

**ПРИЗНАКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ИСТОЩЕНИЯ CD4<sup>+</sup> И CD8<sup>+</sup> Т-  
КЛЕТОК У ВИЧ/ВГС КОИНФИЦИРОВАННЫХ  
ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НЕОТВЕТЧИКОВ НА  
АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ**

Сайдакова Е. В.<sup>1</sup>,  
Королевская Л. Б.<sup>1</sup>,  
Власова В. В.<sup>1</sup>,  
Шмагель Н. Г.<sup>1</sup>,  
Шмагель К. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»), Пермь, Россия.

**MARKERS OF CD4+ AND CD8+ T-CELL EXHAUSTION IN HIV/HCV  
COINFECTED IMMUNOLOGICAL NON-RESPONDERS TO  
ANTIRETROVIRAL THERAPY**

Saidakova E. V. <sup>a</sup>,

Korolevskaya L. B. <sup>a</sup>,

Vlasova V. V. <sup>a</sup>,

Shmagel N. G. <sup>a</sup>,

Shmagel K. V. <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia.

## Резюме

Коинфицирование вирусами иммунодефицита человека (ВИЧ) и гепатита С (ВГС) является фактором риска развития иммунологического неответа на антиретровирусную терапию. При иммунологическом неответе снижение вирусной нагрузки ВИЧ не сопровождается ростом числа CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, что увеличивает риски заболеваемости и смертности инфицированных лиц. Одним из механизмов препятствующих регенерации Т-лимфоцитов у иммунологических неответчиков может быть функциональное истощение этих клеток. Целью настоящего исследования было определение показателей функционального истощения CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков на антиретровирусную терапию. Обследованы три клинические группы: 1) ВИЧ/ВГС коинфицированные иммунологические неответчики (CD4<sup>+</sup> Т-клетки <350/мкл крови; n=9), ВИЧ/ВГС коинфицированные лица со стандартным ответом на терапию (CD4<sup>+</sup> Т-клетки >500/мкл крови; n=9), 3) относительно здоровые добровольцы без ВИЧ и ВГС инфекций (n=9). В эксперименте *ex vivo* методом многоцветной проточной цитометрии определено количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих ингибиторный рецептор PD-1. В эксперименте *in vitro* с культурами клеток, стимулированными фитогемагглютинином в течение 7 дней, методом многоцветной проточной цитометрии установлено количество гибнущих в процессе пролиферации (CFSElow ZombieUV+) CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. В супернатантах этих культур методом иммуноферментного анализа определено количество интерлейкина-2. Установлено, что у ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков относительно двух групп сравнения увеличено количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих PD-1 (фенотипический признак истощения). Также у ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков была увеличена доля гибнущих в процессе деления Т-клеток. Важно, что их количество было повышено среди CD4<sup>+</sup>, но не среди CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Аналогичным образом, снижение продукции интерлейкина-2 стимулированными Т-клетками было выявлено у ВИЧ/ВГС коинфицированных неответчиков в пуле CD4<sup>+</sup>, но не CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Таким образом, у ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты демонстрируют признаки фенотипического и функционального истощения, тогда как CD8<sup>+</sup> Т-клетки, хотя и экспрессируют ингибиторные рецепторы, не проявляют признаков функциональных нарушений. По-видимому, разработка специализированной терапии ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков должна быть сосредоточена на восстановлении функциональной активности CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

**Ключевые слова:** ВИЧ/ВГС коинфекция, антиретровирусная терапия, иммунологический неответ, Т-лимфоциты, истощение, PD-1, пролиферация, клеточная смерть, интерлекин-2.

## Abstract

Coinfection with human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis C virus (HCV) is a risk factor for immunological non-response to antiretroviral therapy. In cases of immunological non-response, HIV viral load suppression occurs without an increase in CD4<sup>+</sup> T-cell counts, heightening the risk of morbidity and mortality in infected individuals. T-cell exhaustion may hinder their regeneration in immunological non-responders. This study aimed to identify markers of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell exhaustion in HIV/HCV coinfecting immunological non-responders. The study examined three clinical groups: 1) HIV/HCV coinfecting immunological non-responders (CD4<sup>+</sup> T-cells <350/μl blood; n=9), 2) HIV/HCV coinfecting individuals with a standard response to therapy (CD4<sup>+</sup> T-cells >500/μl blood; n=9), and 3) relatively healthy volunteers without HIV and HCV infections (n=9). Ex vivo, the number of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells expressing the inhibitory receptor PD-1 was determined using multi-color flow cytometry. In the 7-day in vitro experiment, cell cultures were stimulated with phytohemagglutinin. The number of dying proliferated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells (CFSElowZombieUV<sup>+</sup>) was determined using multi-color flow cytometry. The amount of interleukin-2 in the culture supernatants was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay. It was found that in HIV/HCV coinfecting immunological non-responders, there was a higher number of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells expressing PD-1, a phenotypic marker of exhaustion, compared to the other two groups. Furthermore, the frequency of dying dividing T-cells was higher in immunological non-responders, with an increase in CD4<sup>+</sup> T-cells but not CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes. Similarly, a decrease in interleukin-2 production was found in stimulated T-cells of HIV/HCV coinfecting immunological non-responders in the CD4<sup>+</sup> T-cell pool, but not in CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes. Thus, in HIV/HCV coinfecting immunological non-responders, CD4<sup>+</sup> T-cells appear exhausted both phenotypically and functionally. While CD8<sup>+</sup> T-cells express inhibitory receptors, they do not show functional impairments. It appears that the specialized therapy for HIV/HCV coinfecting immunological non-responders should aim to improve CD4<sup>+</sup> T-cell function.

**Keywords:** HIV/HCV coinfection, antiretroviral therapy, immunological non-response, T-lymphocytes, exhaustion, PD-1, proliferation, cell death, interleukin-2.

## 1 Введение

У 10–40% ВИЧ-инфицированных больных, получающих антиретровирусную терапию (АРТ), снижение вирусной нагрузки ВИЧ не сопровождается приростом численности CD4+ Т-лимфоцитов [1]. У этих пациентов, известных как «иммунологические неответчики» (ИН), глубокая хроническая лимфопения увеличивает риск развития СПИД-ассоциированных заболеваний и госпитализации, приводит к ранней утрате трудоспособности и инвалидизации, грозит преждевременной смертью [2].

Причины нарушения регенерации CD4+ Т-клеток у получающих лечение ВИЧ-инфицированных лиц остаются не до конца понятными. Известно, что коинфекция вирусом гепатита С (ВГС) является значимым фактором риска развития этого феномена. Так, иммунологический неответ на АРТ встречается в 3,5 раза чаще у ВИЧ/ВГС коинфицированных больных, чем у пациентов без ВГС коинфекции [3].

Ранее мы показали, что у ВИЧ/ВГС коинфицированных субъектов пул периферических Т-лимфоцитов насыщен клетками, экспрессирующими ингибиторные рецепторы [4]. Их наличие на Т-лимфоцитах тесно связано с функциональным истощением [5]. Для истощенных Т-клеток характерна потеря способности к продукции цитокинов и пролиферации [6], что может объяснить низкую регенераторную способность лимфоцитов. Следует отметить, что у ВИЧ/ВГС коинфицированных больных фенотипические признаки истощения в виде экспрессии ингибиторных рецепторов на поверхности демонстрируют и CD4+, и CD8+ Т-клетки. Однако, в отличие от CD4+ Т-лимфоцитов, пул CD8+ Т-клеток увеличивается в размере на фоне коинфекции ВГС [7]. При иммунологическом неответе на АРТ количество CD8+ Т-лимфоцитов также не снижается [7]. Очевидно, что истощенный фенотип клеток не в полной мере отражает их функциональное состояние. Для понимания роли истощения в нарушении регенерации Т-клеток у ВИЧ/ВГС коинфицированных ИН необходимо исследовать не только фенотип Т-лимфоцитов, но и их способность к пролиферации и продукции цитокинов.

Целью настоящей работы было определение показателей функционального истощения CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов у ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков на АРТ.

Проведение исследования было одобрено этическим комитетом Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (рег. № комитета IRB00008964). Каждый участник подписал информированное согласие. Включенные в исследование пациенты соответствовали следующим требованиям: подтвержденные диагнозы ВИЧ и ВГС инфекций, приверженность АРТ в течение двух и более лет, вирусная нагрузка ВИЧ менее 250 копий/мл (предел чувствительности тест-систем), отсутствие лечения интерферонами или анти-ВГС препаратами прямого действия.

Были сформированы три клинические группы:

1) ВИЧ/ВГС коинфицированные иммунологические неответчики (ИН;  $n = 9$ ) с числом  $CD4^+$  Т-лимфоцитов менее 350/мкл крови;

2) ВИЧ/ВГС коинфицированные иммунологические ответчики (ИО;  $n = 9$ ) с числом  $CD4^+$  Т-клеток более 500/мкл крови.

3) относительно здоровые добровольцы (К;  $n = 9$ ) без ВИЧ и ВГС инфекций.

Кровь объемом до 30 мл забирали натошак из кубитальной вены в вакуумные пробирки, содержащие литий гепарин (Weihai Hongyu Medical Devices Cj., Ltd; Китай).

Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования двукратно разведенной фосфатно-солевым буферным раствором Дульбекко (DPBS, Gibco; США) крови в градиенте плотности Диаколла (1,077 г/мл, Диаэм; Россия). Выделенные клетки собирали, дважды отмывали раствором DPBS, подсчитывали в камере Горяева, после чего подвергали контролируемому замораживанию в жидком азоте в среде, содержащей 90% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Gibco; Колумбия) и 10% диметилсульфоксида (AppliChem; Германия). Перед проведением исследования клетки размораживали.

Для фенотипического анализа истощенных клеток образцы окрашивали витальным красителем Zombie UV (Biolegend, США) и коктейлем анти-CD3-BV605, анти-CD4-PE, анти-CD8-BV510 и анти-PD1-PB антител (Biolegend, США). Окрашенные клетки анализировали с использованием проточного цитофлюориметра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США).

Для определения продуктивности деления стимулированных Т-лимфоцитов образцы окрашивали 5 мкМ 5,6-карбоксифлуоресцеина диацетат-N-сукцинимидилового эфира (CFSE; Biolegend, США), дважды отмывали средой RPMI-1640 (Sigma-Aldrich; США), содержащей 20% ЭТС, и затем стимулировали фитогемагглютинином (ФГА; Serva, Германия) в конечной концентрации 15 мкг/мл. Лейкоциты культивировали в полной питательной среде (ППС), содержащей RPMI-1640, 10% ЭТС, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, Inc., США), в течение 7 суток (+37°C, 5% CO<sub>2</sub>) с заменой культуральной среды на 3–4 сутки. По окончании времени инкубации клетки собирали и окрашивали анти-CD3-BV605, анти-CD4-PE и анти-CD8-BV510 антителами (Biolegend, США) и витальным красителем Zombie UV (Biolegend, США). Лейкоциты гейтировали согласно логике, представленной на рисунке 1.

Для определения цитокин-продуцирующей способности Т-лимфоцитов из образцов выделяли  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клетки. Негативную селекцию

проводили с использованием коммерческих наборов Dynabeads Untouched Human CD4 T cells (Invitrogen; США) и MagCelect Human CD8<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (R&D Systems, Inc; США) согласно инструкциям производителей. Долю CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в пуле клеток, прошедших процедуру магнитной сепарации, оценивали на проточном цитофлюориметре CytoFLEX S с использованием моноклональных анти-CD3-PerCP, анти-CD4-BV605 и анти-CD8-APC-Fire750 антител (BioLegend, США). Чистота выделенных субпопуляций составила более 92%. Затем изолированные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты стимулировали магнитными частицами Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Gibco; США) и культивировали в ППС, в течение 72 ч (+37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Контролем служили нестимулированные клетки. По истечении времени инкубации собирали супернатанты, в которых определяли концентрации интерлейкина-2 (ИЛ-2) методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора “Интерлейкин-2-ИФА-БЕСТ” (Вектор БЕСТ; Россия). Концентрацию цитокина выражали в нг/мл.

Статистический анализ и визуализацию данных проводили с помощью программного обеспечения “GraphPad Prism 8” (GraphPad Software, США). Количественные данные в тексте и таблицах представлены в виде медиан и их интерквартильных размахов; категориальные данные – в виде процентов. Для сравнения нескольких групп количественных данных использовали однофакторный дисперсионный анализ; множественные сравнения между группами проводили с помощью критерия Тьюки. Для сравнения групп категориальных данных использовали критерий согласия Пирсона ( $\chi^2$ ). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез приняли равным 0.05.

Группы обследованных не имели статистически значимых отличий по возрасту, полу, продолжительности ВИЧ-инфекции и АРТ, а также вирусной нагрузке ВИЧ (таблица 1). Основным отличием между группами было количество CD4<sup>+</sup> Т-клеток периферической крови в момент исследования.

Фенотипический анализ лейкоцитов *ex vivo* показал следующее (рисунок 2). При ВИЧ/ВГС коинфекции в крови пациентов повышается относительное количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих ингибиторные рецепторы PD-1. Величина пула PD-1-позитивных Т-лимфоцитов зависит от эффективности иммунологического ответа больных на АРТ: наиболее высокое процентное содержание CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих PD-1, было выявлено в группе ИН. Поверхностную экспрессию молекулы PD-1 принято считать одним из ключевых маркеров истощения Т-лимфоцитов, которое ассоциировано с прогрессирующей потерей Т-клетками их эффекторных функций, в т.ч. способности к делению, продукции цитокинов и поддержанию жизнеспособности [6, 8].

На основании полученных нами результатов можно предположить наличие истощения пулов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у ВИЧ/ВГС

коинфицированных ИН. Вместе с тем, оценка экспрессии единственного фенотипического маркера не позволяет определенно судить о функциональности Т-клеток. Молекула PD-1 временно экспрессируется на активированных лимфоцитах после получения ими сигнала через Т-клеточный рецептор [9]. Этот механизм отрицательной обратной связи защищает организм от чрезмерных и нежелательных реакций, и потому экспрессия PD-1 не может рассматриваться как однозначный признак истощения Т-лимфоцитов. Для подтверждения того, что у ИН увеличение доли PD-1-позитивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов свидетельствует об их истощении, были проведены дополнительные исследования жизнеспособности и цитокинпродуцирующей активности клеток, стимулированных в условиях *in vitro*.

Было установлено, что у ИН среди пролиферирующих в культуре лимфоцитов значительно увеличивается доля гибнущих Т-клеток (рисунок 3). Примечательно, что это было характерно для CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, но не для CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

Ранее в ходе культуральных исследований нами было установлено, что CD4<sup>+</sup> Т-клетки ИН чаще, чем аналогичные лимфоциты ИО и К не запускают процесс деления после стимуляции митогенами, но остаются в состоянии покоя [10]. Более того, было показано, что у ИН CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты, вступившие в организме в процесс гомеостатической пролиферации, оказываются неспособны завершить его с образованием дочерних клеток [11]. Такое нарушение продуктивности деления сопровождается экспрессией генов, ассоциированных с апоптозом, и, в целом, с низкой жизнеспособностью пролиферирующих лимфоцитов [11, 12]. Перечисленные исследования были проведены на клетках ВИЧ моноинфицированных пациентов. Опираясь на данные настоящей работы, можно предположить, что схожие нарушения свойственны и Т-лимфоцитам ВИЧ/ВГС коинфицированных ИН.

Мы исследовали способность CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток ВИЧ/ВГС коинфицированных пациентов с различной эффективностью регенерации иммунитета на фоне АРТ продуцировать ИЛ-2 в ответ на стимуляцию *in vitro*. Оценка концентрации данного цитокина в супернатантах нестимулированных клеточных культур показала относительно невысокое его содержание, которое в среднем составило 0,012 нг/мл (0,012–0,013 нг/мл). Во всех клинических группах нестимулированные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты секретируют почти одинаковое количество ИЛ-2 ( $P>0,05$ ). На фоне стимуляции продукция данного цитокина Т-клетками увеличивалась в 1000 и более раз ( $P<0,001$ ). Во всех исследованных группах активированные CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты являлись основными продуцентами ИЛ-2 и по сравнению с аналогичными CD8<sup>+</sup> Т-клетками секретируют больше этого цитокина (рисунок 4;  $P<0,001$ ). Важно отметить, что у ИН по сравнению с ИО и К была снижена продукция ИЛ-2 стимулированными CD4<sup>+</sup> Т-клетками ( $P<0,05$ ), но не CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами.

( $P > 0,05$ ). Полученные данные свидетельствуют о том, что у ИН нарушена способность активированных  $CD4^+$  Т-клеток эффективно продуцировать ИЛ-2.

Ранее нами было установлено [10], что Т-лимфоциты, выделенные из периферической крови ВИЧ моноинфицированных ИН и стимулированные в течение 5 сут анти-CD3/анти-CD28 антителами, продуцируют меньше ИЛ-2, чем Т-клетки ИО ( $P > 0,05$ ) или К ( $P < 0,01$ ). Снижение уровня продукции данного цитокина сопровождалось уменьшением доли  $CD4^+$  Т-лимфоцитов, поделившихся под действием стимулирующего агента. Опираясь на данные литературы о том, что аутокринное и паракринное действие ИЛ-2, синтезируемого Т-клетками, необходимо для выполнения ими эффекторных функций таких как деление [13], мы предположили, что  $CD4^+$  Т-лимфоциты ИН снижают пролиферативную активность из-за дефицита ИЛ-2. Однако на тот момент нам не удалось выявить субпопуляцию Т-клеток, в которой происходит нарушение продукции данного цитокина. В настоящем исследовании мы показали, что у ВИЧ/ВГС коинфицированных ИН продукция ИЛ-2 снижена именно в активированных  $CD4^+$  Т-клетках.

Истощение Т-лимфоцитов является препятствием в борьбе с хроническими заболеваниями, такими как ВИЧ-инфекция и гепатит С. Истощенные Т-клетки не могут эффективно бороться с вирусами, что способствует ускоренному развитию СПИД. Восстановление функциональности Т-клеток путем подавления экспрессии ингибиторных рецепторов и блокирования соответствующих сигнальных путей может быть перспективным методом терапии [14]. Однако необходимо убедиться, что клетки-мишени действительно истощены. В настоящем исследовании мы установили, что по сравнению с ИО и К среди периферических  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитов ВИЧ/ВГС коинфицированных ИН увеличена доля клеток с фенотипом, характерным для истощения. В то же время мы показали, что только у ИН делящиеся  $CD4^+$ , но не  $CD8^+$  Т-клетки, характеризуются сниженной жизнеспособностью и цитокин-продуцирующей активностью. Таким образом, у ВИЧ/ВГС коинфицированных ИН  $CD4^+$  Т-лимфоциты демонстрируют признаки фенотипического и функционального истощения, тогда как  $CD8^+$  Т-клетки, хотя и экспрессируют ингибиторные рецепторы, не проявляют признаков функциональных нарушений. По-видимому, разработка специализированной терапии ВИЧ/ВГС коинфицированных ИН должна быть сосредоточена на восстановлении функциональной активности  $CD4^+$  Т-лимфоцитов.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 124021900006-5. В работе использовано оборудование ЦКП “Исследования материалов и вещества” ПФИЦ УрО РАН.

## ТАБЛИЦЫ

**Таблица 1.** Клинические характеристики ВИЧ/ВГС коинфицированных и здоровых людей.

**Table 1.** Clinical characteristics of HIV/HCV coinfecting individuals and healthy controls.

| Параметры<br>Parameters                                                                             | ИН<br>INR                                                           | ИО<br>IR                                | К<br>HC          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------|
|                                                                                                     | 1                                                                   | 2                                       | 3                |
| Количество<br>обследованных, n<br>Number of participants, n                                         | 9                                                                   | 9                                       | 9                |
| Возраст, лет<br>Age, years                                                                          | 38,0 (32,0–40,5)                                                    | 36,0 (34,5–42,0)                        | 40,0 (32,5–43,5) |
| Женщины, %<br>Women, %                                                                              | 22,2                                                                | 44,4                                    | 44,4             |
| Продолжительность АРТ,<br>лет<br>ART duration, years                                                | 6,0 (3,5–12,5)                                                      | 4,0 (3,0–7,0)                           | –                |
| Коинфекция ВГС, %<br>HCV coinfection, %                                                             | 100                                                                 | 100                                     | 0                |
| Численность CD4 <sup>+</sup><br>Т-лимфоцитов, клеток/мкл<br>CD4 <sup>+</sup> T-cell count, cells/ul | 226 (188–303)<br>P <sub>1-2</sub> <0,001<br>P <sub>1-3</sub> <0,001 | 538 (449–648)<br>P <sub>2-3</sub> <0,05 | 682 (633–756)    |
| Вирусная нагрузка ВИЧ,<br>копий/мл<br>HIV viral load, copies/ml                                     | <250                                                                | <250                                    | –                |

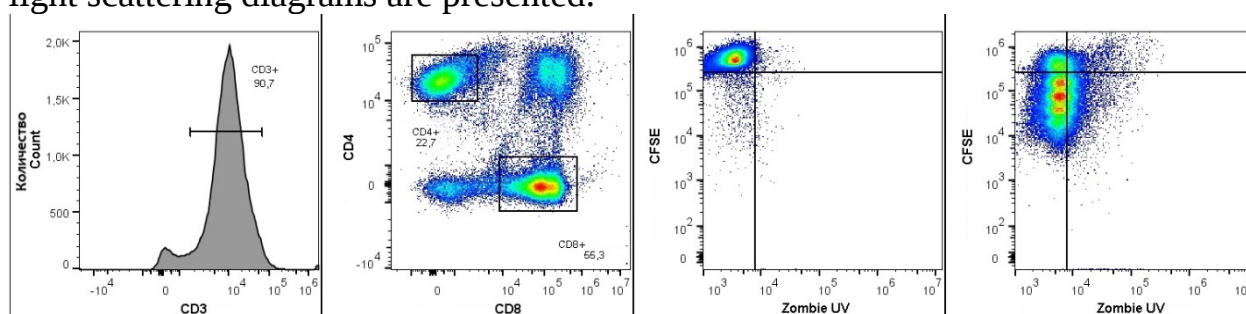
**Примечание:** указаны медианы и интерквартильные размахи. Группы количественных данных сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки. Группы категориальных данных сравнивали с помощью критерия согласия Пирсона ( $\chi^2$ ). ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ВГС – вирус гепатита С; АРТ – антиретровирусная терапия; ИН – иммунологические неответчики; ИО – иммунологические ответчики; К – контроль (здоровые доноры крови).

**Note:** Medians and interquartile ranges are shown. Groups of quantitative data were compared using ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Groups of categorical data were compared using the Pearson's chi-square test ( $\chi^2$ ). HIV – human immunodeficiency virus; HCV – hepatitis C virus; ART – antiretroviral therapy; INR – immunological non-responders; IR – immunological responders; HC – healthy controls.

## РИСУНКИ

**Рисунок 1.** Логика гейтирования лейкоцитов при определении жизнеспособности делящихся Т-клеток.

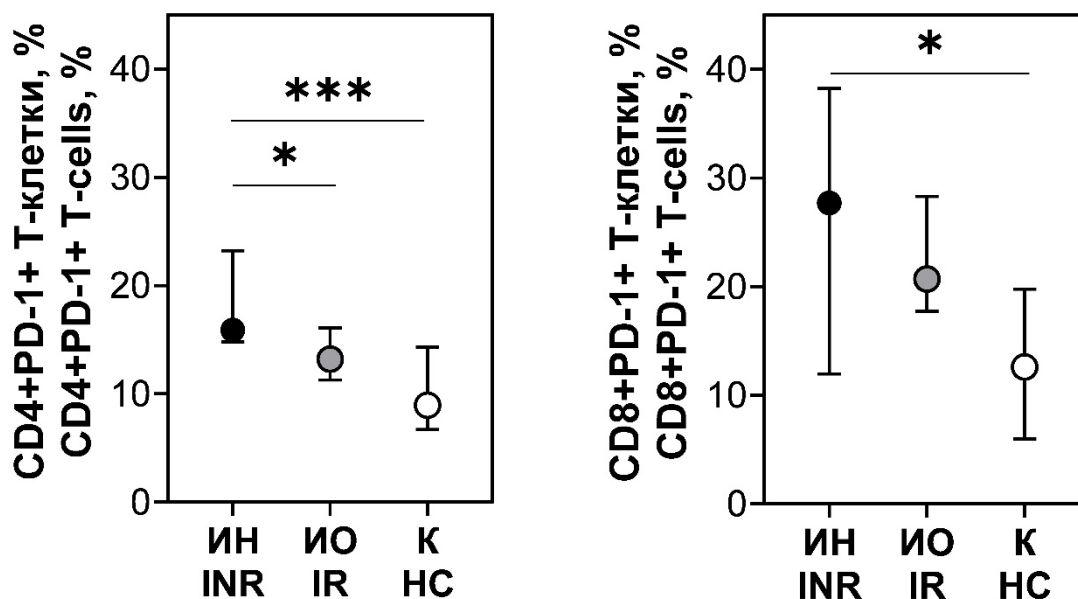
**Figure 1.** Leukocyte gating logic for assessing the viability of dividing T-cells  
A - isolation of CD3<sup>+</sup> T-cells; B - division of T-cells into CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocyte subsets; C - setting the gate in the unstimulated sample; D - analysis of stimulated cells stained with vital dye Zombie UV and tracking dye CFSE. Typical light scattering diagrams are presented.



А – выделение CD3<sup>+</sup> Т-клеток; Б – разделение Т-клеток на субпопуляции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов; В – установка гейта в нестимулированном образце; Г – анализ единовременного окрашивания витальным красителем Zombie UV и трекинговым красителем CFSE стимулированного образца. Представлены типовые диаграммы светорассеяния.

**Рисунок 2.** Процентное содержание PD-1-позитивных Т-лимфоцитов в периферической крови ВИЧ/ВГС коинфицированных больных с различной эффективностью регенерации иммунитета.

**Figure 2.** Leukocyte gating logic for assessing the viability of dividing T-cells  
A - isolation of CD3<sup>+</sup> T-cells; B - division of T-cells into CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocyte subsets; C - setting the gate in the unstimulated sample; D - analysis of stimulated cells stained with vital dye Zombie UV and tracking dye CFSE. Typical light scattering diagrams are presented.

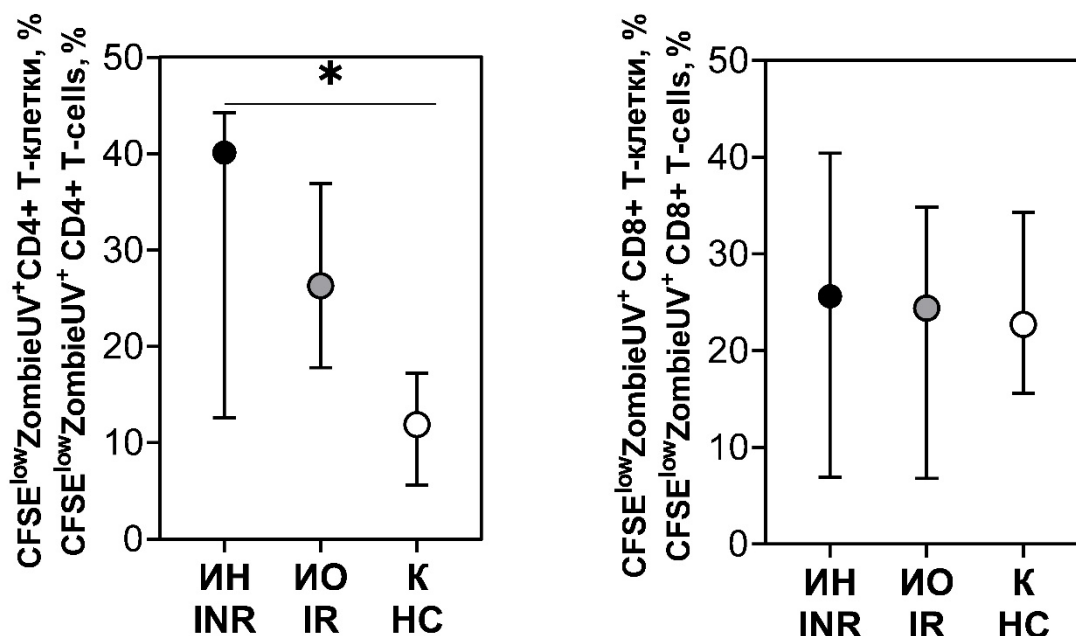


Указаны медианы и интерквартильные размахи. ИН – иммунологические неответчики; ИО – иммунологические ответчики; К – контроль. \* –  $P < 0,05$ ; \*\*\* –  $P < 0,001$  (однофакторный дисперсионный анализ с последующим сравнением с помощью критерия Тьюки).

Medians and interquartile ranges are shown. INR – immunological non-responders; IR – immunological responders; HC – healthy controls. \* –  $P < 0.05$ ; \*\*\* –  $P < 0.001$  (ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test).

**Рисунок 3.** Склонность к гибели пролиферирующих Т-лимфоцитов ВИЧ/ВГС коинфицированных больных с различной эффективностью регенерации иммунитета.

**Figure 3.** Susceptibility to death of proliferating T-lymphocytes in HIV/HCV coinfecting patients with different levels of immune reconstitution efficiency.

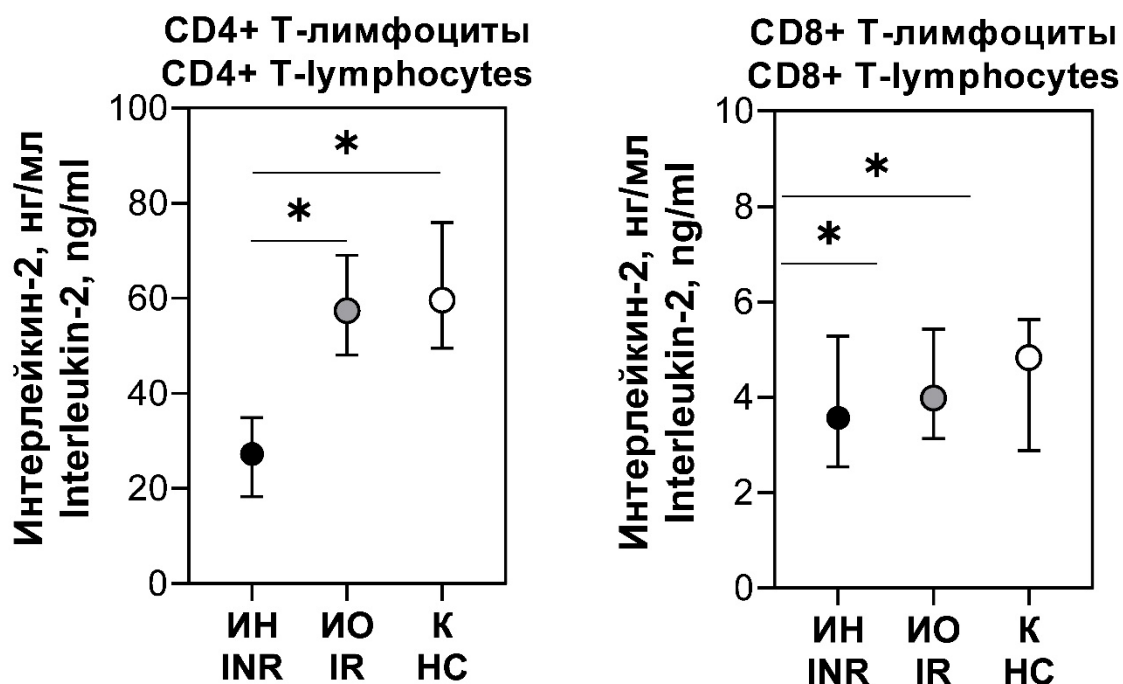


Указаны медианы и интерквартильные размахи. ИН – иммунологические неответчики; ИО – иммунологические ответчики; К – контроль. \* –  $P < 0,05$  (однофакторный дисперсионный анализ с последующим сравнением с помощью критерия Тьюки).

Medians and interquartile ranges are shown. INR - immunological non-responders; IR - immunological responders; HC - healthy controls. \* –  $P < 0.05$  (ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test).

**Рисунок 4.** Содержание интерлейкина-2 в супернатантах стимулированных культур  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитов ВИЧ/ВГС коинфицированных больных с различной эффективностью регенерации иммунитета.

**Figure 4.** Interleukin-2 levels in supernatants of stimulated  $CD4^+$  and  $CD8^+$  T-lymphocyte cultures in HIV/HCV coinfecting patients with different levels of immune reconstitution efficiency.



Указаны медианы и интерквартильные размахи. ИН – иммунологические неответчики; ИО – иммунологические ответчики; К – контроль. \* –  $P < 0,05$  (однофакторный дисперсионный анализ с последующим сравнением с помощью критерия Тьюки).

Medians and interquartile ranges are shown. INR - immunological non-responders; IR - immunological responders; HC - healthy controls. \* –  $P < 0.05$  (ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test).

**ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ\_МЕТАДААННЫЕ**

**Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку**

**Сайдакова Евгения Владимировна** – д.б.н., доцент, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»);  
адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13;  
факс: (342)280-83-34;  
e-mail: radimira@list.ru

**Saidakova Evgeniya Vladimirovna** – D.Sc.Biol, Associate Professor, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences;  
address: 614081 Perm, 13Goleva str.;  
fax: (342)280-83-34;  
e-mail: radimira@list.ru

**Блок 2. Информация об авторах**

**Королевская Лариса Борисовна** – к.м.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»);

**Korolevskaya Larisa Borisovna** – PhD, Research Scientist, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences;

**Власова Виолетта Викторовна** – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»);

**Vlasova Violetta Viktorovna** – Junior Research Scientist, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences;

**Шмагель Надежда Геннадьевна** – д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» - Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского

федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»);

**Nadezhda Gennadievna Shmagel** – MD, Senior Researcher, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences;

**Шмагель Константин Владимирович** – д.м.н., зав. лабораторией экологической иммунологии, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»);

**Shmagel Konstantin Vladimirovich** – MD, Head of the Laboratory of ecological immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences.

### **Блок 3. Метаданные статьи**

**ПРИЗНАКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ИСТОЩЕНИЯ CD4<sup>+</sup> И CD8<sup>+</sup> Т-КЛЕТОК У ВИЧ/ВГС КОИНФИЦИРОВАННЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НЕОТВЕТЧИКОВ НА АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ**

**MARKERS OF CD4<sup>+</sup> AND CD8<sup>+</sup> T-CELL EXHAUSTION IN HIV/HCV COINFECTED IMMUNOLOGICAL NON-RESPONDERS TO ANTIRETROVIRAL THERAPY**

**Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:**

**ИСТОЩЕНИЕ Т-КЛЕТОК У ВИЧ+ВГС+ ИН**

**T-CELL EXHAUSTION IN HIV+HCV+ INRS**

**Ключевые слова:** ВИЧ/ВГС коинфекция, антиретровирусная терапия, иммунологический неответ, Т-лимфоциты, истощение, PD-1, пролиферация, клеточная смерть, интерлекин-2.

**Keywords:** HIV/HCV coinfection, antiretroviral therapy, immunological non-response, T-lymphocytes, exhaustion, PD-1, proliferation, cell death, interleukin-2.

Объединенный иммунологический форум 2024.

Количество страниц текста – 5,

Количество таблиц – 1,

Количество рисунков – 4.

25.03.2024

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

| Порядков<br>ый номер<br>ссылки | Авторы, название публикации,<br>выходные данные                                                                                                                                                                                                                                                                                                | ФИО, название публикации на<br>английском                                                                                                                                                                                                                                                | Полный интернет адрес<br>или DOI                                                                             |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10                             | Королевская Л.Б., Сайдакова Е.В.<br>Нарушение функции CD4+ Т-<br>лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных<br>пациентов с дискордантным ответом на<br>антиретровирусную терапию.<br>Российский иммунологический журнал,<br>2019, Т. 13, №. 2, С.329-331.                                                                                                 | Korolevskaya L.B., Saidakova E.V.<br>CD4+ T-lymphocyte function is<br>violated in HIV-infected patients with<br>discordant response to antiretroviral<br>therapy. Russian journal of<br>immunology.                                                                                      | DOI:<br>10.31857/S10287221000661<br>7-3                                                                      |
| 7                              | Черешнев В.А., Шмагель К.В.,<br>Королевская Л.Б., Сайдакова Е.В.,<br>Шмагель Н.Г., Слободчикова С.В.,<br>Зверев С.Я., Таранин А.В. Влияние<br>коинфекции вирусом гепатита С на<br>активацию и апоптоз Т-лимфоцитов у<br>ВИЧ-инфицированных пациентов,<br>получающих антиретровирусную<br>терапию. Иммунология, 2013, Т. 34, № 5,<br>С.236-241. | Chereshnev V.A., Shmagel K.V.,<br>Korolevskaya L.B., Saidakova E.V.,<br>Shmagel N.G.3, Slobodchikova S.V.,<br>Zverev S.Ya., Taranin A.V. the impact<br>of hepatitis C virus coinfection on<br>immune recovery in HIV-infected<br>patients during antiretroviral therapy.<br>Immunologiya | <a href="https://www.elibrary.ru/item.asp?id=20781509">https://www.elibrary.ru/item.<br/>asp?id=20781509</a> |
| 8                              | Ando S., Perkins C.M., Sajiki Y., Chastain<br>C., Valanparambil R.M., Wieland A.,<br>Hudson W.H., Hashimoto M., Ramalingam<br>S.S., Freeman G.J., Ahmed R., Araki K..<br>mTOR regulates T cell exhaustion and PD-                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                          | DOI: 10.1172/JCI160025                                                                                       |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |                                           |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-------------------------------------------|
|    | 1-targeted immunotherapy response during chronic viral infection. J Clin Invest., 2023, Vol. 133, No. 2, pp. e160025.                                                                                                                                                                     |  |                                           |
| 14 | Benito J.M., Restrepo C., Garcia-Foncillas J., Rallon N. Immune checkpoint inhibitors as potential therapy for reverting T-cell exhaustion and reverting HIV latency in people living with HIV. Front Immunol., 2023, Vol. 14, pp.1270881.                                                |  | DOI:<br>10.3389/fimmu.2023.1270881        |
| 13 | Chikuma S., Terawaki S., Hayashi T., Nabeshima R., Yoshida T., Shibayama S., Okazaki T., Honjo T. PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8+ T cell anergy in vivo. J Immunol., 2009, Vol. 182, No. 11., pp.6682-6689.                                                     |  | DOI:<br>10.4049/jimmunol.0900080          |
| 5  | Grabmeier-Pfistershammer K., Steinberger P., Rieger A., Leitner J., Kohrgruber N. Identification of PD-1 as a unique marker for failing immune reconstitution in HIV-1-infected patients on treatment. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 2011, Vol. 56, No. 2, pp.118-124. |  | DOI:<br>10.1097/QAI.0b013e3181fba<br>b9f. |
| 3  | Macias J., Pineda J.A., Lozano F., Corzo J.E., Ramos A., Leon E., García-García J.A., Fernández-Rivera J., Mira J.A., Gómez-Mateos J. Impaired recovery of CD4+cell counts following highly active antiretroviral                                                                         |  | DOI: 10.1007/s10096-003-1015-2.           |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |                                   |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-----------------------------------|
|    | therapy in drug-naive patients coinfectd with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2003, Vol. 22, No. 11, pp.675-680.                                                                                                                                                                                                                     |  |                                   |
| 2  | Noiman A., Esber A., Wang X., Bahemana E., Adamu Y., Iroezindu M., Kiweewa, F. Maswai J., Owuoth J., Maganga L., Ganesan A., Maves R. C., Lalani T., Colombo R. E., Okulicz J. F., Polyak C., Crowell T. A., Ake J. A., Agan B. K. Clinical factors and outcomes associated with immune non-response among virally suppressed adults with HIV from Africa and the United States. Sci Rep., 2022, Vol. 12, No. 1, pp.1196. |  | DOI: 10.1038/s41598-022-04866-z.  |
| 12 | Saidakova E.V., Korolevskaya L.B., Shmagel N.G., Shmagel K.V., Chereshev V.A. T cell apoptosis in HIV-infected patients with incomplete immune recovery after antiretroviral therapy. Dokl Biol Sci., 2013, Vol. 450, pp.189-191.                                                                                                                                                                                         |  | DOI: 10.1134/S0012496613030010.   |
| 4  | Vlasova V.V., Korolevskaya L.B., Loginova O.A., Shmagel N.G., Saidakova E.V. Functional exhaustion of CD4+T cells in HIV/HCV coinfectd HAART-treated                                                                                                                                                                                                                                                                      |  | DOI: 10.15789/1563-0625-feo-2734. |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |                                    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|------------------------------------|
|    | patients. Medical Immunology (Russia), 2023, Vol. 25, No. 4, pp.837-844.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |                                    |
| 6  | Wherry E.J., Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. Nat Rev Immunol., 2015, Vol. 15, No. 8, pp.486-499.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |  | DOI: 10.1038/nri3862.              |
| 1  | Yang X., Su B., Zhang X., Liu Y., Wu H., Zhang T. Incomplete immune reconstitution in HIV/AIDS patients on antiretroviral therapy: Challenges of immunological non-responders. J Leukoc Biol., 2020, Vol. 107, No. 4, pp.597-612.                                                                                                                                                                                                                    |  | DOI: 10.1002/JLB.4MR1019-189R.     |
| 11 | Younes S.A., Talla A., Pereira Ribeiro S., Saidakova E.V., Korolevskaya L.B., Shmagel K.V., Shive C.L., Freeman M.L., Panigrahi S., Zweig S., Balderas R., Margolis L., Douek D.C., Anthony D.D., Pandiyan P., Cameron M., Sieg S.F., Calabrese L.H., Rodriguez B., Lederman M.M. Cycling CD4+ T cells in HIV-infected immune nonresponders have mitochondrial dysfunction. Journal of Clinical Investigation, 2018, Vol. 128, No. 11, pp.5083-5094. |  | DOI: 10.1172/JCI120245             |
| 9  | Youngblood B., Oestreich K.J., Ha S.J., Duraiswamy J., Akondy R.S., West E.E., Wei Z., Lu P., Austin J.W., Riley J.L., Boss                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  | DOI: 10.1016/j.immuni.2011.06.015. |

|  |                                                                                                                                                                              |  |  |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|
|  | J.M., Ahmed R. Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells. Immunity, 2011, Vol. 35, No. 3, pp.400-412. |  |  |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|