов. [1]. Усиленная экспрессия CIRP приводит к его накоплению в цитоплазме, где CIRP проявляет свое цитопротекторное действие: повышает через активацию MAPK/ERK1/2 пути и нуклеарного фактора NF- $\kappa$ B экспрессию анти-апоптических белков Bcl-2 и Bcl-x1 [5] и подавляет каспазный каскад че-

рез супрессию про-апоптических Вах и Bad факторов [9]. Кроме того, CIRP способствует активации антиоксидантной защиты, снижая негативный эффект активных форм кислорода, продукция которых повышается в условиях холодового стресса [16].

В то же время, попадая в циркуляцию путем лизосомальной секреции, CIRP во внеклеточной среде проявляет себя как ассоциированный с повреждениями молекулярный паттерн (Danger associated molecular pattern, DAMP), который, взаимодействуя с TLR4 рецепторами и приводя через стимуляцию NF- $\kappa$ B пути к выработке провоспалительных цитокинов, способен инициировать воспалительный ответ [4,16]. Полученные результаты показывают нарастание содержания провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$  и IL-6) в крови у волонтеров первой группы.

Лимфоциты нуждаются в определенном балансе продукции и расхода энергии, связанном с их текущим состоянием, дифференцировкой и функционированием. Обращают на себя внимание флуктуации относительного содержания фенотипов лимфоцитов в группах с разным фоновым уровнем АТФ и его изменением в ответ на холод. Так, в группе первого кластера, где исходный уровень АТФ лимфоцитов был высоким, наибольшим было снижение доли CD16+ клеток-киллеров при уменьшении концентрации АТФ в лимфоцитах, в то время как в группе второго кластера (с изначально низким уровнем АТФ) наблюдалось резкое снижение доли CD4+ клеток-хелперов при росте концентрации АТФ в лимфоцитах. АМПК играет важную роль в Т-клеточном метаболизме, оказывает влияние на Т-клеточное развитие и судьбу, проявляет и позитивный, и негативный эффекты в отношении роста, дифференцировки и функций Т-клеток [15]. Подавляя активность mTOR комплекса 1 и фермента ацетил-коэнзима карбоксилазы, АМПК ингибирует энергетические синтезы белков и жирных кислот, снижая рост и функционирование Т-эффекторных клеток [14]. С другой стороны, стимулируя процесс  $\beta$ -окисления жирных кислот и OXPHOS в CD4+ клетках, АМПК направляет клеточную дифференциацию от Th17 к Treg клеткам [6], оказывает влияние на Т-клеточно-опосредованное воспаление через изменение баланса Т-эффекторных и Т-регуляторных клеток [13]. Также АМПК стимулирует процессы аутофагии (через активацию ULK1) [2], митофагии (через индукцию митохондриального фактора MFF) [11], митохондриального биогенеза (через прямую и НАД<sup>+</sup>-опосредованную SIRT1 регуляцию митохондриального модулятора PGC-1 $\alpha$ ) [4], что способствует увеличению продукции АТФ в клетках. Повышение уровня АТФ в лимфоцитах наблюдалось во второй группе.

**Выводы.** Иммунное реагирование в ответ на действие низких температур проявляется количественными изменениями Т-клеток, их фенотипов, цитокинов и сопряжено с уровнем внутриклеточного АТФ. Полученные результаты показывают, что после холодового воздействия в группе, где был изначально более вы-

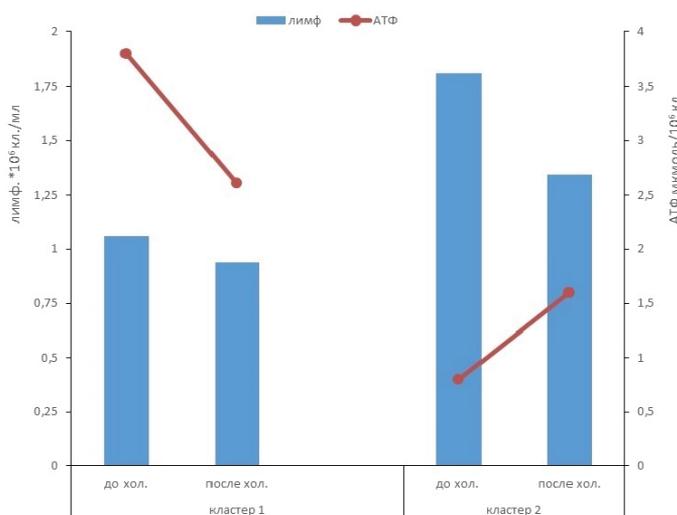


Рис. 1. Изменение количества лимфоцитов и уровня АТФ при холодном воздействии.

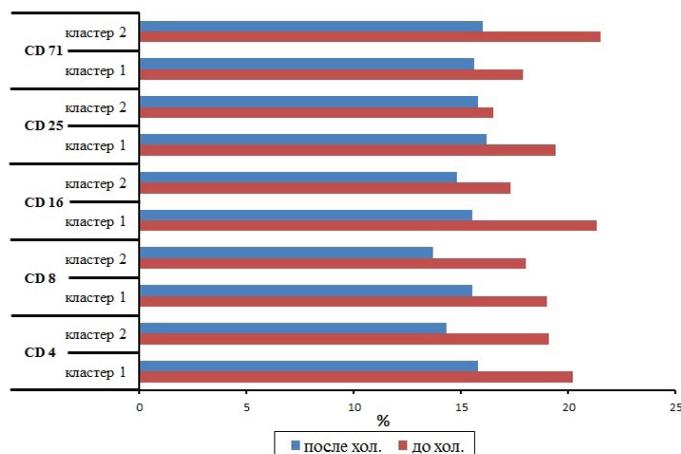


Рис. 2. Изменение удельного веса отдельных фенотипов лимфоцитов в группах кластеров.

сокий уровень АТФ, растет уровень про-воспалительных цитокинов (IL-6 и TNF- $\alpha$ ), снижается содержание преимущественно CD16+ клеток-киллеров, при этом концентрация АТФ в лимфоцитах уменьшается и не меняется общее количество лимфоцитов в периферической крови. В другой группе с более низкими значениями АТФ, уровень лимфоцитаактивирующего IL-1 $\beta$  падает, значительно снижается содержание CD4+ клеток-хелперов и активированных CD71+ клеток с рецептором к трансферрину, а концентрация АТФ в лимфоцитах увеличивается при уменьшении общего числа лимфоцитов в крови. Данные различия могут быть обусловлены вариантом реагирования, связанным с энергетическим статусом клеток, активностью метаболических путей и сигналами трансдукции. Можно предположить, что для первой группы действие холода приводит к продукции про-воспалительных цитокинов через ось TRP – CIRP – NF- $\kappa$ B – TNF- $\alpha$  и снижению уровня АТФ лимфоцитов. Для второй группы возможно срабатывание механизма сдерживания активности лимфоцитов и Т-клеточно-опосредованного воспаления через AMPK регуляцию, что проявляется повышением концентрации АТФ на фоне снижения общего количества лимфоцитов и их фенотипов.

Более детальное изучение Т-клеточного реагирования на действие низких температур поможет лучшему пониманию механизмов адаптации, установлению мишеней для прицельной коррекции возможных нарушений иммунитета у людей, проживающих в условиях Севера.

*Работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований по теме лаборатории экологической иммунологии ИФПА ФГБУН ФИЦКИА РАН «Влияние общего охлаждения на нейро-иммуно-эндокринную регуляцию гомеостаза человека» № государственной регистрации АААА-А17-117033010124-7.*

### Литература

1. Al-Fageeh M.B. Alternative promoters regulate cold inducible RNA-binding (CIRP) gene expression and enhance transgene expression in mammalian cells / M.B. Al-Fageeh, C.M. Smales // *Mol. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 54(2). – P. 238–249. DOI: 10.1007/s12033-013-9649-5.
2. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 / J. Kim, M. Kundu, B. Viollet, K.L. Guan // *Nat. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 13(2). – P. 132–141. DOI: 10.1038/ncb2152.
3. Bertin S. Transient Receptor Potential (TRP) channels in T cells / S. Bertin, E. Raz // *Semin. Immunopathol.* – 2016. – Vol. 38(3). – P. 309–319. DOI: 10.1007/s00281-015-0535-z.
4. Canto C. PGC-1 $\alpha$ , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure / C. Canto, J. Auwerx // *Curr. Opin. Lipidol.* – 2009. – Vol. 20(2). – P. 98–105. DOI: 10.1097/MOL.0b013e328328d0a4.
5. Combined inhibition of NF- $\kappa$ B and Bcl-2 triggers synergistic reduction of viability and induces apoptosis in melanoma cells / M. Watanabe, K. Umezawa, M. Higashihara [et al.] // *Oncol. Res. Featur. Preclin. Clin Cancer Therap.* – 2014. – Vol. 21(2). – P. 173–180. DOI: 10.3727/096504014X13887748696707.
6. 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. – Vol. 20(11). – P. 1327–1333. DOI: 10.1038/nm.3704
7. Garcia D. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance / D. Garcia, J.S. Reuben // *Molecular Cell.* – 2017. – Vol. 66(6). – P. 789–799. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.05.032.
8. Involvement of TRPV3 and TRPM8 ion channel proteins in induction of mammalian cold-inducible proteins / T. Fujita, Y. Liu, H. Higashitsuji [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 2016. – Vol. 495(1). – P. 935–940. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.136.
9. Kantari C. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria / C. Kantari, H. Walczak // *Biochim. Biophys. Acta. (BBA)-Mol. Cell. Res.* – 2011. – Vol. 1813(4). – P. 558–563. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.026.
10. Kelvin J. Adaptive homeostasis / J. Kelvin, A. Davies // *Mol. Aspects Med.* – Vol. 49(6). – P. 1–7. DOI: 10.1016/j.mam.2016.04.007.
11. Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress / E.Q. Toyama, S. Herzig, J. Courchet [et al.] // *Science.* – 2016. – Vol. 351(6270). – P. 275 – 281. DOI: 10.1126/science.aab4138.
12. NF- $\kappa$ B-dependent role for cold-inducible RNA binding protein in regulating interleukin 1 $\beta$ . / C. Brochu, M.A. Cabrita, B.D. Melanson [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 141(11). – P. e57426. DOI: 10.1371/journal.pone.0057426.
13. O'Neill L.A. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation / L.A. O'Neill, D.G. Hardie // *Nature.* – 2013. – Vol. 493(7432). – P. 346–355. DOI: 10.1038/nature11862.
14. The energy sensor AMPK regulates T cell metabolic adaptation and effector responses in vivo / J. Blagih, F. Coulombe, E.E. Vincent [et al.] // *Immunity.* – 2015. – Vol. 42(1). – P. 41–54. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.12.030.
15. The role of AMPK in T cell metabolism and function / E.H. Ma, M.C. Poffenberger, A.H. Wong, R.G. Jones // *Current Opinion in Immunology* – 2017. – Vol. 46. – P. 45–52. DOI: 10.1016/j.coi.2017.04.004.
16. The role of cold-inducible RNA binding protein in cell stress response / Y. Liao, L. Tong, L. Tang, S. Wu // *Int. J. Cancer.* – 2017. – Vol. 141(11). – P. 2164–2173. DOI: 10.1002/ijc.30833.
17. Zhu X. Cold-inducible proteins CIRP and RBM3, a unique couple with activities far beyond the cold / X. Zhu, C. Buhner, S. Wellmann. // *Cellular and Molecular Life Sciences.* – 2016. – Vol. 73(20). – P. 3839–3859. DOI: 10.1007/s00018-016-2253-7.