

## НАРУШЕНИЕ ФУНКЦИИ CD4<sup>+</sup> Т-ЛИМФОЦИТОВ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ С ДИСКОРДАНТНЫМ ОТВЕТОМ НА АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ

© 2019 г. Л. Б. Королевская\*, Е. В. Сайдакова

\*E-mail: bioqueen@mail.ru

«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения  
Российской академии наук» – филиал ПФИЦ, Пермь, Россия

Поступила: 15.02.2019. Принята: 28.02.2019

Оценивали способность к пролиферации, синтезу ИЛ-2 и склонности к апоптозу CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов ВИЧ-инфицированных больных с дискордантным ответом на антиретровирусную терапию. Установлено снижение митотической активности и продукции ИЛ-2, усиление темпов гибели CD4<sup>+</sup> Т-клеток периферической крови. Выявленные нарушения могут быть причиной неэффективного восстановления численности CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у больных с дискордантным ответом на лечение.

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты, антиретровирусная терапия, дискордантный ответ, пролиферация, ИЛ-2, апоптоз

DOI: 10.31857/S102872210006617-3

**Адрес:** 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ, лаборатория экологической иммунологии, Королевская Лариса Борисовна. Тел.: 8 (342) 280 83 34

**E-mail:** bioqueen@mail.ru

**Авторы:**

**Королевская Л. Б.**, к.м.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ, Пермь, Россия;

**Сайдакова Е. В.**, к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ, Пермь, Россия.

Назначение антиретровирусной терапии (АРТ) ВИЧ-инфицированным пациентам приводит к подавлению репликации вируса и увеличению численности периферических CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (стандартная реакция на лечение) [1]. Однако у 20–30% больных, получающих терапию, развивается дискордантный ответ, определяемый как отсутствие прироста CD4<sup>+</sup> Т-клеток крови при эффективном подавлении вирусной нагрузки [2]. Причины его развития остаются малоизвестными.

**Целью** данной работы было исследование функциональной способности CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и их склонности к апоптозу у ВИЧ-инфицированных пациентов с дискордантным ответом на АРТ.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основную исследуемую группу составили 19 ВИЧ-инфицированных пациентов с числом CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в крови <350/мкл (иммунологические неответчики, ИН). В группы сравнения вошли 19 ВИЧ-позитивных больных с числом CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в крови >350/мкл (иммунологические ответчики, ИО) и 19 неинфицированных добровольцев (К). Каждый субъект подписал информированное согласие на участие в исследовании. Венозную кровь забирали в пробирки, содержащие гепарин или ЭДТА. Концентрацию ВИЧ в плазме крови определяли набором «Versant 3 HIV-1 RNA 3,0 assay b» на анализаторе Versant 440 (Siemens). Численность CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии (FACSCalibur, Becton Dickinson, набор «Immunocytometry Systems Simultest™»).

Часть выделенных из венозной крови в градиенте плотности диаколла (1,077, Диа-М) мононуклеарных клеток использовали для оценки апоптоза (набор «Annexin V-FITC/7-AAD», Beckman Coulter) методом проточной цитометрии. Из оставшейся части клеток выделяли Т-лимфоциты (набор «Dynabeads™ Untouched™ Human T cells», Invitrogen). Пролиферацию CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, индуцированную магнитными частицами Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 (Gibco), оценивали методом проточной цитометрии по разбавлению CFSE (BioLegend) после культивирования (5% CO<sub>2</sub>, 37 °С, 5 суток). Контролем служили нестимулированные клетки. В супернатантах культур определяли концентрацию ИЛ-2 (набор «Интерлейкин-2-ИФА-БЕСТ»). Полученные данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов, либо средних величин и 95% доверительных интервалов. При отсутствии нормального распределения расчеты выполняли с логарифмированными величинами. Достоверность различий определяли с помощью критерия Манна-Уитни или t-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вирусная нагрузка ВИЧ у всех обследованных пациентов была подавлена (<50 копий/мл), что доказывает вирусологическую эффективность АРТ. Относительное и абсолютное количество CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у ВИЧ-позитивных больных обеих групп было снижено по сравнению с неинфицированными людьми (P<0,001). В соответствии с критериями отбора дефицит CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов был более выраженным у ИН. Абсолютное число клеток у ИО и ИН, соответственно, составило и 534 мкл<sup>-1</sup> (438–656 мкл<sup>-1</sup>) и 270 мкл<sup>-1</sup> (208–303 мкл<sup>-1</sup>; P<0,001).

Оценка митотической активности показала, что после стимуляции Т-лимфоциты всех обследованных субъектов были способны к генерации дочерних популяций. Относительное количество CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>dim</sup> Т-клеток в группах К и ИО, соответственно, составило 77,9% (73,0–87,7%) и 73,5% (58,1–82,8%). Процент делящихся клеток у ИН был ниже и оказался равным 65,4% (52,3–76,0%; P<0,05 по сравнению с К). При этом у ИН доля лимфоцитов, не вступивших в деление, почти в 2 раза превышала соответствующие значения, установленные в группах сравнения. Таким образом, стимулированные в условиях *in vitro* CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты ВИЧ-за-

раженных больных с дискордантным ответом на АРТ показывают нарушение митотической активности по сравнению с пролиферативной способностью клеток неинфицированных людей и ВИЧ-позитивных пациентов со стандартной реакцией на лечение. Важным ростовым фактором делящихся Т-лимфоцитов является продуцируемый ими ИЛ-2. Концентрация данного цитокина в супернатантах нестимулированных клеточных культур здоровых людей составила 15,3 пг/мл (ln=2,7308±0,4710). В аналогичных пробах ИН и ИО, уровень ИЛ-2 был ниже: 5,5 пг/мл (ln=1,6999±0,2776) и 3,0 пг/мл (ln=1,1039±0,2161; P<0,01 по сравнению с К) соответственно. Во всех стимулированных пробах было выявлено существенное увеличение содержания цитокина. Наиболее высокая концентрация была установлена в супернатантах здоровых лиц: 2982,4 пг/мл (ln=8,0005±0,2212). В пробах ИО и ИН, уровень ИЛ-2 был ниже и составил, соответственно, 1895,4 пг/мл (ln=7,5472±0,2335) и 1534,8 пг/мл (ln=7,3362±0,1805; P<0,01 по сравнению с К). Таким образом, установлено, что синтез ИЛ-2 стимулированными Т-лимфоцитами был наиболее низким у ВИЧ-зараженных больных с дискордантным ответом на АРТ. Ранее нами было показано, что CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты ИН после стимуляции *in vitro* делятся несимметрично [3]. Асимметрия при делении может приводить к смерти части потомков [4]. Исследование программной гибели клеток выявило, что доля спонтанно умирающих *ex vivo* CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у ИО и К, соответственно, оказалась равной 12,5% (10,9–20,7%) и 16,1% (11,8–21,0%). Уровень апоптотирующих элементов у ИН был существенно выше и составил 31,1% (19,5–35,2%; P<0,001). Это свидетельствует о том, что у ВИЧ-инфицированных пациентов с иммунологическим неответом на лечение по сравнению с больными со стандартной реакцией на АРТ и здоровыми людьми существенно увеличена доля умирающих клеток среди CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Таким образом, установлено, что CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты ВИЧ-позитивных пациентов с дискордантным ответом на АРТ характеризуются функциональными изменениями. Показано, что в условиях *in vitro* CD4<sup>+</sup> Т-клетки, полученные от ИН, демонстрируют нарушение митотической активности по сравнению с таковой у здоровых лиц и пациентов со стандартной реакцией на лечение. Кроме того, стимуляция *in vitro* Т-лимфоцитов, полученных от больных с дискордантным ответом, сопровож-

ждается сниженной по сравнению с клетками неинфицированных людей продукцией ИЛ-2. Хорошо известно, что этот цитокин вырабатывается Т-лимфоцитами в ответ на антигенную или митогенную стимуляцию и является необходимым ростовым фактором для их пролиферации и дифференцировки. По-видимому, при иммунологическом ответе, клетки сохраняют способность вырабатывать ИЛ-2, но количества продуцируемого цитокина, скорее всего, оказывается недостаточным для поддержания их продуктивного деления. Кроме того, обнаруженная нами ранее асимметрия деления CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у ИН [3] также может негативно влиять на продуктивность пролиферации, приводя к гибели части потомства [4]. Дополнительным подтверждением вышеизложенному могут быть представленные в настоящей работе и другими исследователями [5] данные об усилении уровня спонтанного апоптоза CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов периферической крови у ВИЧ-инфицированных больных с дискордантным ответом на АРТ.

Работа выполнена в рамках проекта № 18-7-3-4-6-59, поддержанного Комплексной программой Уральского отделения Российской академии наук, номер госрегистрации темы: АААА-А18-118030790046-9».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Autran B, Carcelain G., Li T.S., Blanc C., Renaud M., Durali M., Mathez D., Calvez V., Leibowitch J., Kattalma C., Debre P.* Restoration of immune system with anti-retroviral therapy. *Immunol. Lett.* 1999, 66, 207–211.
2. *Massanella M., Negredo E., Clotet B., Blanco J.* Immunodiscordant responses to HAART – mechanisms and consequences/ *Expert Rev/ Clin. Immunol.* 2013, 9, 1135–1149.
3. *Сайдакова Е. В., Шмагель К. В., Королевская Л. Б., Шмагель Н. Г., Гуляева Н. И., Фрейд Г. Г., Южанинова С. В., Черешнев В. А.* Пролиферация CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов при развитии дискордантного ответа иммунной системы на антиретровирусную терапию у ВИЧ-инфицированных больных. *Цитология*, 2018, 60(12), 1029–1036. [*E. V. Saidakova, K. V. Shmagel, L. B. Korolevskaya, N. G. Shmagel, N. I. Gulyaeva, G. G. Friend, S. V. Yuzhaninova, V. A. Chereshevnev.* CD4<sup>+</sup> T-cell cycling in HIV-infected patients with discordant immunologic response to the antiretroviral therapy. *Cytology*, 2018, 60(12), 1029–1036.]
4. *Bocharov G., Luzyanina T., Cupovic J., Ludewig B.* Asymmetry of cell division in CFSE-based lymphocyte proliferation analysis. *Front. Immunol.* 2013, 4, 264.
5. *Hansjee N., Kaufmann G. R., Strub C., Weber R., Battegay M., Erb P., and the Swiss HIV Cohort Study.* Persistent apoptosis in HIV-1-infected individuals receiving potent antiretroviral therapy is associated with poor recovery of CD4 T lymphocytes. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2004, 36, 671–677.

## CD4<sup>+</sup> T-LYMPHOCYTE FUNCTION IS VIOLATED IN HIV-INFECTED PATIENTS WITH DISCORDANT RESPONSE TO ANTIRETROVIRAL THERAPY

© 2019 L. B. Korolevskaya\*, E. V. Saidakova

\*E-mail: bioqueen@mail.ru

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia*

Received: 15.02.2019. Accepted: 28.02.2019

In HIV-infected patients with a discordant response to antiretroviral therapy, CD4<sup>+</sup> T-cell proliferative capacity, ability to synthesize IL-2, and resistance to apoptosis were assessed. It was shown that in those subjects, CD4<sup>+</sup> T-cells are characterized by a decreased mitotic activity and IL-2 production; and an increased rate of programmed death. Disorders found could be the basis for the ineffective CD4<sup>+</sup> T-cell counts restoration in patients with a discordant response to the treatment.

*Key words:* HIV infection, CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, antiretroviral therapy, discordant response, proliferation, interleukin-2, apoptosis

### Authors:

**Korolevskaya L. B.**, ✉ PhD, research scientist of the Laboratory of Ecological Immunology at the Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia. **E-mail:** bioqueen@mail.ru;

**Saidakova E. V.**, PhD, junior research scientist of the Laboratory of Ecological Immunology at the Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia.