

УДК 616-097:578-06:616-002:612.017.1

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.15-19

Углубление дефицита наивных Т-клеток CD4⁺ у пациентов с ВИЧ-инфекцией при коинфицировании вирусом гепатита С

К.В. Шмагель¹, Л.Б. Королевская¹, Е.В. Сайдакова¹, Н.Г. Шмагель^{1,2}¹ Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН (614081, г. Пермь, ул. Голева, 13),² Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (614088, г. Пермь, ул. Архитектора Связева, 21)

У пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), коинфицированных вирусом гепатита С и получающих антиретровирусную терапию, в большей степени, чем у ВИЧ-моноинфицированных субъектов, выражен дефицит наивных Т-клеток CD4⁺. Показано, что их недостаточность связана с уровнем активации иммунитета, активностью гепатита и степенью нарушения целостности печеночного барьера для микробных продуктов кишечника. Разные по степени зрелости наивные Т-клетки CD4⁺ имеют различную зависимость от процессов, вызванных гепатитом. Деструкция печеночной ткани больше влияет на недавних выходцев из тимуса. Рост концентрации бактериального липополисахарида в крови сопровождается снижением численности зрелых наивных Т-лимфоцитов CD4⁺. Полученные данные не раскрывают механизмы формирования дефицита наивных CD4⁺-клеток при коинфекции.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека, гепатит С, наивные Т-лимфоциты, иммунная активация

Известно, что у пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) и коинфицированных вирусом гепатита С (ВГС), при антиретровирусной терапии может нарушаться восстановление численности Т-лимфоцитов CD4⁺ [7, 9, 11]. Ранее, оценивая изменения субпопуляционного состава клеток CD4⁺ и CD8⁺ на фоне приема препаратов, мы установили наличие у лиц с ВИЧ/ВГС-коинфекцией более глубокого по сравнению с ВИЧ-моноинфицированными субъектами дефицита численности Т-клеток CD4⁺ в крови [6]. Обнаруженная недостаточность числа этих лимфоцитов была связана с сокращением субпопуляции наивных клеток. Данный феномен может иметь важное фундаментальное и практическое значение, так как именно наивные (не имевшие контакта с антигеном) лимфоциты считаются основой для поддержания широты распознающего репертуара адаптивной иммунной системы [5]. Целью настоящей работы стал поиск возможных причин снижения численности Т-клеток CD4⁺ у пациентов с ВИЧ/ВГС-коинфекцией.

Материал и методы

Объектом исследования были ВИЧ-зараженные пациенты с ВГС-коинфекцией и без нее, получавшие антиретровирусную терапию не менее двух лет. При этом ВИЧ/ВГС-коинфицированные субъекты не принимали интерфероны. Кроме того, была сформирована группа, состоявшая из неинфицированных условно здоровых добровольцев. План работы был одобрен этическим комитетом Пермского краевого центра по борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями. Все обследованные дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Всего в наблюдение было включено 62 человека (табл.).

Шмагель Константин Владимирович – д-р мед. наук, зав. лабораторией экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов – филиала ПФИЦ УрО РАН; e-mail: shmagel@iegm.ru

По таким характеристикам, как возраст, продолжительность инфицирования, длительность приема антиретровирусных препаратов, число Т-клеток CD4⁺ до начала лечения, различий между двумя группами ВИЧ-инфицированных установлено не было. Однако при сравнении групп ВИЧ⁺ВГС⁺ и ВИЧ⁺ВГС⁻ были обнаружены существенные отличия по полу и пути инфицирования. У коинфицированных пациентов преобладал парентеральный путь заражения, в то время, как моноинфицированные субъекты (в основном женщины) заражались преимущественно половым путем (табл.). Заражений путем гомосексуальных контактов не зарегистрировано.

Забор крови (27 мл) проводили натошак из локтевой вены в пробирки типа Vacutainer, содержавшие этилендиаминтетрауксусную кислоту. Мононуклеары крови получали путем центрифугирования в градиенте плотности диаколла («Диа-М»): $\rho = 1,077$. Предварительно кровь разводили в два раза средой RPMI-1640 (Sigma). Наслаивали два объема разведенной крови на один объем диаколла. Центрифугирование осуществляли в течение 40 мин. при 400g. Выделенные клетки собирали, дважды отмывали средой RPMI-1640, подсчитывали в камере Горяева. Лимфатические узлы были взяты у восьми ВИЧ-инфицированных: по четыре человека из каждой клинической группы. От четырех неинфицированных индивидуумов лимфоузлы были получены в результате диагностических процедур, выполненных по медицинским показаниям (материал любезно предоставлен лабораторией М. Ледермана – Западный резервный университет Кейза, Кливленд, США). Паховые лимфатические узлы забирали под местной анестезией. Из них в присутствии коллагеназы выделяли клетки, которые затем отмывали. Часть мононуклеарных клеток крови и клетки лимфатических узлов консервировали в инактивированной эмбриональной телячьей сыворотке (Gibco), содержащей 10% диметилсульфоксида (MP Biochemical),

Таблица

Клиническая характеристика обследованных

Показатель		Клиническая группа		
		ВИЧ+ВГС+	ВИЧ+ВГС-	ВИЧ-ВГС-
Число обследованных, абс.		21	21	20
в т.ч. мужчин, абс. (%)		10 (48)	4 (19)	8 (40)
Возраст, лет*		33 (30–36)	34 (31–42)	31 (26–35)
Пути передачи ВИЧ, абс. (%)	инъекционный	16 (76)	1 (5)	–
	половой	5 (24)	20 (95)	–
Продолжительность ВИЧ-инфекции, лет*		11 (8–12)	9 (7–11)	–
Продолжительность АРВТ**, лет*		4 (2–5)	4 (3–5)	–
Число клеток CD4 ⁺ , мкл ⁻¹ *	до лечения	140 (120–170)	170 (140–180)	–
	на момент обследования	450 (400–540)	540 (450–610)	1050 (660–1280)
Уровень ВИЧ в крови, копий/мл		<50	<50	–
Уровень ВГС в крови, log ₁₀ копий/мл*		6,25 (2,88–6,62)	<2,28***	<2,28***

* Медиана с интерквартильным размахом (в скобках).

** АРВТ – антиретровирусная терапия.

*** Предел чувствительности метода.

замораживали до -80°C , а затем переносили в жидкий азот.

Уровни вирусной нагрузки ВИЧ и ВГС определяли соответственно методом разветвленной ДНК-гибридизации наборами Versant HIV-1 RNA 3.0 assay b на анализаторе Versant 440 (Siemens) и методом полимеразной цепной реакции в реальном времени наборами «ОТ Гепатоген С количественно» (ДНК-Технология) на термоциклере iCycler IQ5 (BioRad). Активности аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы исследовали кинетическим методом наборами Thermo Fisher. Концентрации бактериального липополисахарида оценивали хромогенным набором Uden (Голландия).

Определение численности клеток CD4⁺ проводили на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием набора моноклональных антител Becton Dickinson Immunocytometry Systems Simultest. Это исследование выполнено на свежих незамороженных клетках. По его результатам рассчитывали абсолютное и относительное количество Т-лимфоцитов CD4⁺ в цельной крови. Сравнительный анализ субпопуляционного состава Т-лимфоцитов крови проводили после размораживания клеток (хранившихся в жидком азоте) и стабилизации их при комнатной температуре. Исследование выполняли на приборе LSR II (Becton Dickinson). Для идентификации клеточных субпопуляций использовали меченные флуорохромами моноклональные антитела анти-CD3-PerCP, анти-CD4-AF700, анти-CD27-APC-Cy7, анти-CD45RA-APC, анти-CCR7-PE-Cy7. Наивными Т-лимфоцитами считали клетки CD4⁺, несущие маркеры CD27, CD45RA, CCR7. Наивные Т-клетки CD4⁺, экспрессирующие CD31 (анти-CD31-FITC), относили к так называемым недавним тимическим мигрантам (RTE – recent thymic emigrants). Дополнительно для оценки уровня активации Т-лимфоцитов CD4⁺ на их поверхности с помощью

антител (анти-HLA-DR-FITC и анти-CD38-PE) были определены маркеры активации. Все диагностические антитела, а также изотипические контроли были получены от Becton Dickinson (США).

Статистические расчеты проводили с использованием непараметрических методов. Для сравнения показателей двух групп применяли способ Манна-Уитни. Вычисляли медианы, интерквартильные и 10–90 %-ные размахи. Корреляционный анализ выполняли по методу Спирмена. Проведение статистического анализа и оформление графиков осуществляли с использованием компьютерной программы Statistica 6.

Результаты исследования

Установленный нами ранее факт углубления под влиянием ВГС-коинфицирования снижения наивных CD4⁺-лимфоцитов крови при ВИЧ-инфекции мог быть отражением перераспределения иммунокомпетентных клеток между лимфоидными органами и циркуляторным руслом. Для проверки гипотезы о том, что наличие выраженного дефицита наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ у ВИЧ/ВГС-коинфицированных субъектов – не локальный феномен, выявленный только для клеток крови, было проведено сравнение содержания этих клеточных элементов в крови и лимфатических узлах. В результате было установлено, что при ВИЧ/ВГС-коинфекции, как в крови, так и в лимфатических узлах развивается существенная недостаточность численности наивных Т-лимфоцитов (рис. 1). Количество наивных элементов и в крови, и в лимфоидных органах у лиц с сочетанной инфекцией было статистически значимо снижено по сравнению с показателями при моноинфекции и у неинфицированных. Эти данные свидетельствуют о том, что дефицит наивных Т-клеток у коинфицированных больных можно считать

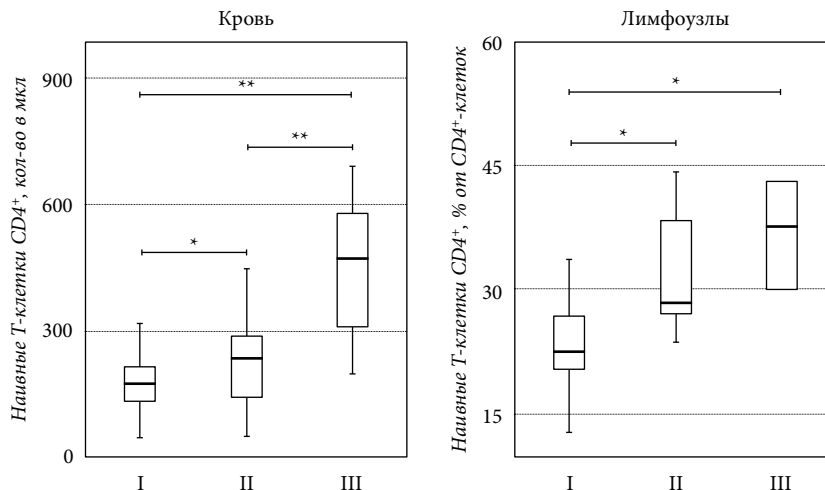


Рис. 1. Развитие дефицита наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ у ВИЧ-инфицированных, коинфицированных ВГС:

представлены медианы (горизонтальные линии), интерквартильные интервалы (прямоугольники) и 10–90%-ные размахи (вертикальные отрезки) содержания клеток CD4⁺ в крови и лимфатических узлах в трех клинических группах: I – ВИЧ/ВГС-коинфекция, II – ВИЧ-моноинфекция, III – неинфицированные субъекты; **p*<0,05; ***p*<0,001 (U-тест Манна-Уитни).

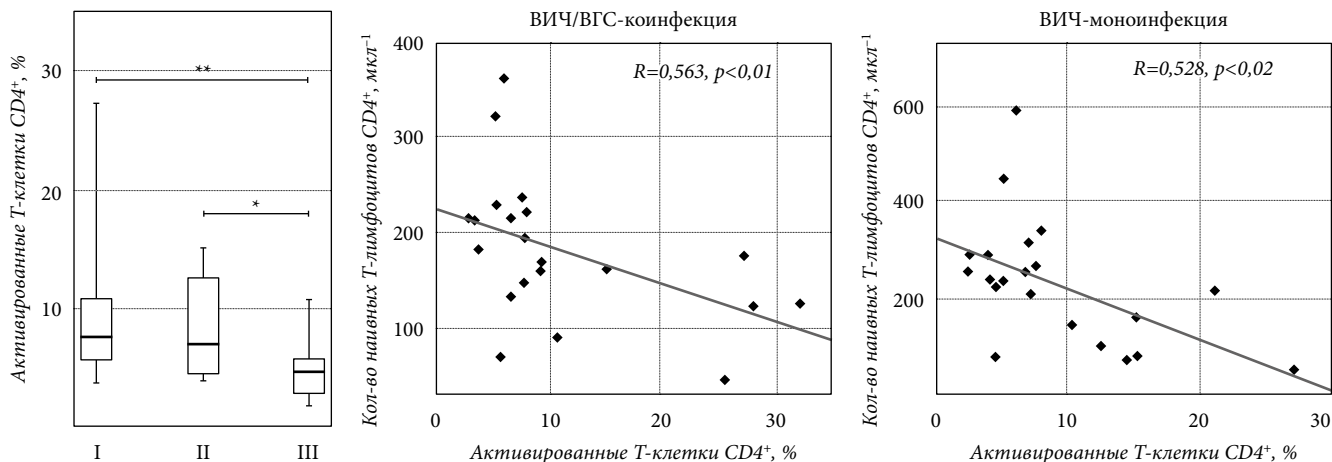


Рис. 2. Активация Т-лимфоцитов CD4⁺ и ее связь с количеством наивных Т-клеток CD4⁺ у ВИЧ-инфицированных пациентов, коинфицированных ВГС:

на графике слева отражены уровни активации (одновременная экспрессия CD38 и HLA-DR) Т-лимфоцитов CD4⁺ в трех клинических группах: I – ВИЧ/ВГС-коинфекция, II – ВИЧ-моноинфекция, III – неинфицированные субъекты. Представлены медианы (горизонтальные линии), интерквартильные интервалы (прямоугольники) и 10–90%-ные размахи (вертикальные отрезки). **p*<0,05; ***p*<0,001 (U-тест Манна-Уитни); на двух графиках справа – результаты корреляционного анализа зависимости числа наивных Т-клеток CD4⁺ от уровня активации Т-лимфоцитов CD4⁺ в двух группах ВИЧ-инфицированных пациентов: точки – индивидуальные значения, прямая – линия регрессии (коэффициенты корреляции и показатели статистической значимости получены с использованием метода ранговых корреляций Спирмена).

истинным, распространяющимся на всю периферическую адаптивную иммунную систему.

Далее возник вопрос о причинах формирования недостаточности этих лимфоцитов. В качестве одного из предположений рассматривалась негативная роль иммунной активации, которая, как известно, способна не только вызывать гибель клеток [2], но и приводить к повышению уровня летальности пациентов [4]. На основании экспрессии маркеров HLA-DR и CD38 был проведен анализ активации CD4⁺-клеток (рис. 2). Было установлено, что у ВИЧ-инфицированных, как коинфицированных, так и не коинфицированных ВГС, активация Т-лимфоцитов CD4⁺ крови существенно превышала значение данного показателя у людей без инфекции. Вместе с тем, между группами ВИЧ+ВГС⁺

и ВИЧ+ВГС⁻ статистически значимых различий выявлено не было. Однако то, что при ВИЧ-инфекции иммунная активация способна оказывать отрицательное влияние на численность наивных Т-клеток, было обнаружено после проведения корреляционного анализа зависимости числа наивных CD4⁺-лимфоцитов крови от содержания Т-клеток CD4⁺, одновременно экспрессирующих HLA-DR и CD38 (рис. 2). Таким образом, мы подтвердили предположение о возможной роли иммунной активации в снижении количества наивных Т-лимфоцитов. Однако ее приоритетного значения в формировании дефицита данной субпопуляции клеток при ВИЧ/ВГС-коинфекции обнаружено не было.

Еще одной причиной уменьшения численности наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ может быть сокращение

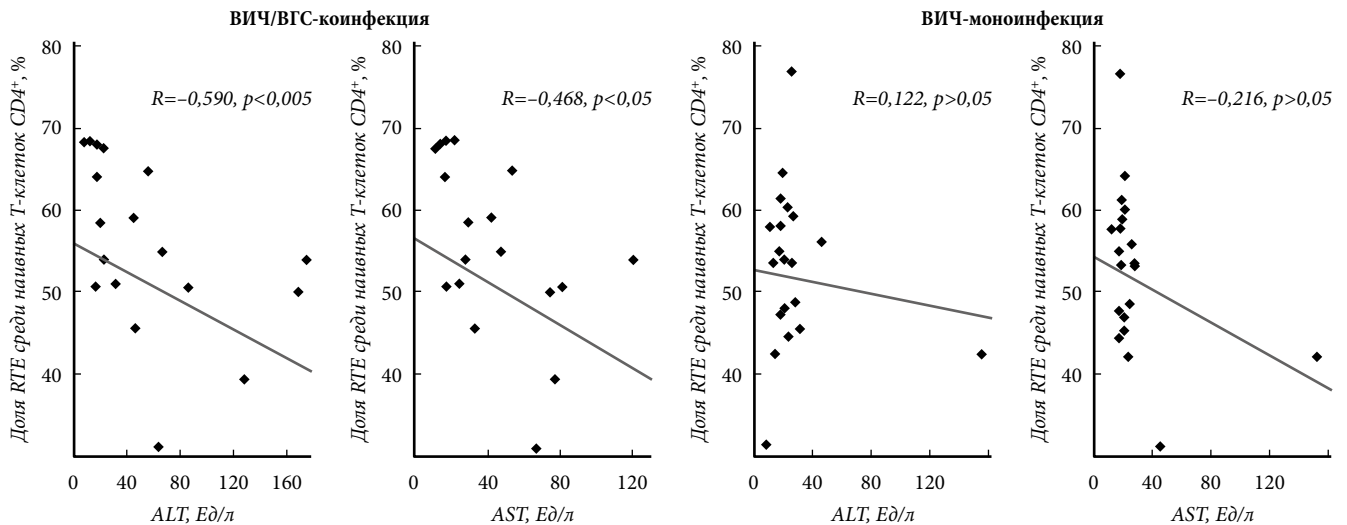


Рис. 3. Зависимость относительного содержания тимических мигрантов среди наивных Т-клеток CD4⁺ от активности трансаминаз у ВИЧ-инфицированных пациентов, коинфицированных ВГС:

результаты корреляционного анализа зависимости доли RTE в пуле наивных Т-клеток CD4⁺ от уровня активности аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST) плазмы крови в двух группах ВИЧ-инфицированных: точки – индивидуальные значения, прямая – линия регрессии (коэффициенты корреляции и показатели статистической значимости получены с использованием метода ранговых корреляций Спирмена).

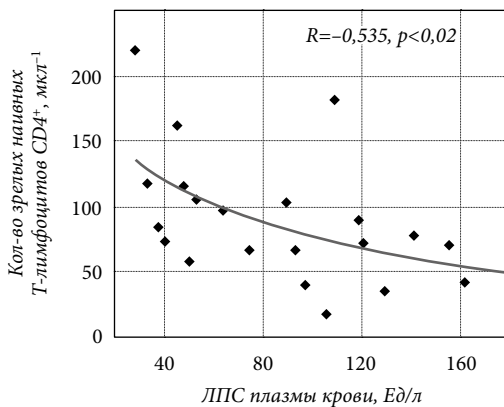


Рис. 4. Зависимость численности зрелых наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ от уровня липополисахарида (ЛПС) плазмы крови у пациентов с ВИЧ/ВГС-коинфекцией:

зрелые наивные Т-лимфоциты CD4⁺ – наивные CD4⁺-клетки, не несущие на маркер CD31; точки – индивидуальные значения (коэффициенты корреляции и показатели статистической значимости получены с использованием метода ранговых корреляций Спирмена).

продуктивной функции вилочковой железы. Ранее при исследовании уровня эписомальных кольцевых ДНК, образующихся при реарранжировке генов, кодирующих цепи Т-клеточного рецептора, мы обнаружили у ВИЧ/ВГС-коинфицированных пациентов более слабый выход из тимуса Т-клеток CD4⁺ по сравнению с показателем больных, зараженных только ВИЧ [8]. Причина этого явления до сих пор остается невыясненной. Нами была проверена гипотеза о влиянии активности гепатита на продукцию Т-лимфоцитов CD4⁺ вилочковой железой. Корреляционный анализ между уровнями трансаминаз с одной стороны, и относительным содержанием RTE в пуле наивных CD4⁺-клеток крови – с другой, показал, что при ВИЧ/ВГС-коинфекции между этими показателями существует обратная статистически значимая зависимость (рис. 3). Следует также отметить, что

у ВИЧ-моноинфицированных аналогичных связей обнаружено не было.

Ранее мы установили, что у ВИЧ/ВГС-коинфицированных из-за нарушения целостности печеночного барьера усилена по сравнению с ВИЧ-моноинфицированными пациентами микробная транслокация из кишечника [10]. При этом ведущим маркером, отражающим поступление бактериальных продуктов в кровоток, оказался бактериальный липополисахарид. Исходя из этого, мы проанализировали связь численности наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ крови с концентрацией микробного продукта. Корреляционный анализ не выявил зависимости между содержанием RTE и уровнем липополисахарида. Однако проверка связи между числом зрелых наивных Т-клеток CD4⁺ (утративших маркер CD31) и концентрацией в плазме липополисахарида показала существование статистически значимой зависимости между ними в группе ВИЧ⁺ВГС⁺ (рис. 4). У лиц с ВИЧ-моноинфекцией такая зависимость отсутствовала. Эти данные свидетельствуют о том, что при ВИЧ/ВГС-коинфекции на уровень наивных Т-лимфоцитов помимо активности гепатита может оказывать влияние поступление в кровоток бактериальных продуктов из кишечника.

Обсуждение полученных данных

Представленный феномен углубления дефицита наивных Т-клеток CD4⁺ у ВИЧ-инфицированных пациентов, коинфицированных ВГС, ранее уже отмечен в литературе [9]. Однако это было продемонстрировано только на лимфоцитах крови. Проведенное нами исследование лимфатических узлов позволило установить, что сокращение числа этих клеток при ВИЧ/ВГС-коинфекции характерно для всей иммунной системы. Причины данного явления до сих пор не рассматривались. Мы впервые обратили внимание на то, что при ВИЧ/

ВГС-коинфекции в большей степени, чем при ВИЧ-моиноинфекции может нарушаться продуктивная функция вилочковой железы [8]. Здесь следует отметить, что для субъектов с изолированной ВГС-инфекцией возможность развития дисфункции тимуса была известна еще с 2005 г., что было зафиксировано по результатам определения в крови кольцевых ДНК Т-клеточного рецептора [1]. Позднее этот факт был подтвержден другими авторами на основе оценки численности RTE путем определения маркера CD31 на поверхности наивных лимфоцитов [3, 12]. Была также установлена негативная связь между количеством наивных CD4⁺-клеток крови и уровнем аланинаминотрансферазы [12].

Важно отметить, что в нашей работе снижение численности наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ у ВИЧ/ВГС-коинфицированных коррелировало с уровнем активации иммунитета, а не с активностью печеночных ферментов. Разделение наивных CD4⁺-клеток на основе маркера CD31 на незрелые (CD31⁺) и зрелые (CD31⁻) выявило разную степень их зависимости от патогенетических индикаторов гепатита. Изменение численности RTE было связано с трансаминазами плазмы крови, отражающими степень повреждения печени. Содержание зрелых наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ зависело от уровня бактериального липополисахарида в плазме крови, который определяется микробной транслокацией из кишечника и состоянием печеночного барьера.

Приведенные данные демонстрируют не только неоднородность пула наивных Т-клеток CD4⁺, но и разную чувствительность входящих в их состав субпопуляций к различным факторам. Понимание этого требует усложнения экспериментальных подходов и аккуратности в теоретических умозаключениях. Вместе с тем, утяжеление дефицита наивных Т-лимфоцитов CD4⁺ при ВИЧ/ВГС-коинфекции можно считать актуальной проблемой, так как этот феномен сопровождается ускоренным старением организма и сокращением времени жизни пациентов.

Работа выполнена при поддержке Комплексной программы УРО РАН; номер госрегистрации темы: АААА-А18-118030790046-9.

Литература / References

1. Cianci R., Pinti M., Nasi M. [et al.]. Impairment of recent thymic emigrants in HCV infection // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2005. Vol. 18, No. 4. P. 723–728.
2. Funderburg N., Luciano A.A., Jiang W. [et al.]. Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis // *PLoS One.* 2008. Vol. 3. P. e1915.
3. Hartling H.J., Gaardbo J.C., Ronit A. [et al.]. Impaired thymic output in patients with chronic hepatitis C virus infection // *Scand. J. Immunol.* 2013. Vol. 78, No. 4. P. 378–386.
4. Hunt P.W., Sinclair E., Rodriguez B. [et al.]. Gut epithelial barrier dysfunction and innate immune activation predict mortality in treated HIV infection // *J. Infect. Dis.* 2014. Vol. 210, No. 8. P. 1228–1238.
5. Kohler S., Thiel A. Life after the thymus: CD31⁺ and CD31⁻ human naive CD4⁺ T-cell subsets // *Blood.* 2009. Vol. 113, No. 4. P. 769–774.
6. Korolevskaya L.B., Shmagel K.V., Saidakova E.V. [et al.]. Effect of hepatitis C virus coinfection on the content of CD4(+) and CD8(+) T cell subpopulations in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. Vol. 161, No. 2. P. 281–283.

7. Potter M., Oduyungbo A., Yang H. [et al.]. Impact of hepatitis C viral replication on CD4⁺ T-lymphocyte progression in HIV-HCV coinfection before and after antiretroviral therapy // *AIDS.* 2010. Vol. 24, No. 12. P. 1857–1865.
8. Saidakova E.V., Korolevskaya L.B., Shmagel N.G. [et al.]. Role of hepatitis C virus coinfection in violation of productive thymic function in HIV-infected patients under immunologically inefficient antiretroviral therapy // *Med. Immunology (Rus.).* 2013. Vol. 15, No. 6. P. 543–552.
9. Santin M., Mestre M., Shaw E. [et al.]. Impact of hepatitis C virus coinfection on immune restoration during successful antiretroviral therapy in chronic human immunodeficiency virus type 1 disease // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008. Vol. 27, No. 1. P. 65–73.
10. Shmagel K.V., Saidakova E.V., Shmagel N.G. [et al.]. Systemic inflammation and liver damage in HIV/hepatitis C virus coinfection // *HIV Med.* 2016. Vol. 17, No. 8. P. 581–589.
11. Taye S., Lakew M. Impact of hepatitis C virus co-infection on HIV patients before and after highly active antiretroviral therapy: an immunological and clinical chemistry observation, Addis Ababa, Ethiopia // *BMC Immunol.* 2013, Vol. 14. doi: 10.1186/1471-2172-14-23.
12. Yonkers N.L., Sieg S., Rodriguez B., Anthony D.D. Reduced naive CD4 T cell numbers and impaired induction of CD27 in response to T cell receptor stimulation reflect a state of immune activation in chronic hepatitis C virus infection // *J. Infect. Dis.* 2011. Vol. 203, No. 5. P. 635–645.

Поступила в редакцию 06.09.2018.

DEFICIT DEEPENING OF NAIVE T-CELLS CD4⁺ IN PATIENTS WITH HIV INFECTION WHEN CO-INFECTED WITH HEPATITIS C VIRUS

K.V. Shmagel¹, L.B. Korolevskaya¹, E.V. Saydakova¹, N.G. Shmagel^{1,2}

¹ Perm Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (13 Goleva St. Perm 614081 Russian Federation), AIDS Prevention Centre (21 Arhitektora Sviyazeva St. Perm 614088 Russian Federation)

Objective. In patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV) and co-infected with the hepatitis C virus (HCV), CD4⁺ T-cell deficiency is more pronounced compared to HIV mono-infected subjects, due to a reduction in their naive subpopulation. This work is devoted to establishing the causes of the development of insufficiency of these cells.

Methods. Two groups of HIV-infected persons were examined: HIV+HCV+ (n=21) and HIV+HCV- (n=21) receiving antiretroviral drugs for more than two years (HIV level <50 copies/ml). Anti-HCV therapy was not conducted. The control group (n=20) consisted of uninfected volunteers. The number of naive CD4⁺ T cells, the proportion of these included RTE (recent thymic emigrants; CD31⁺), the content of activated CD4⁺ T-lymphocytes (HLA-DR⁺ CD38⁺), the concentration in the blood of bacterial lipopolysaccharide, the activity of transaminases.

Results. Immune activation negatively affected the number of naive CD4⁺ T cells in both groups of HIV-infected. However, only in the HIV+HCV+ group the inverse relationship between the activity of transaminases, on the one hand, and the proportion of RTE on the other hand ($R_{ALT-RTE} = -0.590$, $p < 0.005$ and $R_{AST-RTE} = -0.468$, $p < 0.05$), and also the level of lipopolysaccharide and the number of mature (CD31⁻) naive CD4⁺ T-lymphocytes ($R = -0.535$, $p < 0.02$).

Conclusions. Thus, hepatitis activity and increased microbial translocation from the intestine in HIV/HCV co-infection may have a negative effect on the number of naive CD4⁺ T cells. Naive elements of varying degrees of maturity are apparently affected. Specific mechanisms for the formation of a deficit of naive CD4⁺ T-lymphocytes in HIV/HCV-co-infected individuals have yet to be established.

Keywords: human immunodeficiency virus, hepatitis C, naive T-lymphocytes, immune activation

Pacific Medical Journal, 2018, No. 4, p. 15–19.