

DOI: 10.1134/S0041377118120106

ПРОЛИФЕРАЦИЯ CD4⁺ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАЗВИТИИ ДИСКОРДАНТНОГО ОТВЕТА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ НА АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ

© *Е. В. Сайдакова*^{1,2,*} *К. В. Шмагель*^{1,2} *Л. Б. Королевская*¹ *Н. Г. Шмагель*³
*Н. И. Гуляева*⁴ *Г. Г. Фрейнд*⁴ *С. В. Южанинова*⁴ *В. А. Черешнев*^{1,2}

¹ *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН — филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, 614081,*

² *Биологический факультет Пермского государственного национального исследовательского университета, Пермь, 614990,*

³ *Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Пермь, 614065, и*

⁴ *Лечебный факультет Пермского государственного медицинского университета им. акад. Е. А. Вагнера Министерства здравоохранения РФ, Пермь, 614000;*
** электронный адрес: radimira@list.ru*

Дискордантный ответ иммунной системы на антиретровирусную терапию (АРТ) при ВИЧ-инфекции характеризуется нарушением восстановления численности периферических CD4⁺ Т-лимфоцитов на фоне подавления репликации вируса. Причина неэффективной регенерации CD4⁺ Т-клеток при проведении лечения остается неизвестной. Обследовали две группы ВИЧ-позитивных пациентов — больные с дискордантным ответом на АРТ (n = 20) и лица со стандартным ответом на терапию (n = 21). Определено количество пролиферирующих (Ki-67⁺), стареющих (CD57⁺) и истощенных (PD-1⁺) CD4⁺ Т-лимфоцитов разной степени зрелости в периферической крови и лимфатических узлах ВИЧ-позитивных субъектов. Проанализирован показатель асимметричности деления CD4⁺ Т-клеток после их стимуляции *in vitro*. Проведено гистологическое исследование лимфатических узлов ВИЧ-инфицированных больных. Показано, что у лиц с дискордантным ответом иммунной системы на АРТ интенсивное деление CD4⁺ Т-клеток не приводит к увеличению их числа ни в периферической крови, ни во вторичных лимфоидных органах. При этом у больных с нарушением восстановления иммунной системы рост пролиферации клеток сопровождается накоплением истощенных CD4⁺ Т-лимфоцитов. Более того, у пациентов с дискордантным ответом иммунной системы на АРТ продемонстрирована асимметрия деления стимулированных *in vitro* CD4⁺ Т-клеток. Выявленные нарушения могут быть причиной неэффективного восстановления иммунной системы при проведении АРТ у ВИЧ-инфицированных больных.

Ключевые слова: антиретровирусная терапия, ВИЧ-инфекция, дискордантный ответ, лимфатический узел, периферическая кровь, пролиферация, Т-лимфоциты

Принятые сокращения: АРТ — антиретровирусная терапия, ВИЧ — вирус иммунодефицита человека, ИИ — иммунологические неответчики, ИО — иммунологические ответчики, СПИД — синдром приобретенного иммунодефицита, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, CFSE — 5,6-карбоксихлоресцеин диацетат-N-сукцинимидильный эфир.

Назначение антиретровирусной терапии (АРТ) при ВИЧ-инфекции приводит к подавлению репликации вируса с последующим увеличением численности периферических CD4⁺ Т-лимфоцитов (Autran et al., 1999). Вместе с тем у 20—30 % ВИЧ-инфицированных больных развивается дискордантный ответ на лечение, при котором число CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови пациентов остается низким, несмотря на эффективное подавление вирусной нагрузки (Piketty et al., 1998; Gaardbo et al., 2012; Massanella et al., 2013). Из-за неспособности преодолеть иммунодефицитное состояние такие больные подвергнуты ри-

ску возникновения СПИД-ассоциированных и СПИД-неассоциированных болезней (Lapadula et al., 2013). Иммунологическая неэффективность АРТ может приводить к появлению коинфекций, развитию злокачественных новообразований и сердечно-сосудистых заболеваний, которые сокращают продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных пациентов, несмотря на проведение дорогостоящего лечения (Tan et al., 2008; Lapadula et al., 2013).

Причины развития иммунологического неответа на терапию остаются малопонятными. Ранее при исследовании периферической крови больных с дискордантным от-

ветом иммунной системы на АРТ был обнаружен рост доли CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих маркеры пролиферации (Piconi et al., 2010; Lederman et al., 2011). Однако у этих пациентов повышение митотической активности CD4⁺ Т-лимфоцитов не приводило к восстановлению их численности. Следует также отметить, что значительная часть CD4⁺ Т-клеток организма находится не в крови, а во вторичных лимфоидных органах (Di Mascio et al., 2009). Более того, в условиях ВИЧ-инфекции на CD4⁺ Т-лимфоцитах повышается экспрессия молекул хоминга, способствующих миграции клеток в лимфатические узлы (Wang et al., 1997). Исходя из этого исследование периферической крови ВИЧ-инфицированных пациентов с дискордантным ответом иммунной системы на АРТ не может дать полного представления об интенсивности деления CD4⁺ Т-лимфоцитов. Целью данной работы было исследовать митотическую активность CD4⁺ Т-клеток ВИЧ-инфицированных больных с дискордантным ответом иммунной системы на АРТ.

Материал и методика

План работы был одобрен локальным этическим комитетом Пермского краевого центра по борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (регистрационный номер IRB00008964). В исследование были приглашены ВИЧ-инфицированные больные, получавшие АРТ более 2 лет. Приверженность лечению определяли по уровню вирусной нагрузки ВИЧ в крови обследованных (больные с вирусной нагрузкой более 50 копий/мл были исключены из исследования). Пациенты, давшие письменное информированное согласие (41 человек), были разделены на две клинические группы: 1) больные с неэффективным приростом числа CD4⁺ Т-клеток (< 350/мкл) за 2 года лечения (иммунологические неответчики — ИН; n = 20); 2) пациенты со стандартным ответом CD4⁺ Т-лимфоцитов на терапию (> 350/мкл; иммунологические ответчики — ИО; n = 21). В крови всех обследованных отсутствовали антитела к вирусу гепатита С и HBs-антиген.

Кровь объемом до 50 мл забирали натощак из кубитальной вены в пробирки, обработанные ЭДТА. Концентрацию ВИЧ в крови определяли посредством разветвленной ДНК-гибридизации «Versant 3 HIV-1 RNA 3.0 assay b» на анализаторе Versant 440 (Siemens, Германия) согласно инструкции фирмы-производителя. Численность CD4⁺ Т-лимфоцитов оценивали с использованием коммерческого набора Immunocytometry Systems (BDIS) Simultest(tm) (Becton Dickinson, США) на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования двукратно разведенным раствором Дульбекко (Gibco, США) периферической крови в градиенте плотности Диаколл (1.077 г/мл, Диа-М, Россия).

Основные субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов определяли на проточном цитофлуориметре LSR II (Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных анти-CD3-PerCP, анти-CD4-AF700, анти-CD27-APC-Cy7, анти-CD45RA-APC и анти-CCR7-PE-Cy7 (Becton Dickinson, США) антител, соответствующих изотипических контролей и витального красителя LIVE/DEAD® Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, США). Проллиферативную активность, старение и состояние истощения наивных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺), Т-клеток центральной памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD27⁻

CCR7^{lo}) и Т-клеток эффекторной памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻) *ex vivo* анализировали после обработки лимфоцитов анти-Ki-67-PE, анти-CD57-Pacific Blue и анти-PD-1-BV421 антителами соответственно (Becton Dickinson, США).

Выделение Т-лимфоцитов проводили на основе негативной селекции с использованием набора Dynabeads™ Untouched™ Human T cells (Invitrogen, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Полученные Т-клетки окрашивали 5 мкМ 5,6-карбоксихлорофлуоресцеина диацетат-N-сукцинимидильного эфира (CFSE, BioLegend, США) и дважды отмывали средой RPMI-1640 (Sigma, США), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, Южная Америка). Проллиферацию лимфоцитов индуцировали добавлением магнитных частиц Dynabeads™ man T-Activator CD3/CD28 (Gibco, США). Пробу культивировали в полной питательной среде (10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 10000 Ед./мл пенициллина и 10 000 мкг/мл стрептомицина (Sigma, США) в RPMI-1640) при 37 °С, 5 % CO₂ в течение 5 сут. В качестве контроля использовали нестимулированную культуру клеток, окрашенных CFSE, и стимулированные Т-лимфоциты без флуоресцентного красителя. По окончании времени инкубации Т-клетки обрабатывали антителами анти-CD4-PE (BioLegend, США) и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Моделирование и математическую обработку полученных данных проводили с использованием программ FlowJo VX (FlowJo LCC, США), ModFit LT (Verity Software House, США) и Flowing Software (Perttu Terho, Финляндия). Для каждой клеточной генерации CD4⁺ Т-лимфоцитов был получен ряд статистических характеристик, в том числе количество клеток, среднее значение и стандартное отклонение интенсивности флуоресценции.

Паховые лимфатические узлы забирали под местной анестезией у 6 ВИЧ-инфицированных пациентов, давших письменное информированное согласие (по 3 человека из каждой клинической группы). Часть лимфоузла гомогенизировали в присутствии коллагеназ и выделяли мононуклеарные клетки. Гистологические препараты готовили после фиксации образцов в 4%-ном параформальдегиде в Лаборатории Тима Шаккера (Университет Миннесоты, США).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием непараметрических методов. В выборке рассчитывали медиану и квартильный размах (25—75 перцентиль). Достоверность различий между группами устанавливали с помощью U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни. Корреляционный анализ проводили по методу Спирмена. Статистические расчеты и построение графиков осуществляли с использованием программ Stata11SE, Microsoft Excel и STATISTICA 6.0.

Результаты и обсуждение

Группы ВИЧ-инфицированных больных не различались по возрасту или половому составу (см. таблицу). Основным критерием при разделении пациентов на группы служило число периферических CD4⁺ Т-лимфоцитов, в связи с чем у ИН был выявлен более глубокий иммунодефицит: количество CD4⁺ Т-клеток в их крови составляло менее 350/мкл и было снижено в 2 раза по сравнению с аналогичным значением ИО. Недостаточность численности клеток была выявлена в каждой из субпопуляций

Клиническая характеристика ВИЧ-инфицированных пациентов с эффективным и неэффективным ответом CD4⁺ Т-клеток на терапию

Характеристики	ВИЧ-моноинфекция	
	ИН	ИО
Обследовано пациентов (n)	20	21
Возраст (годы)	39 (33—42) ^a	38 (34—42)
Пол (мужчины)	10 (50 %)	9 (43 %)
Пути передачи ВИЧ		
Парентеральный	0 (0 %)	1 (5 %)
Половой	20 (100 %)	20 (95 %)
Характеристика ВИЧ-инфекции		
Длительность инфекции (годы)	7 (4—13)	10 (6—13)
Продолжительность АРТ (годы)	3.5 (2.1—5.1)	4.5 (3.2—6.5)
Численность CD4 ⁺ Т-клеток до АРТ (мкл ⁻¹)	88 (33—150) <i>P</i> < 0.05	160 (69—185)
Численность CD4 ⁺ Т-клеток на момент исследования (мкл ⁻¹)	270 (208—303) <i>P</i> < 0.001	534 (438—656)
Уровень ВИЧ в крови (копии/мл)	<50 ^b	<50 ^b

Примечание. ^a Здесь и далее, если не указано иначе, представлены медианы и интерквартильные размахи; статистические расчеты выполнены по методу Манна—Уитни. ^b Предел чувствительности тест-систем.

CD4⁺ Т-лимфоцитов пациентов с дискордантным ответом иммунной системы на АРТ.

Количество пролиферирующих (Ki-67⁺) CD4⁺ Т-клеток в крови больных с неэффективным восстановлением иммунной системы при проведении АРТ статистически достоверно (*P* < 0.01) превышало соответствующее значение пациентов, стандартно отвечающих на лечение (рис. 1). При этом в обеих группах ВИЧ-инфицированных субъектов основную часть делящихся периферических CD4⁺ Т-лимфоцитов составили клетки памяти: по сравнению с ними доля Ki-67⁺ элементов среди наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов была в 9 раз меньше. Пул CD4⁺ Т-клеток памяти является неоднородным и состоит из двух субпопуляций: лимфоцитов центральной и эффекторной памяти. Было показано, что в каждой из них относительное количество делящихся клеток было выше у больных с неэффективным восстановлением иммунной системы по сравнению с соответствующими показателями пациентов, давших удовлетворительный ответ на терапию. Доля Ki-67-позитивных лимфоцитов составила 4.39 и 2.71 % (*P* 0.01) среди CD4⁺ Т-клеток центральной памяти, 4.82 и 3.19 % (*P* < 0.05) среди CD4⁺ Т-клеток эффекторной памяти в группах ИН и ИО соответственно. В условиях подавленной вирусной нагрузки ВИЧ установленные различия между группами, на наш взгляд, обусловлены законом гомеостатической пролиферации: чем меньше число лимфоцитов, тем выше уровень их митотической активности (Ernst et al., 1999). Ранее при ВИЧ-инфекции уже была отмечена негативная зависимость между численностью периферических CD4⁺ Т-клеток и долей пролиферирующих CD4⁺ Т-лимфоцитов крови (Anthony et al., 2003). В данной работе эта связь была подтверждена: коэффициент ранговой корреляции Спирмена между двумя показателями составил -0.550 (*P* < 0.001). При этом основными делящимися элементами у всех ВИЧ-инфицированных больных были не наивные Т-лимфоциты, а Т-клетки памяти. Представленные

различия в показателях деления отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов могут быть опосредованы функциональными особенностями клеток разной степени зрелости. Известно, что клетки памяти по сравнению с наивными Т-лимфоцитами имеют менее жесткие критерии для активации: они способны отвечать на более низкие концентрации антигена, меньше зависят от костимулирующих сигналов и требуют менее продолжительной стимуляции (Curtisinger et al., 1998; Rogers et al., 2000). Эти особенности делают клетки памяти основными участниками индуцированного лимфопенией восстановления (Boylan et al., 2007). Однако полученные данные не объясняют того, почему у больных с дискордантным ответом на АРТ количество хелперных Т-лимфоцитов крови остается сниженным, несмотря на их активную пролиферацию.

При работе с приматами, инфицированными вирусом иммунодефицита обезьян, было сделано предположение о том, что интенсивное деление CD4⁺ Т-клеток может приводить к нарушению функциональной активности лимфоцитов (Array et al., 2007). В этом исследовании пролиферация клеток была ассоциирована с накоплением лимфоцитов, экспрессирующих молекулу CD57 (маркер индуцированного митозами старения). Известно, что данный белок появляется на лимфоцитах, хромосомы которых имеют укороченные теломеры (Focosi et al., 2010), при этом сами CD57-позитивные клетки не способны выполнять часть функций (например, продуцировать достаточное количество IL-2) и становятся менее устойчивыми к активационно-индуцированному апоптозу (Palmer et al., 2005). В настоящем исследовании мы проанализировали уровень экспрессии молекулы CD57 CD4⁺ Т-клетками пациентов с дискордантным ответом иммунной системы на АРТ. Было показано, что количество периферических CD4⁺ Т-клеток, несущих на своей поверхности маркер старения, не различалось (*P* > 0.05) у этих больных при сравнении с тем же показателем в группе ВИЧ-инфицированных ИО. Связь между экспрессией маркеров проли-

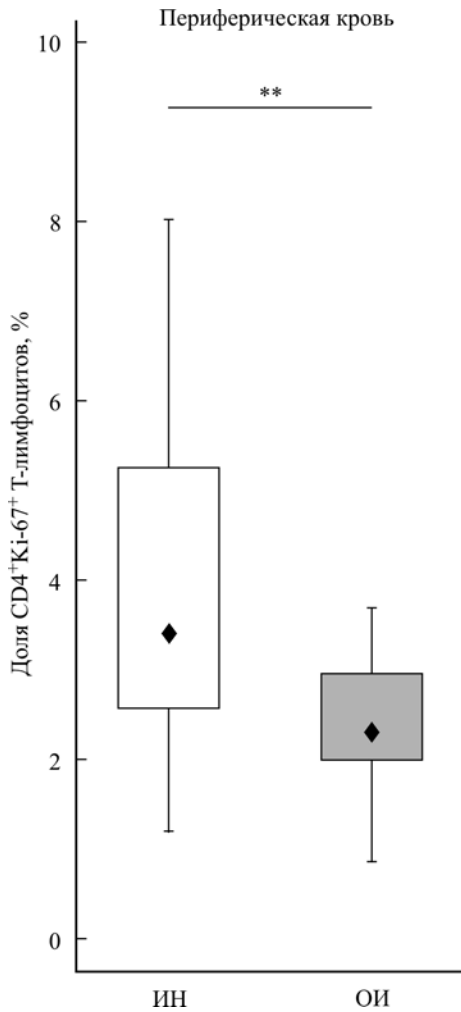


Рис. 1. Относительное количество делящихся $CD4^+Ki-67^+$ Т-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных больных.

На рисунке представлены: медиана значений (ромбики), интерквартильные размахи («коробочки»), 10-я и 90-я перцентили (планки). ИН — иммунологические неответчики на терапию, ИО — иммунологические ответчики на лечение; звездочки — $P < 0.01$.

ферации и старения также не была статистически значимой ($P < 0.05$).

Было проведено исследование экспрессии молекулы PD-1, отражающей функциональное истощение $CD4^+$ Т-клеток ВИЧ-инфицированных больных. Установлено, что у пациентов с дискордантным ответом иммунной системы на АРТ увеличена доля PD-1-позитивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов крови (рис. 2): 23.4 и 16.7 % ($P < 0.01$) в группах ИН и ИО соответственно. Как известно, истощенные Т-клетки характеризуются повышенной склонностью к апоптозу (Wherry, 2011). Следует отметить, что наибольшее различие между показателями относительного количества истощенных $CD4^+$ Т-лимфоцитов было обнаружено в пуле клеток центральной памяти: 42.8 и 28.1 % ($P < 0.001$) среди ИН и ИО соответственно. Более того, нам удалось установить статистически значимую корреляционную зависимость между долей делящихся ($Ki-67^+$) $CD4^+$ Т-лимфоцитов центральной памяти и относительным количеством истощенных ($PD-1^+$) $CD4^+$ Т-клеток этой субпопуляции ($R = 0.789$; $P < 0.001$) у ВИЧ-инфицированных больных. Необходимо подчеркнуть, что именно $CD4^+$ Т-клетки центральной памяти являются

основой для поддержания численности $CD4^+$ Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции, а их гомеостаз определяет темп прогрессирования заболевания (Okoye et al., 2007). Таким образом, истощение пула $CD4^+$ Т-клеток центральной памяти у ВИЧ-инфицированных ИН может негативно сказываться на способности клеток поддерживать свою численность и тем самым влиять на эффективность восстановления количества $CD4^+$ Т-клеток при ВИЧ-инфекции.

Исследование, проведенное с клеточными культурами, показало, что периферические $CD4^+$ Т-клетки пациентов с дискордантным ответом иммунной системы на АРТ после стимуляции *in vitro* делятся несимметрично. Проявлением асимметрии было неравномерное распределение флуоресцентного красителя, связанного с белками цитоплазмы, между формирующимися дочерними $CD4^+$ Т-лимфоцитами. Это приводило к достоверному увеличению стандартного отклонения флуоресценции CFSE в каждой последующей клеточной генерации (рис. 3). Известно, что при асимметричном делении многие компоненты родительской клетки (не только белки цитоплазмы, но и поверхностные рецепторы, внутриклеточные компоненты, транскрипционные факторы и РНК) непропорционально разделяются между дочерними элементами (Tajbakhsh et al., 2009). Асимметрия при делении клеток приводит к гибели части потомков (Sennerstam, 1988; Vocharov et al., 2013), что может негативно влиять на продуктивность пролиферации $CD4^+$ Т-лимфоцитов (в том числе активно делящихся клеток центральной памяти) ВИЧ-позитивных больных с дискордантным ответом на лечение.

Хорошо известно, что в крови содержится лишь малая часть всех лимфоцитов организма. Основная их доля (примерно 98 %) находится в лимфоидных и некоторых нелимфоидных органах и тканях, таких как лимфоузлы, селезенка, Пейеровы бляшки, миндалины, тимус, костный мозг и соединительная ткань (Trepel, 1974). По более точным оценкам в крови присутствует лишь 0.3—0.5 %

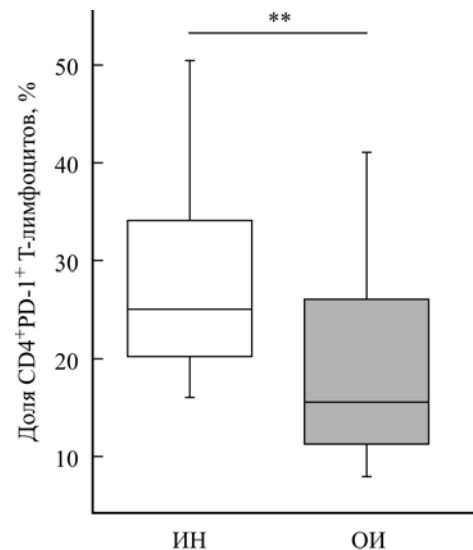


Рис. 2. Относительное количество истощенных $CD4^+PD-1^+$ Т-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных больных.

На рисунке представлены: медиана значений (срединная линия), интерквартильные размахи («коробочки»), 10-я и 90-я перцентили (планки). ИН — иммунологические неответчики на терапию; ИО — иммунологические ответчики на лечение; звездочки — $P < 0.01$.

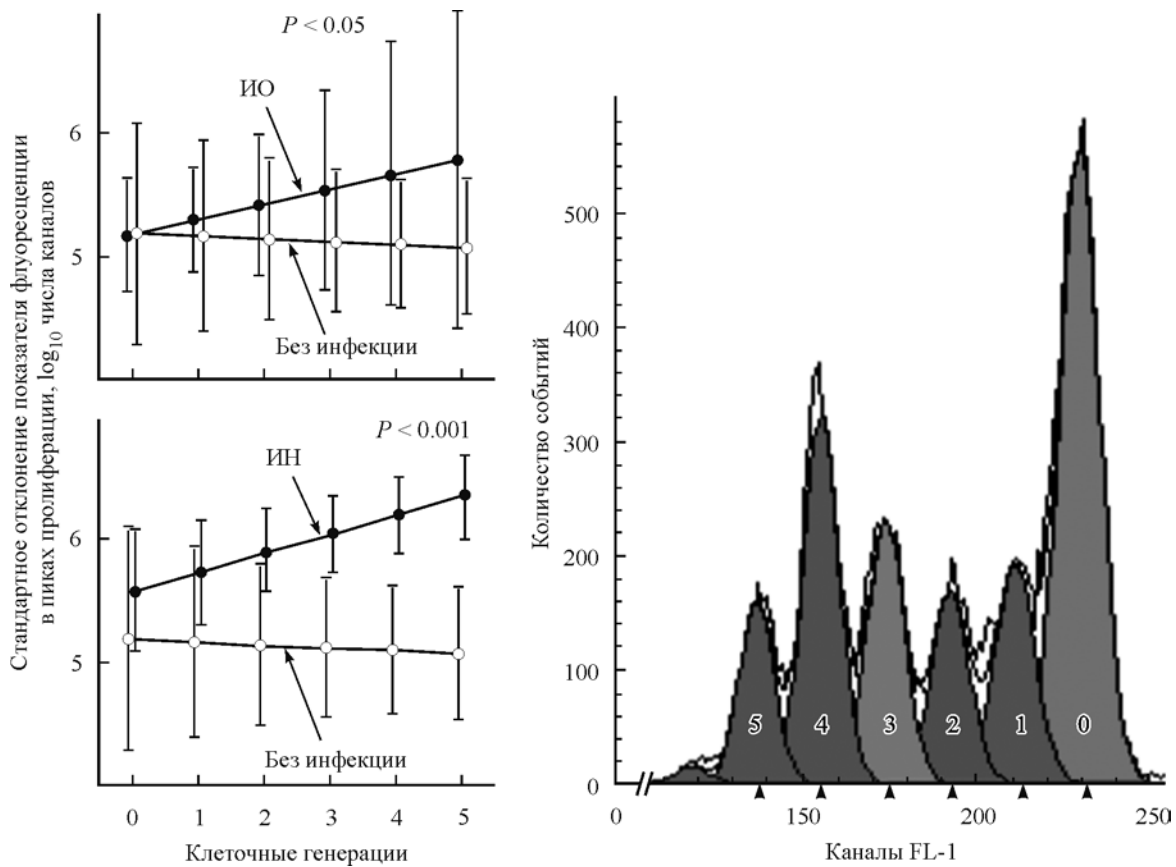


Рис. 3. Изменение распределения CFSE среди делящихся CD4⁺ Т-лимфоцитов ВИЧ-инфицированных пациентов с неэффективным восстановлением иммунной системы в процессе лечения.

Представлена математическая модель зависимости величины стандартного отклонения флуоресценции в генерации клеток от числа пройденных циклов митоза. Значения стандартного отклонения выражены в десятичных логарифмах CFSE-флуоресценции Т-клеток, стимулированных антителами анти-CD3 и анти-CD28; вертикальные линии — доверительные интервалы. Увеличение стандартного отклонения в каждой последующей генерации свидетельствует о неравномерном распределении CFSE между дочерними лимфоцитами (асимметрия деления). Различия между группами были установлены методом дисперсионного анализа.

всех CD4⁺ Т-лимфоцитов организма (Di Mascio et al., 2009). В связи с этим мы ожидали, что более полное представление о митотической активности CD4⁺ Т-клеток ВИЧ-инфицированных больных с дискордантным ответом иммунной системы на АРТ можно получить при исследовании лимфатических узлов.

В лимфатических узлах доля пролиферирующих CD4⁺ Т-лимфоцитов была в 3 раза выше в группе ИН относительно показателя в группе ИО (рис. 4), что подтвердило данные, полученные при исследовании крови. Среди CD4⁺ Т-клеток лимфоузлов наибольшую митотическую активность проявляли клетки центральной памяти: 7.67 и 2.48 % у ИН и ИО соответственно. Среди CD4⁺ Т-лимфоцитов эффекторной памяти эти значения составили 6.43 и 1.95 % ($P < 0.05$) у ИН и ИО соответственно. Таким образом, у ИН в лимфатических узлах, как и в крови, наблюдается повышенная по сравнению с соответствующим уровнем ИО пролиферация CD4⁺ Т-лимфоцитов. Однако высокая митотическая активность иммунокомпетентных клеток не приводит к эффективному восстановлению их численности.

Известно, что гомеостаз CD4⁺ Т-клеток зависит от микроокружения, формирующегося в лимфоидной ткани (Gretz et al., 1996). Гистологическое исследование лимфоузлов ВИЧ-инфицированных пациентов показало, что в обеих группах (ИН и ИО) наблюдаются выраженные

морфологические изменения (рис. 5). Лимфатические узлы увеличены в размерах и имеют плотную консистенцию. Их гистоархитектоника нарушена, зоны определяются нечетко. Кортикальное вещество представлено узкой областью, расположенной под капсулой. Паракортикальная зона значительно сокращена или отсутствует. Мозговое вещество лимфоузла нередко располагается прямо под кортикальной зоной. Иногда оно уменьшено в размерах. Капсула и трабекулы утолщены. Обращает на себя внимание прорастание соединительной ткани со стороны капсулы в глубину узла (рис. 6). Краевой и корковые синусы часто склерозированы. Со стороны ворот наблюдается значительное разрастание соединительной ткани, захватывающей мозговое вещество и частично паракортикальную зону лимфоузла. Необходимо отметить, что фиброзирование лимфатических узлов является одним из значимых патологических нарушений при ВИЧ-инфекции. У пациентов, хронически инфицированных ВИЧ, степень фиброирования лимфоидной ткани обратно пропорциональна размеру пула CD4⁺ Т-клеток в Т-зависимых зонах лимфоузла (Schacker et al., 2002; Diaz et al., 2011). Такая связь, вероятно, обуславливается разрушением трехмерной структуры лимфоидных органов при ВИЧ-инфекции. В норме микроокружение, сформированное в лимфоузле, предоставляет CD4⁺ Т-клеткам цитокины и факторы роста, обеспечивает им сигналы, необходимые для выжива-

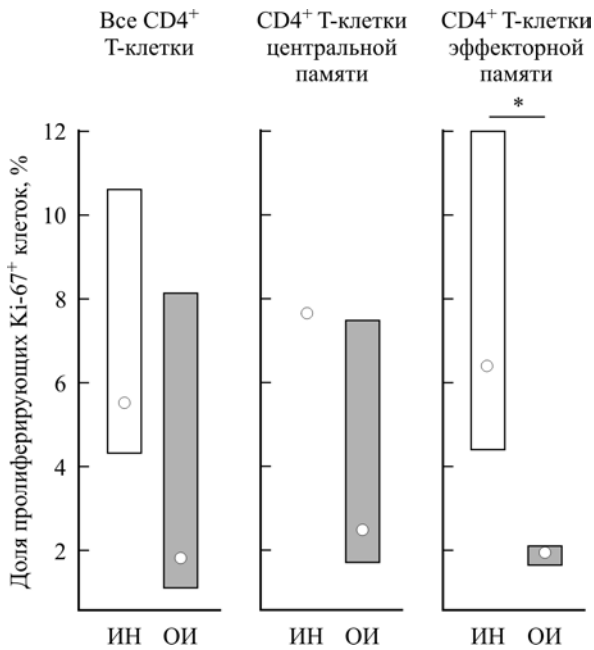


Рис. 4. Относительное количество делящихся CD4⁺ Т-лимфоцитов в лимфоузлах ВИЧ-инфицированных больных.

На рисунке представлены: медиана значений (кружочки), интерквартильные размахи («коробочки»). ИН — иммунологические неответчики на терапию, ОИ — иммунологические ответчики на лечение; звездочка — $P < 0.05$.

ния, созревания и пролиферации (Gretz et al., 1996, 1997). При ВИЧ-инфекции хроническая иммунная активация и воспаление провоцируют фиброзирование лимфоидных тканей, ограничивая возможность иммунной системы реконструировать пул CD4⁺ Т-лимфоцитов (Estes, 2009; Zeng et al., 2011). Ранее нами было показано, что у больных с дискордантным ответом на АРТ по сравнению с ВИЧ-инфицированными пациентами, давшими стандартный ответ на лечение, повышен уровень активации иммунной системы (Shmagel et al., 2014) и развивается более выраженное системное воспаление (Шмагель и др., 2017). Не исключено, что у пациентов группы ИН эти

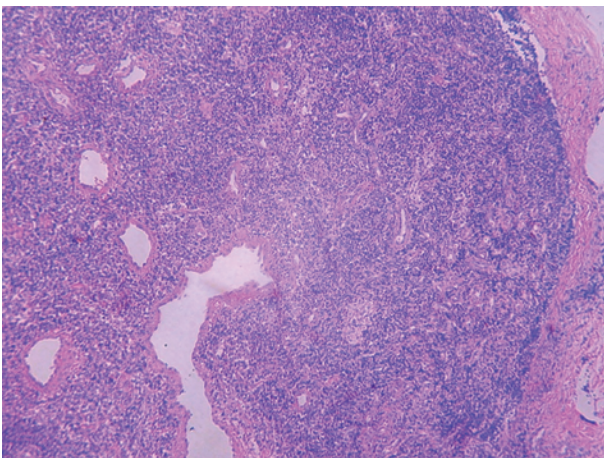


Рис. 5. Гистоархитектоника лимфоузла при ВИЧ-инфекции. Больной 3.5. Отмечается нарушение гистоархитектоники лимфоузла. Зоны лимфоузла определяются нечетко: паракортикальная зона не является, а мозговое вещество уменьшено в размерах. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 10×.

факторы могут приводить к дополнительным нарушениям в микроокружении лимфоидных органов, поддерживающих продуктивное деление и жизнеспособность CD4⁺ Т-клеток, в том числе лимфоцитов центральной памяти, необходимых для регенерации иммунной системы ВИЧ-инфицированных больных.

Таким образом, у ВИЧ-инфицированных лиц с дискордантным ответом иммунной системы на АРТ CD4⁺ Т-лимфоциты интенсивно пролиферируют, однако это деление оказывается непродуктивным. На фоне большой митотической активности развивается истощение CD4⁺ Т-клеток центральной памяти — основной субпопуляции, поддерживающей численность CD4⁺ Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции. Наблюдается асимметрия деления CD4⁺ Т-клеток, которая может быть связана с гибелью части дочерних лимфоцитов и соответственно снижением продуктивности пролиферации. Изменение гистоархитектоники лимфоидных органов и фиброзирование лимфоузлов под действием интенсивной иммунной активации и воспаления также негативно влияют на жизнеспособность CD4⁺ Т-клеток ВИЧ-инфицированных больных с дискордантным ответом иммунной системы на АРТ. В сочетании с прямыми эффектами вируса отмеченные факторы, по-видимому, способны дестабилизировать гомеостаз CD4⁺ Т-клеток, что приводит к нарушению процесса восстановления их численности у больных с неэффективным ответом иммунной системы на лечение. Представленные данные свидетельствуют о том, что при ВИЧ-инфекции интенсификация процессов деления CD4⁺ Т-клеток центральной памяти может приводить к нарушению жизнеспособности лимфоцитов, определяющих регенераторный потенциал иммунной системы. Это требует дальнейшего изучения состояния пролиферирующих элементов у пациентов с дискордантным ответом иммунитета на АРТ.

Авторы выражают благодарность Майклу Ледерману и сотрудникам Лаборатории инфекционных болезней (Западный резервный университет Кейза, США), а также сотрудникам лаборатории Тима Шакера (Университет Миннесоты, США) за помощь в проведении исследования.

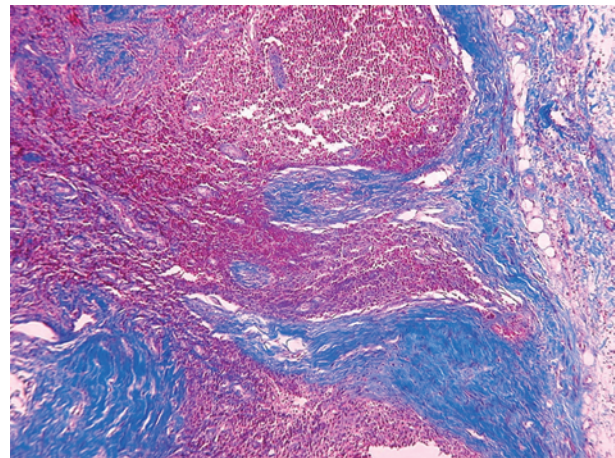


Рис. 6. Склероз в корковом веществе лимфоузла при ВИЧ-инфекции.

Больной 3.8. Капсула и трабекулы утолщены, отмечается прорастание соединительной ткани (окрашена синим) со стороны капсулы в глубь узла. Окраска по Массону. Об. 10×.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 17-54-30006).

Список литературы

Шмагель К. В., Королевская Л. Б., Сайдакова Е. В., Шмагель Н. Г., Черешнев В. А., Марголис Л., Энтони Д., Ледерман М. 2017. Коинфекция вирусом гепатита С у ВИЧ-инфицированных пациентов с дискордантным ответом Т-клеток CD4⁺ на антиретровирусную терапию вызывает выраженное системное воспаление. Докл. РАН. 477 (2) : 253—256. (Shmagel K. V., Korolevskaya L. B., Saidakova E. V., Shmagel N. G., Chereshevnev V. A., Margolis L., Anthony D., Lederman M. 2017. HCV coinfection of the HIV-infected patients with discordant CD4⁺ T-cell response to antiretroviral therapy leads to intense systemic inflammation. Dokl. Biol. Sci. 477 (1) : 244—247.)

Anthony K. B., Yoder C., Metcalf J. A., DerSimonian R., Orenstein J. M., Stevens R. A., Falloon J., Polis M. A., Lane H. C., Sereiti I. 2003. Incomplete CD4 T cell recovery in HIV-1 infection after 12 months of highly active antiretroviral therapy is associated with ongoing increased CD4 T cell activation and turnover. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 33 : 125—133.

Appay V., Almeida J. R., Sauce D., Autran B., Papagno L. 2007. Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. Exp. Gerontol. 42 : 432—437.

Autran B., Carcelain G., Li T. S., Gorochov G., Blanc C., Renaud M., Durali M., Mathez D., Calvez V., Leibowitch J., Katlama C., Debre P. 1999. Restoration of the immune system with anti-retroviral therapy. Immunol. Lett. 66 : 207—211.

Bocharov G., Luzyanina T., Cupovic J., Ludewig B. 2013. Asymmetry of cell division in CFSE-based lymphocyte proliferation analysis. Front. Immunol. 4 : 264.

Boyman O., Purton J. F., Surh C. D., Sprent J. 2007. Cytokines and T-cell homeostasis. Curr. Opin. Immunol. 19 : 320—326.

Curtsinger J. M., Lins D. C., Mescher M. F. 1998. CD8⁺ memory T cells (CD44^{high}, Ly-6C⁺) are more sensitive than naive cells to (CD44^{low}, Ly-6C⁻) to TCR/CD8 signaling in response to antigen. J. Immunol. 160 : 3236—3243.

Diaz A., Garcia F., Mozos A., Caballero M., Leon A., Martinez A., Gil C., Plana M., Gallart T., Gatell J. M., Alos L. 2011. Lymphoid tissue collagen deposition in HIV-infected patients correlates with the imbalance between matrix metalloproteinases and their inhibitors. J. Infect. Dis. 203 : 810—813.

Di Mascio M., Paik C. H., Carrasquillo J. A., Maeng J. S., Jang B. S., Shin I. S., Srinivasula S., Byrum R., Neria A., Kopp W., Catafamo M., Nishimura Y., Reimann K., Martin M., Lane H. C. 2009. Noninvasive *in vivo* imaging of CD4 cells in simian-human immunodeficiency virus (SHIV)-infected nonhuman primates. Blood. 114 : 328—337.

Ernst B., Lee D. S., Chang J. M., Sprent J., Surh C. D. 1999. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. Immunity. 11 : 173—181.

Estes J. D. 2009. Role of collagen deposition in lymphatic tissues and immune reconstruction during HIV-1 and SIV infections. Curr. HIV/AIDS Rep. 6 : 29—35.

Focosi D., Bestagno M., Burrone O., Petrini M. 2010. CD57⁺ T lymphocytes and functional immune deficiency. J. Leukoc. Biol. 87 : 107—116.

Gaardbo J. C., Hartling H. J., Gerstoft J., Nielsen S. D. 2012. Incomplete immune recovery in HIV infection: mechanisms, relevance for clinical care, and possible solutions. Clin. Develop. Immunol. 2012 : 670957.

Gretz J. E., Anderson A. O., Shaw S. 1997. Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex. Immunol. Rev. 156 : 11—24.

Gretz J. E., Kaldjian E. P., Anderson A. O., Shaw S. 1996. Sophisticated strategies for information encounter in the lymph

node: the reticular network as a conduit of soluble information and a highway for cell traffic. J. Immunol. 157 : 495—499.

Lapadula G., Cozzi-Lepri A., Marchetti G., Antinori A., Chiodera A., Nicastrì E., Parruti G., Galli M., Gori A., Monforte A., Study I. F. 2013. Risk of clinical progression among patients with immunological nonresponse despite virological suppression after combination antiretroviral treatment. AIDS. 27 : 769—779.

Lederman M. M., Calabrese L., Funderburg N. T., Clagett B., Medvik K., Bonilla H., Gripshover B., Salata R. A., Taege A., Lissgaris M., McComsey G. A., Kirchner E., Baum J., Shive C., Asaad R., Kalayjian R. C., Sieg S. F., Rodriguez B. 2011. Immunologic failure despite suppressive antiretroviral therapy is related to activation and turnover of memory CD4 cells. J. Infect. Dis. 204 : 1217—1226.

Massanella M., Negro E., Clotet B., Blanco J. 2013. Immunodiscordant responses to HAART — mechanisms and consequences. Expert Rev. Clin. Immunol. 9 : 1135—1149.

Okoye A., Meier-Schellersheim M., Brenchley J. M., Hagen S. I., Walker J. M., Rohankhedkar M., Lum R., Edgar J. B., Planer S. L., Legasse A., Sylwester A. W., Piatak M., Lifson J. D., Maino V. C., Sodora D. L., Douek D. C., Axthelm M. K., Grossman Z., Picker L. J. 2007. Progressive CD4⁺ central memory T cell decline results in CD4⁺ effector memory insufficiency and overt disease in chronic SIV infection. J. Exp. Med. 204 : 2171—2185.

Palmer B. E., Blyveis N., Fontenot A. P., Wilson C. C. 2005. Functional and phenotypic characterization of CD57⁺CD4⁺ T cells and their association with HIV-1-induced T cell dysfunction. J. Immunol. 175 : 8415—8423.

Piconi S., Trabattoni D., Gori A., Parisotto S., Magni C., Meraviglia P., Bandera A., Capetti A., Rizzardini G., Clerici M. 2010. Immune activation, apoptosis, and Treg activity are associated with persistently reduced CD4⁺ T-cell counts during antiretroviral therapy. AIDS. 24 : 1991—2000.

Piketetty C., Castiel P., Belec L., Batisse D., Si Mohamed A., Gilquin J., Gonzalez-Canali G., Jayle D., Karmochkine M., Weiss L., Aboulker J. P., Kazatchkine M. D. 1998. Discrepant responses to triple combination antiretroviral therapy in advanced HIV disease. AIDS. 12 : 745—750.

Rogers P. R., Dubey C., Swain S. L. 2000. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. J. Immunol. 164 : 2338—2346.

Schacker T. W., Nguyen P. L., Beilman G. J., Wolinsky S., Larson M., Reilly C., Haase A. T. 2002. Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. J. Clin. Invest. 110 : 1133—1139.

Sennerstam R. 1988. Partition of protein (mass) to sister cell pairs at mitosis: a re-evaluation. J. Cell Sci. 90 : 301—306.

Shmagel K. V., Saidakova E. V., Korolevskaya L. B., Shmagel N. G., Chereshevnev V. A., Anthony D., Lederman M. M. 2014. Influence of hepatitis C virus coinfection on CD4(+) T cells of HIV-infected patients receiving HAART. AIDS. 28 : 2381—2388.

Tajbakhsh S., Rocheteau P., Le Roux I. 2009. Asymmetric cell divisions and asymmetric cell fates. Annu. Rev. Cell Develop. Biol. 25 : 671—699.

Tan R., Westfall A. O., Willig J. H., Mugavero M. J., Saag M. S., Kaslow R. A., Kempf M. C. 2008. Clinical outcome of HIV-infected antiretroviral-naïve patients with discordant immunologic and virologic responses to highly active antiretroviral therapy. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 47 : 553—558.

Trepel F. 1974. Number and distribution of lymphocytes in man. A critical analysis. Klin. Wochenschr. 52 : 511—515.

Wang L., Robb C. W., Cloyd M. W. 1997. HIV induces homing of resting T lymphocytes to lymph nodes. Virology. 228 : 141—152.

Wherry E. J. 2011. T cell exhaustion. Nat. Immunol. 12 : 492—499.

Zeng M., Smith A. J., Wietgreffe S. W., Southern P. J., Schacker T. W., Reilly C. S., Estes J. D., Burton G. F., Silvestri G., Lifson J. D., Carlis J. V., Haase A. T. 2011. Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections. J. Clin. Invest. 121 : 998—1008.

CD4⁺ T-CELL CYCLING IN HIV-INFECTED PATIENTS WITH THE DISCORDANT IMMUNOLOGIC RESPONSE TO THE ANTIRETROVIRAL THERAPY

E. V. Saidakova,^{1,2} * K. V. Shmagel,^{1,2} L. B. Korolevskaya,¹ N. G. Shmagel,³ N. I. Gulyaeva,⁴
G. G. Freind,⁴ S. V. Yuzhaninova,⁴ V. A. Chereshnev^{1,2}

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, 614081,

² Department of Biology, Perm State University, Perm, 614990,

³ Perm Regional Center for Protection against AIDS and Infectious Diseases, Perm, 614065, and

⁴ Department of General Medicine, E. A. Wagner Perm State Medical University, Perm, 614000;

* e-mail: radimira@list.ru

In HIV-infected patients the discordant response to antiretroviral therapy (ART) is characterized by a CD4⁺ T-lymphocyte counts recovery violation against the background of the effective viral replication suppression. The reason for the ineffective CD4⁺ T-cell regeneration during the treatment remains unknown. Two groups of HIV-positive patients were examined: patients with a discordant response to ART (n = 20) and individuals with a standard response to the therapy (n = 21). In peripheral blood and lymph nodes of HIV-positive subjects the number of cycling (Ki-67⁺), senescent (CD57⁺) and exhausted (PD-1⁺) CD4⁺ T-lymphocytes of different maturation subtypes has been determined. After *in vitro* stimulation the index of asymmetric division of CD4⁺ T-cells was analyzed. Histological examination of lymph node tissue was carried out. It was shown that in individuals with a discordant immunologic response to ART, intensive CD4⁺ T-cell cycling does not result in their counts increase neither in the peripheral blood nor in the secondary lymphoid organs. In patients with impaired recovery of the immune system, the growth in cell cycling was accompanied by the accumulation of the exhausted CD4⁺ T-lymphocytes. Moreover, in patients with a discordant response to ART, the asymmetric division of the *in vitro* stimulated CD4⁺ T cells was demonstrated. The revealed disturbances can cause the ineffective restoration of the immune system during ART in HIV-infected patients.

Key words: antiretroviral therapy, cycling, HIV-infection, discordant response, lymph node, peripheral blood, T-lymphocytes