

ДИСКОРДАНТНЫЙ ОТВЕТ CD4⁺ Т-ЛИМФОЦИТОВ НА АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ СВЯЗАН С НАРУШЕНИЕМ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА

© 2019 г. Е. В. Сайдакова*, К. В. Шмагель, Л. Б. Королевская,
Н. Г. Шмагель

*E-mail: radimira@list.ru

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

Поступила: 20.02.2019. Принята: 04.03.2019

Оценивали способность CD4⁺ Т-клеток памяти, выделенных из крови ВИЧ-инфицированных больных с дискордантным ответом на антиретровирусную терапию, к пролиферации. Показали, что у этой категории больных на фоне снижения числа CD4⁺ Т-лимфоцитов увеличена доля делящихся CD4⁺CD45RA⁻ Т-клеток. Однако такие лимфоциты не способны завершить клеточный цикл и продуктивно поделиться. Также в пролиферирующих CD4⁺ Т-клетках памяти были выявлены нарушения митохондрий и энергетического обмена.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, CD4⁺ Т-лимфоциты, дискордантный ответ на антиретровирусную терапию, пролиферация, митохондрии

DOI: 10.31857/S102872210006949-8

Адрес: 614081 г. Пермь, ул. Голева, д. 13., «ИЭГМ УрО РАН», лаборатория экологической иммунологии, Сайдакова Евгения Владимировна. Тел.: 8 (342) 280 83 34.

E-mail: radimira@list.ru

Авторы:

Сайдакова Е. В., к.б.н., м.н.с. лаборатории экологической иммунологии «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

Шмагель К. В., д.м.н., зав. лабораторией экологической иммунологии «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

Королевская Л. Б., к.м.н., н.с. лаборатории экологической иммунологии «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

Шмагель Н. Г., д.м.н., с.н.с. лаборатории экологической иммунологии «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия.

Антиретровирусная терапия (АРТ) подавляет репликацию ВИЧ и способствует увеличению численности CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови инфицированных пациентов. Вместе с тем, несмотря на эффективное снижение вирусной нагрузки, примерно 30% ВИЧ-позитивных больных не отвечает на лечение восстановлением количества периферических CD4⁺ Т-клеток (дискордантный ответ) [1]. У таких больных по сравнению с субъектами, дающими стандартный ответ на лечение, на фоне постоянного иммунодефицита значительно увеличивается риск заболеваемости

и смертности от СПИД-ассоциированных заболеваний и от болезней, не ассоциированных со СПИД [2].

Развитие лимфопении при ВИЧ-инфекции сопровождается компенсаторной реакцией, направленной на восстановление численности лимфоцитов (гомеостатическая пролиферация) [3]. В основе этого процесса лежит постепенное накопление интерлейкина-7 (IL-7), который конститутивно продуцируется стромальными клетками и неэффективно потребляется сниженным числом лимфоцитов. Избыточное количество IL-7 индуцирует деление CD4⁺ Т-клеток. В связи с этим, чем глубже лимфопения, тем более высокая концентрация IL-7 обнаруживается в лимфоидных органах и плазме крови больного, что индуцирует более интенсивную пролиферацию CD4⁺ Т-лимфоцитов [3]. Ранее нами было показано, что у больных с дискордантным ответом на АРТ увеличена доля делящихся CD4⁺ Т-клеток памяти. Однако на фоне пролиферации у таких пациентов не восстанавливалось число периферических CD4⁺ Т-лимфоцитов.

Целью настоящей работы было определить возможные причины неэффективности деления

CD4⁺ Т-клеток памяти у ВИЧ-инфицированных пациентов с дискордантным ответом на АРТ.

План работы был одобрен этическим комитетом Пермского краевого центра по борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (рег. № комитета IRB00008964). От каждого участника было получено письменное информированное согласие. Обследовано три группы: 1) ВИЧ-позитивные иммунологические неответчики (ИН) с количеством CD4⁺ Т-лимфоцитов менее 350/мкл крови через два года терапии; 2) ВИЧ-инфицированные иммунологические ответчики (ИО) с числом CD4⁺ Т-клеток более 350/мкл крови после двух лет непрерывного лечения; 3) относительно здоровые добровольцы без ВИЧ-инфекции (К).

Численность CD4⁺ Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻) анализировали на проточном цитофлуориметре BD Fortessa. Лимфоциты, экспрессирующие Ki-67 *ex vivo*, рассматривали как митотически активные. Для определения продуктивности пролиферации CD4⁺ Т-лимфоцитов *in vitro* сортировали делящиеся и неделящиеся CD4⁺ Т-клетки памяти. Так как визуализация Ki-67 требует фиксации и пермеабиллизации клеток, для сортировки жизнеспособных пролиферирующих Т-клеток нами был использован суррогатный маркер экспрессии Ki-67 – рецептор трансферрина 1 (CD71) [4]. Полученные делящиеся (CD71⁺) и неделящиеся (CD71⁻) клетки памяти окрашивали CFSE и культивировали 7 дней в полной питательной среде. Массу митохондрий определяли, окрашивая CD4⁺ Т-клетки памяти митохондриальным красителем MitoTracker Green FM. Уровень экспрессии генов, вовлеченных в энергетический обмен клеток, устанавливали с использованием технологии Illumina.

В выборке рассчитывали медиану, достоверность различий между группами устанавливали на основе U-критерия Манна-Уитни. Для определения сходств и отличий экспрессии генов применяли методы иерархической кластеризации и многомерного шкалирования.

Три группы обследованных были сопоставимы по возрасту и полу. ВИЧ-инфицированные больные двух групп не отличались между собой по длительности заболевания и продолжительности АРТ. В соответствии с критериями отбора численность CD4⁺ Т-лимфоцитов крови была снижена у ИН по сравнению с ИО (286/мкл и 532/мкл соответственно; P<0,001). В то же время среднее количество периферических CD4⁺ Т-клеток у здоровых субъектов состави-

ло 885/мкл, что было существенно больше, чем в каждой из групп ВИЧ-инфицированных больных (P<0,001).

Несмотря на эффективный иммунологический ответ на АРТ, абсолютное количество CD4⁺ Т-клеток памяти у ИО оставалось ниже, чем в группе К (228/мкл и 407/мкл соответственно; P<0,001). В группе ИН дефицит этой субпопуляции Т-лимфоцитов оказался более глубоким. Среднее число CD4⁺CD45RA⁻ Т-клеток ИН составило 155/мкл, что было значительно ниже, чем в группах сравнения (P<0,001).

В условиях лимфопении у взрослого человека восстановление пула CD4⁺ Т-клеток в значительной мере происходит посредством гомеостатической пролиферации [3]. Было показано, что у всех ВИЧ-инфицированных больных по сравнению со здоровыми субъектами увеличена доля делящихся периферических CD4⁺ Т-клеток памяти (P<0,001). В группе ИН их процентное содержание составило 4,4%; в группе ИО – 3,2%; в группе К – 1,6%. Важно отметить, что различия между ИН и ИО были статистически значимыми (P<0,01). Таким образом, в условиях лимфопении CD4⁺ Т-клетки памяти интенсивно пролиферируют, однако увеличения числа периферических CD4⁺ Т-лимфоцитов не происходит.

С использованием поверхностной молекулы CD71 – суррогатного маркера пролиферации – нам удалось сортировать живые делящиеся (CD71⁺) и неделящиеся (CD71⁻) CD4⁺ Т-клетки памяти. Полученные Т-лимфоциты окрашивали CFSE и культивировали в течение 7 дней. В результате было показано, что у ИН по сравнению с ИО и К резко снижена продуктивность пролиферации CD4⁺ Т-клеток памяти. Так в группе К доля CFSE^{low}CD71⁺ Т-лимфоцитов составила 55%; в группе ИО – 47%; а в группе ИН – лишь 15%. При этом CD4⁺CD71⁺ Т-клетки в группах ИО и К в процессе культивирования производили по 4–5 дочерних генераций, в то время как клетки группы ИН редко продуцировали даже одно поколение дочерних лимфоцитов. Более того, делящиеся Т-клетки памяти ИН по сравнению с ИО и К характеризовались сниженной жизнеспособностью. За семь дней культивирования их абсолютное количество в культуре ИН резко упало, что не было отмечено в других обследованных группах.

Известно, что продуктивная пролиферация невозможна без функциональных митохондрий, обеспечивающих энергетические потребности процесса деления [5]. Было установлено, что у ИН по сравнению с ИО в пролиферирующих

CD4⁺ Т-клетках памяти снижена интенсивность флуоресценции красителя MitoTracker Green. Это свидетельствует о меньшей массе митохондрий, содержащихся в митотически активных CD4⁺CD45RA⁻ Т-лимфоцитах больных с дискордантным ответом на АРТ. Кроме того, на основании транскрипционного анализа было показано, что в CD4⁺CD45RA⁻CD71⁺ Т-лимфоцитах ИН по сравнению с ИО снижена экспрессия генов, вовлеченных в регуляцию клеточного дыхания, в том числе кодирующих белки комплекса I (*NDUFV1*, *NDUFA9*, *NDUFS8* и др.) и комплекса IV (*COX8A*, *COX5B*, *COX6A1*, *SURF1*) дыхательной цепи митохондрий. Более того, в CD71⁺CD4⁺ Т-клетках памяти ИН была снижена экспрессия генов, кодирующих ферменты цикла Кребса (*IDH1*, *IDH2*), и генов, вовлеченных в бета-окисление жирных кислот (*CPT1A*).

Таким образом, у больных с дискордантным ответом на лечение наблюдается интенсивная пролиферация CD4⁺ Т-клеток памяти, которая не приводит к восстановлению численности периферических CD4⁺ Т-лимфоцитов. Одной из возможных причин низкой продуктивности деления и слабой жизнеспособности пролиферирующих CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти у ИН может служить нарушение функций митохондрий и связанного с ними энергетического обмена.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-54-30006).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Marchetti G., Gori A., Casabianca A., Magnani M., Franzetti F., Clerici M., Perno C.F., Monforte A., Galli M., Meroni L. Comparative analysis of T-cell turnover and homeostatic parameters in HIV-infected patients with discordant immune-virological responses to HAART. *AIDS*. 2006, 20, 1727–1736.
2. Collaboration of Observational H.I.V.E.R.E.i.E., Lewden C., Bouteloup V., De Wit S., Sabin C., Mocroft A., Wasmuth J.C., van Sighem A., Kirk O., Obel N., Panos G., Ghosn J., Dabis F., Mary-Krause M., Lepout C., Perez-Hoyos S., Sobrino-Vegas P., Stephan C., Castagna A., Antinori A., d'Arminio Monforte A., Torti C., Mussini C., Isern V., Calmy A., Teira R., Egger M., Grarup J., Chene G. All-cause mortality in treated HIV-infected adults with CD4 \geq 500/mm³ compared with the general population: evidence from a large European observational cohort collaboration. *Int J Epidemiol*. 2012, 41, 433–445.
3. Tchao N.K., Turka L.A. Lymphodepletion and homeostatic proliferation: implications for transplantation. *Am J Transplant*. 2012, 12, 1079–1090.
4. 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. *J Clin Invest*. 2018, 128, 5083–5094.
5. Battersby B.J., Richter U. Why translation counts for mitochondria—retrograde signalling links mitochondrial protein synthesis to mitochondrial biogenesis and cell proliferation. *J Cell Sci*. 2013, 126, 4331–4338.

IN HIV-INFECTED PATIENTS, DISCORDANT RESPONSE OF CD4⁺ T-CELLS TO ANTIRETROVIRAL THERAPY IS ASSOCIATED WITH ENERGY METABOLISM VIOLATION

© 2019 E. V. Saidakova*, K. V. Shmagel, L. B. Korolevskaya, N. G. Shmagel

*E-mail: radimira@list.ru

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia

Received: 20.02.2019. Accepted: 04.03.2019

We evaluated the ability of memory CD4⁺ T-cells that were isolated from the blood of HIV-infected subjects with a discordant response to antiretroviral therapy to proliferate. It was shown that in those patients, frequency of dividing CD4⁺CD45RA⁻ T-cells was increased against the background of CD4⁺ T-cell deficiency. However, those lymphocytes were not able to complete the cell cycle and productively divide. Furthermore, in cycling memory CD4⁺ T-cells violation of mitochondria and energy metabolism were detected.

Key words: HIV-infection, CD4⁺ T-lymphocytes, discordant response to antiretroviral therapy, cycling, mitochondria

Authors:

Saidakova E. V., ☒ PhD, junior research scientist at IEGM UB RAS, Perm, Russia. E-mail: radimira@list.ru;

Shmagel K. V., PhD, head of the department at IEGM UB RAS, Perm, Russia;

Korolevskaya L. B., PhD, research scientist at IEGM UB RAS, Perm, Russia;

Shmagel N. G., PhD, senior research scientist at IEGM UB RAS, Perm, Russia.