

Субпопуляционный состав регуляторных Т-лимфоцитов у пациентов с ВИЧ-инфекцией при эффективной антиретровирусной терапии

Черешнев В.А.^{1,2,3}, Сайдакова Е.В.^{1,2}, Королевская Л.Б.¹, Шмагель Н.Г.^{1,4}, Шмагель К.В.^{1,2}

¹ Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН)
Россия, 614081, г. Пермь, ул. Ленина, 13а

² Пермский государственный национальный исследовательский университет (ПГНИУ)
Россия, 614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15

³ Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН)
Россия, 620049, г. Екатеринбург ул. Первомайская, 106

⁴ Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (Центр СПИД)
Россия, 614065, г. Пермь, ул. Архитектора Связева, 21

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Причина, по которой у инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) пациентов, получающих высокоактивную антиретровирусную терапию (АРТ), сохраняется повышенный уровень активации иммунной системы, остается не до конца понятной. Регуляторные Т-лимфоциты способны контролировать иммунную активацию, однако под влиянием инфекционного процесса их количество может изменяться.

Цель. Оценка численности и субпопуляционного состава регуляторных Т-лимфоцитов ВИЧ-позитивных пациентов, принимающих эффективную АРТ.

Материалы и методы. Количество CD4⁺ Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺) и регуляторных Т-клеток (Трег; CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺) определяли методом проточной цитофлюориметрии. Субпопуляционный состав регуляторных Т-лимфоцитов оценивали по уровню экспрессии FOXP3. Состояние активации Т-клеток устанавливали по одновременной экспрессии молекул CD38 и HLA-DR.

Результаты. Показано, что по сравнению со здоровыми людьми у ВИЧ-позитивных больных наблюдается дефицит CD4⁺ Т-лимфоцитов: их численность остается сниженной, несмотря на эффективную АРТ. Вместе с тем абсолютное количество регуляторных CD4⁺ Т-клеток у зараженных ВИЧ людей падает незначительно. Более того, основная доля Трег в их крови представлена лимфоцитами с высоким уровнем экспрессии FOXP3, что соответствует фенотипу клеток, обладающих наибольшей супрессорной активностью. Однако на этом фоне в крови ВИЧ-инфицированных лиц сохраняется повышенное относительное количество активированных CD4⁺ Т-лимфоцитов.

Заключение. У ВИЧ-инфицированных пациентов, которым была своевременно назначена терапия и у которых лечение привело к эффективному подавлению вирусной нагрузки ВИЧ и удовлетворительному приросту числа периферических CD4⁺ Т-лимфоцитов, поддерживается сравнительно большой пул периферических регуляторных Т-клеток. Однако этих лимфоцитов оказывается недостаточно для полного контроля над иммунной активацией, развивающейся на фоне хронической лентивирусной инфекции.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, антиретровирусная терапия, CD4⁺ Т-лимфоциты, иммунная активация, регуляторные Т-клетки.

✉ Сайдакова Евгения Владимировна, e-mail: radimira@list.ru.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-54-30006.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (протокол № 31 от 02.03.2017, IRB00008964).

Для цитирования: Черешнев В.А., Сайдакова Е.В., Королевская Л.Б., Шмагель Н.Г., Шмагель К.В. Субпопуляционный состав регуляторных Т-лимфоцитов у пациентов с ВИЧ-инфекцией при эффективной антиретровирусной терапии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 247–256. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-247-256>.

УДК 616.98:578.28HIV]-085.37:616-097
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-247-256>

Regulatory T-lymphocyte subsets in patients with HIV-infection receiving highly active antiretroviral therapy

Chereshnev V.A.^{1,2,3}, Saidakova E.V.^{1,2}, Korolevskaya L.B.¹, Shmagel N.G.^{1,4}, Shmagel K.V.^{1,2}

¹ Perm Federal Research Center Ural Branch Russian Academy of Sciences
13a, Lenin Str., Perm, 614990, Russian Federation

² Perm State University
15, Bukirev Str., Perm, 614990, Russian Federation

³ Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of Russian Academy of Sciences
106, Pervomayskaya Str., Yekaterinburg, 620049, Russian Federation

⁴ Perm Regional Center for Protection against AIDS and Infectious Diseases
21, Sviyazeva Str., Perm, 614065, Russian Federation

ABSTRACT

Background. The reason why HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy (HAART) suffer from the increased immune activation remains elusive. Regulatory T-cells (Treg) are able to control immune activation, but their quantity may vary due to the infection. The aim of this work was to estimate the number and subsets of Tregs in HIV-positive patients receiving virologically effective HAART.

Materials and methods. The CD4⁺ T-lymphocyte (CD3⁺CD4⁺) and Treg (CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺) quantities were determined by flow cytometry. Treg subsets were assessed based on the FOXP3 expression level. The state of T-cell activation was established according to the simultaneous expression of CD38 and HLA-DR molecules.

Results. It was shown that HIV-positive patients compared to healthy people have reduced CD4⁺ T-lymphocyte counts despite virologically effective HAART. At the same time in HIV-infected people, Treg absolute numbers were only slightly decreased. Moreover, the major part of Treg pool in their blood consisted of lymphocytes with a high level of FOXP3 expression that corresponded to the phenotype of cells with the highest suppressor activity. However, an increased relative amount of activated CD4⁺ T-lymphocytes was retained in the HIV-infected individuals' blood.

Conclusion. In HIV-infected patients who received HAART in time and whose treatment resulted in an effective HIV viral load suppression and a satisfactory CD4⁺ T-cell counts increase, a relatively large pool of peripheral Tregs is maintained. However, these lymphocytes are not enough to fully control immune activation that develops against the background of chronic lentivirus infection.

Key words: HIV infections, antiretroviral therapy, highly active; CD4-positive T-lymphocytes, lymphocyte activation; T-lymphocytes, regulatory.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. This work was supported by the RFBR grant No. 17-54-30006.

Compliance with the principles of ethics. The study approved by the local ethics committee under Perm Regional Center for Protection against AIDS and Infectious Diseases (Protocol No. 31 of 02.03.2017, IRB00008964).

For citation: Chereshev V.A., Saidakova E.V., Korolevskaya L.B., Shmagel N.G., Shmagel K.V. Regulatory T-lymphocyte subsets in patients with HIV-infection receiving highly active antiretroviral therapy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 247–256. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-247-256>.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время хроническая иммунная активация рассматривается в качестве ведущей причины развития иммунодефицита и синдрома приобретенного иммунодефицита у инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) больных [1]. Степень активации иммунной системы позволяет прогнозировать скорость опустошения пула CD4⁺ Т-лимфоцитов и смерть пациентов более точно, чем любой другой показатель, включая количество вируса в крови зараженных [1, 2]. Хотя высокоактивная антиретровирусная терапия (АРТ) вызывает снижение иммунной активации у ВИЧ-инфицированных субъектов [3], лечение не способно привести данный показатель к уровню здоровых людей [4], а сохраняющаяся иммунная активация влечет за собой сокращение продолжительности жизни больных. Причина поддержания высокого уровня активации иммунной системы у получающих терапию ВИЧ-инфицированных лиц остается не до конца понятной.

Регуляторные Т-лимфоциты (Тreg) способны контролировать активацию клеток врожденного и адаптивного иммунитета, что определяет их важную роль в сохранении гомеостаза иммунной системы [5]. Дефицит Тreg приводит к увеличению уровня иммунной активации и может вызвать развитие таких заболеваний, как ревматоидный артрит, диабет 1-го типа, миастения, аутоиммунный гепатит и т.д. [6]. Необходимо отметить, что Тreg являются одной из субпопуляций CD4⁺ Т-клеток. Как и хелперные Т-лимфоциты, регуляторные клетки могут быть инфицированы ВИЧ [7]. Более того, так как у ВИЧ-позитивных больных развивается дефицит CD4⁺ Т-лимфоцитов, у них следует ожидать и снижение численности Тreg. Однако данные об изменениях, происходящих в пуле регуляторных Т-клеток при ВИЧ-инфекции, очень противоречивы. Целью настоящей

работы явилась оценка численности и субпопуляционного состава регуляторных Т-лимфоцитов ВИЧ-позитивных пациентов, принимающих вирусологически эффективную АРТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принял участие 41 человек. Пациенты были разделены на две клинические группы: 1) ВИЧ-инфицированные больные, более 2 лет получающие АРТ ($n = 21$); 2) относительно здоровые добровольцы без признаков ВИЧ-инфекции ($n = 20$). От каждого пациента было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Периферическую кровь объемом до 50 мл забирали натошак из кубитальной вены. Вирусную нагрузку ВИЧ в плазме крови больных определяли методом разветвленной ДНК-гибридизации Versant 3 HIV-1 RNA 3,0 assay b на анализаторе Versant 440 (Siemens, Германия) согласно инструкции производителя. Численность CD4⁺ Т-лимфоцитов крови оценивали с использованием коммерческого набора Immunocytometry Systems (BDIS) Simultest™ (Becton Dickinson, США) на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США).

Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования периферической крови в градиенте плотности диаколла (1,077 г/мл, Диа-М, Россия). Полученные иммуноциты окрашивали анти-CD3-AF700, анти-CD71-BV421, анти-HLA-DR-FITC, анти-CD38-PE (Becton Dickenson, США), анти-FoxP3-PE (eBioscience™, США), анти-CD4-Qdot605 антителами и красителем LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, США). Активированный статус клеток оценивали по одновременной экспрессии молекул HLA-DR и CD38 на поверхности Т-лимфоцитов. В качестве Тreg рассматривали CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺ Т-клетки. Определяли относительное и абсолютное количество

CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim} и CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high} субпопуляций Treg. Логика гейтирования регуляторных Т-лимфоцитов, представленная на рис. 1, является модифицированным методом, предложенным М. Miyara и соавт. [8]. Исследование уровня активации иммунной системы и субпопуляционного

состава Treg ВИЧ-инфицированных и здоровых пациентов осуществляли на проточном цитофлуориметре Fortessa (Becton Dickinson, США).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием непараметрических методов.

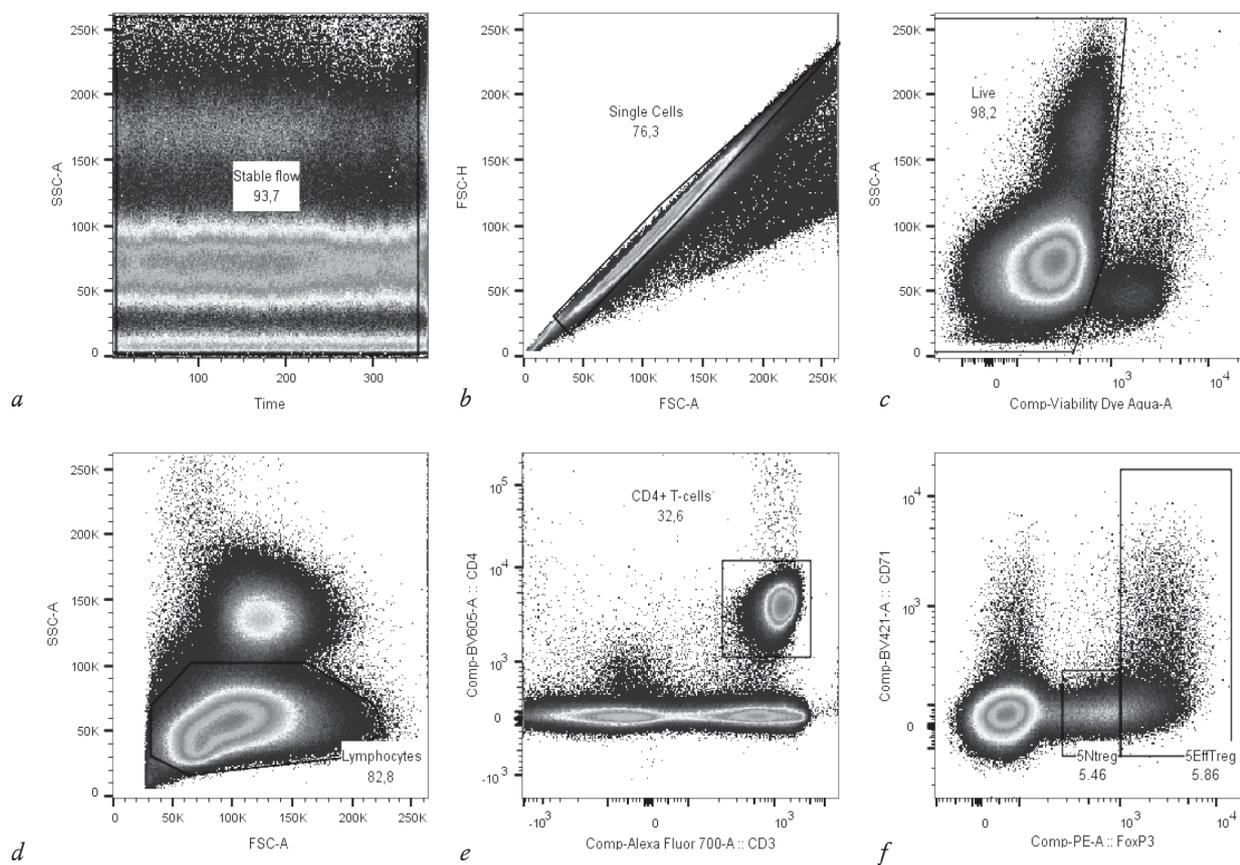


Рис. 1. Логика гейтирования покоящихся и активированных регуляторных Т-лимфоцитов: *a* – определение данных, полученных при стабильном потоке проточной жидкости; *b* – выделение гейта одиночных клеток; *c* – исключение из анализа нежизнеспособных клеток; *d* – определение гейта лимфоцитов; *e* – выделение гейта CD3⁺CD4⁺ Т-клеток; *f* – анализ количества покоящихся (CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim}) и активированных (CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high}) регуляторных Т-лимфоцитов

Fig. 1. Gating on resting and activated regulatory T-cells: *a* – extracting of stable flow data; *b* – gating on single cells; *c* – exclusion of dead cells from the analysis; *d* – lymphocyte gating; *e* – CD3⁺CD4⁺ T-cell gating; *f* – resting (CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim}) and activated (CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high}) regulatory T-cell analysis

В выборке рассчитывали медиану и интерквартильный размах $Me (Q_{25} - Q_{75})$ (ИКР: 25–75 перцентиль). Достоверность различий между группами устанавливали с помощью *U*-критерия Вилкоксона – Манна – Уитни. Корреляционный анализ выполняли, рассчитывая коэффициент корреляции рангов Спирмена *r*. Проведение статистических расчетов и построение графиков осуществляли с использованием программ Stata11SE и Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинические характеристики обследованных пациентов суммированы и представлены в таблице.

Группы были сопоставимы по возрасту и половому составу, что позволило исключить влияние этих параметров на получаемые результаты. Вирусная нагрузка ВИЧ в плазме крови всех инфицированных субъектов находилась на уровне ниже порога детекции современных тест-систем (<50 копий/мл).

Т а б л и ц а
Т a b l e

Клиническая характеристика пациентов Patients' clinical characteristics		
Показатель Indicator	ВИЧ-инфицированные больные HIV-infected patients	Здоровые добровольцы Healthy volunteers
Обследовано пациентов, <i>n</i> Examined patients, <i>n</i>	21	20
Возраст, годы, <i>Me</i> (Q_{25} – Q_{75}) Age, years	38 (34–42)*	34 (30–40)
Мужчины, % Men, %	43 (9 out of 21)	40 (8 out of 20)
Половой путь передачи ВИЧ, абс. (%) Sexual transmission of HIV, abs. (%)	20 (95)	–
Длительность инфекции, годы, <i>Me</i> (Q_{25} – Q_{75}) Duration of infection, years	10 (6–13)	–
Продолжительность АРТ, годы, <i>Me</i> (Q_{25} – Q_{75}) Duration of ART, years	4,5 (3,2–6,5)	–
Численность CD4 ⁺ Т-клеток до АРТ, мкл ⁻¹ , <i>Me</i> (Q_{25} – Q_{75}) Number of CD4 ⁺ T-cells before ART, mcl ⁻¹	160 (69–185)	–
Численность CD4 ⁺ Т-клеток на момент исследования, мкл ⁻¹ , <i>Me</i> (Q_{25} – Q_{75}) Number of CD4 ⁺ T-cells at the time of the study, mcl ⁻¹	534 (438–656) <i>p</i> < 0,001	878 (778–1231)
Уровень ВИЧ в крови, копии/мл HIV level in blood, copies/ml	< 50**	–

Примечание. ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; АРТ – антиретровирусная терапия.

*медiana и интерквартильный размах, статистические расчеты выполнены по методу Манна – Уитни; ** предел чувствительности тест-систем.

Note. HIV – human immunodeficiency virus; ART – antiretroviral therapy.

*median and interquartile range, statistical calculations done using Mann – Whitney test; ** sensitivity threshold of the test systems.

Несмотря на это, у ВИЧ-положительных больных по сравнению со здоровыми людьми было повышено относительное количество CD4⁺ Т-лимфо-

цитов, одновременно экспрессирующих молекулы CD38 и HLA-DR, что соответствовало активированному фенотипу клеток (рис. 2).

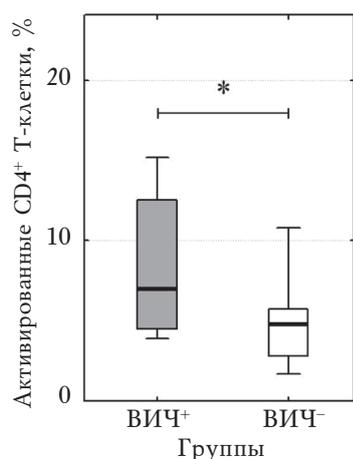


Рис. 2. Активация CD4⁺ Т-лимфоцитов крови у ВИЧ-инфицированных пациентов с подавленной репликацией ВИЧ и здоровых людей: по оси абсцисс – клинические группы, по оси ординат – содержание CD38⁺HLA-DR⁺CD4⁺ Т-клеток в пуле CD4⁺ Т-лимфоцитов. Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), межквартильные интервалы (прямоугольники) и 10–90%-е размахи (вертикальные отрезки). Достоверность различий между группами определялась по методу Манна – Уитни, **p* < 0,05

Fig. 2. CD4⁺ T-cell activation in HIV-infected patients with suppressed viral load and in healthy controls: relative quantities of CD38⁺HLA-DR⁺CD4⁺ T-cells are shown in two patient groups: HIV-positive and HIV-negative. Medians, interquartile ranges, and upper and lower ranges are presented. **p* < 0.05 (Mann – Whitney Test)

Также у ВИЧ-инфицированных лиц по сравнению с пациентами контрольной группы было статистически значимо (*p* < 0,001) снижено число CD4⁺ Т-клеток периферической крови

(рис. 3, а). При этом два параметра были взаимосвязаны: у пациентов, зараженных ВИЧ, была обнаружена обратная корреляционная зависимость между процентным содержанием CD4⁺HLA-

DR⁺CD38⁺ Т-лимфоцитов и абсолютным количеством периферических CD4⁺ Т-клеток ($r = -0,437$; $p < 0,05$). Таким образом, несмотря на подавленную вирусную нагрузку, у ВИЧ-инфицированных больных, принимающих АРТ, со-

храняется активированное состояние иммунной системы, которое может неблагоприятно сказываться на численности периферических CD4⁺ Т-клеток и, как следствие, ускорять развитие заболевания.

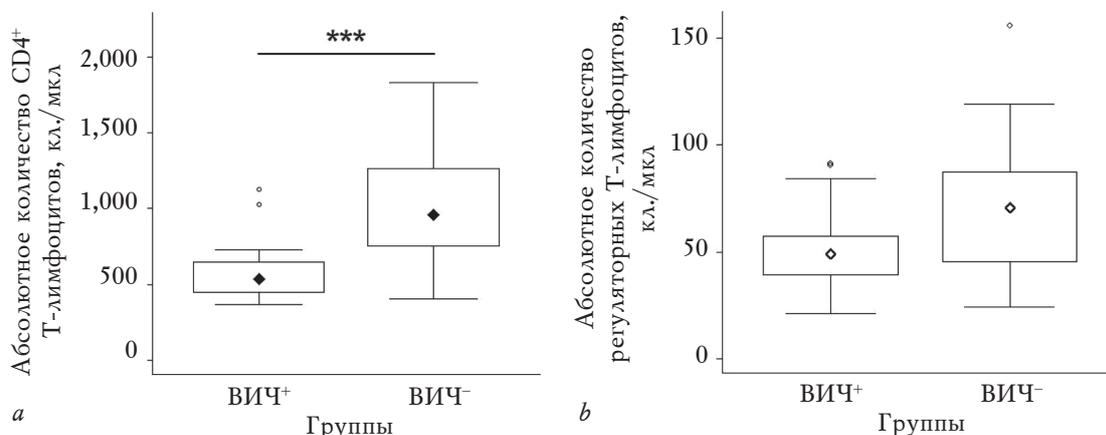


Рис. 3. Абсолютное количество CD4⁺ Т-лимфоцитов и регуляторных Т-клеток в крови ВИЧ-инфицированных пациентов с подавленной репликацией ВИЧ и здоровых людей: по оси абсцисс – клинические группы, по оси ординат – абсолютное количество CD4⁺ Т-лимфоцитов, кл./мкл. Показаны медианы, интерквартильные интервалы, верхние и нижние границы размахов, выпадающие значения. *** $p < 0,001$ (U-тест Манна – Уитни)

Fig. 3. CD4⁺ T-cell and regulatory T-cell absolute counts in the blood of HIV-infected patients with suppressed viral load and in healthy people: relative quantities of CD4⁺ T-cells are shown in two patient groups – HIV-positive and HIV-negative. Medians, interquartile ranges, and upper and lower ranges, and outliers are presented. *** $p < 0.001$ (Mann – Whitney Test)

При исследовании регуляторных Т-лимфоцитов – клеток, способных подавлять иммунную активацию, показано, что их абсолютное количество у ВИЧ-инфицированных пациентов не отличалось статистически значимо ($p > 0,05$) от такового неинфицированных субъектов (рис. 3, б). Вместе с тем были отмечены различия в субпопуляционном составе этих клеток у представителей двух групп. Показано, что у ВИЧ-позитивных субъектов по сравнению с неинфицированными добровольцами развивается дефицит CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim} Т-клеток: их абсолютное количество в крови составило, соответственно, 25 кл./мкл (ИКР: 18–30) и 46 кл./мкл (ИКР: 30–57). Различие между группами было статистически значимо ($p < 0,001$). При этом число CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high} Тreg не отличалось ($p > 0,05$) у пациентов двух групп: ВИЧ-инфицированные – 26 кл./мкл (ИКР: 19–33); относительно здоровые люди – 25 кл./мкл (ИКР: 20–38). Таким образом, на фоне терапевтически контролируемой ВИЧ-инфекции сокращается размер пула CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim} Т-клеток. В то же время абсолютное количество CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high} Тreg остается на уровне, характерном для здоровых людей, что обеспечивает сравнительно высокую общую численность регуляторных Т-лимфоцитов

в крови ВИЧ-инфицированных больных, принимающих АРТ.

Важно отметить, что для эффективного контроля над активацией CD4⁺ Т-клеток имеет значение не столько абсолютное количество регуляторных Т-лимфоцитов, сколько их численное соотношение с клетками-мишенями [9]. Поэтому на следующем этапе исследования нами была проведена оценка относительного количества Тreg в общем пуле CD4⁺ Т-лимфоцитов. Было показано, что по сравнению со здоровыми людьми у ВИЧ-позитивных пациентов, принимающих АРТ, увеличена доля Тreg. Так, у лиц, зараженных ВИЧ, регуляторные Т-клетки составили 9,0% (ИКР: 7,5–11,4), а у людей без ВИЧ-инфекции – 6,8% (ИКР: 5,2–9,7) от численности периферических CD4⁺ Т-лимфоцитов, $p < 0,02$. У ВИЧ-позитивных субъектов повышенное процентное содержание Тreg было обусловлено статистически значимым ($p < 0,001$) увеличением относительного количества клеток CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high} субпопуляции (рис. 4). Их доля среди общего пула CD4⁺ Т-лимфоцитов составила 4,4% (ИКР: 3,3–6,5) и 2,7% (ИКР: 2,2–3,8) в группах ВИЧ+ и ВИЧ– соответственно. При этом относительное количество

CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim} клеток среди CD4⁺ Т-лимфоцитов не имело статистически значимых отличий ($p > 0,05$) при сравнении их уровней в группах ВИЧ-инфицированных и здоровых людей. Таким образом, у ВИЧ-позитивных лиц, принимающих АРТ, увеличивается относительное количество регуляторных Т-клеток, а именно CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high} Т-лимфоцитов.

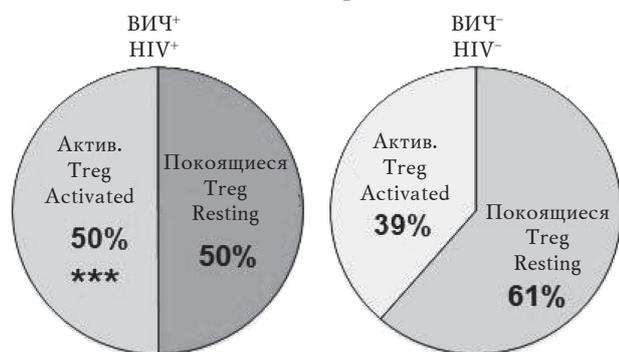


Рис. 4. Распределение регуляторных Т-лимфоцитов между субпопуляциями покоящихся и активированных клеток у ВИЧ-инфицированных пациентов с подавленной репликацией вируса и здоровых людей: пул регуляторных Т-лимфоцитов (100%) разделен на покоящиеся (CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim}) и активированные (CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high}) клетки по уровню экспрессии ядерного белка FOXP3. *** $p < 0,001$ (U -тест Манна – Уитни)

Fig. 4. Regulatory T-cell distribution between resting and activated cell subsets in HIV-infected patients with suppressed viral load and in healthy people: regulatory T-cell pool (100%) was divided into resting (CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim}) and activated (CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high}) lymphocytes according to the FOXP3 expression. *** $p < 0,001$ (Mann – Whitney Test)

ОБСУЖДЕНИЕ

Современные литературные источники представляют противоречивые данные о роли регуляторных Т-лимфоцитов в контроле над хронической иммунной активацией при ВИЧ-инфекции. Некоторые работы демонстрируют наличие отрицательной корреляционной связи между количеством Treg и уровнем активации иммунной системы в хроническую стадию заболевания у «наивных» пациентов, не получающих АРТ [10–12]. Другие, напротив, сообщают о прямой зависимости [13, 14] либо ее отсутствии [15, 16] между двумя параметрами. В ряде исследований было показано, что у ВИЧ-позитивных больных, принимающих антиретровирусные препараты, большое процентное содержание регуляторных Т-лимфоцитов ассоциировано с более низким уровнем активации Т-клеток [17, 18]. На основе

этих данных можно заключить, что Treg играют важную роль в контроле над остаточной активацией Т-лимфоцитов у ВИЧ-позитивных пациентов, находящихся на терапии. В то же время этих клеток может быть недостаточно для того, чтобы повлиять на генерализованную иммунную активацию во время хронической, неконтролируемой посредством АРТ, ВИЧ-инфекции [19].

Несоответствие данных, получаемых при исследовании регуляторных Т-лимфоцитов, вероятно, связано с применением различных методологических подходов к определению субпопуляций Treg. В литературе описан целый спектр маркерных молекул, характеризующих те или иные функциональные особенности этой группы лимфоцитов. Среди них CD25, CD127, FOXP3, CD39, CD45RA, CCR4, HLA-DR, CD161 и т.д. [20]. В настоящей работе при определении фенотипа регуляторных Т-клеток нами была использована стратегия, впервые предложенная М. Miyaga и соавт. [8]. В своей работе авторы показали, что регуляторные CD4⁺ Т-лимфоциты можно разделить на две субпопуляции, отличающиеся по экспрессии молекулы FOXP3. Согласно полученным ими данным, CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high} субпопуляция представлена регуляторными Т-клетками, среди которых повышено содержание пролиферирующих (Ki-67+) и активированных (HLA-DR+) элементов. Более того, из всех Т-лимфоцитов именно FOXP3^{high} CD4⁺ Т-клетки характеризуются наиболее высоким уровнем экспрессии CTLA-4 – молекулы, участвующей в контроле супрессорной активности Treg [21]. Эта особенность определяет наиболее выраженную по сравнению с другими FOXP3-позитивными клетками, способность CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high} Treg подавлять активацию других иммунных клеток [8]. М. Miyaga и соавт. назвали CD3⁺CD4⁺FOXP3^{high} Т-лимфоциты «активированными» регуляторными Т-клетками [8]. В свою очередь, CD3⁺CD4⁺FOXP3^{dim} Т-лимфоциты были определены как «покоящиеся» клетки-предшественники «активированных» Treg [8].

В настоящей работе мы показали, что по сравнению со здоровыми людьми у ВИЧ-позитивных больных, принимающих АРТ, повышено процентное содержание Treg среди CD4⁺ Т-лимфоцитов. Увеличение относительного количества этих клеток было опосредовано повышением доли «активированных» регуляторных Т-лимфоцитов на фоне незначительного снижения процентного содержания «покоящихся» Treg. На наш взгляд, в условиях терапевтически контролируемой ВИЧ-инфекции увеличение относительного количества регуляторных Т-клеток с активированным

фенотипом согласуется с потребностью организма в контроле над активацией иммунной системы. Мы предполагаем, что хроническая иммунная активация, опосредованная ВИЧ-инфекцией, создает постоянный запрос на дифференцировку «покоящихся» Тreg в «активированные» Т-лимфоциты, сокращая размер пула клеток-предшественников и увеличивая количество эффекторных лимфоцитов. Однако этого, вероятно, оказывается недостаточно, и уровень активации CD4⁺ Т-клеток ВИЧ-инфицированных больных, принимающих АРТ, остается повышенным.

Следует отметить, что относительное количество регуляторных Т-клеток имеет значение при подавлении активности CD4⁺ Т-лимфоцитов, численность которых сокращается на фоне ВИЧ-инфекции. Однако для контроля над функциями иммуноцитов, число которых значительно превышает размер популяции Тreg (CD8⁺ Т-лимфоциты, клетки врожденного иммунитета и т.д.), важным показателем является абсолютное количество регуляторных Т-клеток. В настоящем исследовании было показано, что у ВИЧ-инфицированных больных, принимающих АРТ, дефицит CD4⁺ Т-лимфоцитов не приводит к значительному сокращению абсолютного количества регуляторных Т-клеток. Более того, численность «активированных» Тreg, обладающих наибольшей супрессорной активностью, не отличается у ВИЧ-позитивных больных и лиц без ВИЧ-инфекции.

Так как среди обследованных нами пациентов не отмечено клинических признаков аутоиммунных заболеваний, которые проявляются при дефиците и нарушении супрессорной функции Тreg [22], можно заключить, что размер пула регуляторных Т-лимфоцитов ВИЧ-позитивных больных, получающих АРТ, является достаточным для контроля иммунного ответа по отношению к аутоантигенам. Вместе с тем даже сравнительно высокая численность этих клеток в крови ВИЧ-инфицированных больных, принимающих терапию, может оказаться недостаточной для полного контроля над развивающимся системным воспалением.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У ВИЧ-инфицированных пациентов, которым была своевременно назначена терапия и у которых лечение привело к эффективному подавлению вирусной нагрузки ВИЧ и удовлетворительному приросту числа периферических CD4⁺ Т-лимфоцитов, поддерживается сравнительно большой пул периферических регуляторных Т-клеток. Однако этих лимфоцитов оказывается недостаточно для полного контроля над иммун-

ной активацией, развивающейся на фоне хронической лентивирусной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Giorgi J.V., Hultin L.E., McKeating J.A., Johnson T.D., Owens B., Jacobson L.P. et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J. Infect. Dis.* 1999; 179 (4): 859–870. DOI: 10.1086/314660. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10068581>. <http://jid.oxfordjournals.org/content/179/4/859.full.pdf>.
2. Deeks S.G., Kitchen C.M., Liu L., Guo H., Gascon R., Narvaez A.B. et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4⁺ T-cell changes independent of viral load. *Blood.* 2004; 104 (4): 942–947. DOI: 10.1182/blood-2003-09-3333. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15117761>.
3. Evans T.G., Bonnez W., Soucier H.R., Fitzgerald T., Gibbons D.C., Reichman R.C. Highly active antiretroviral therapy results in a decrease in CD8(+) T cell activation and preferential reconstitution of the peripheral CD4(+) T cell population with memory rather than naive cells. *Antivir. Res.* 1998; 39 (3): 163–173. DOI: 10.1016/S0166-3542(98)00035-7. <Go to ISI>://WOS:000076934000002.
4. Neuhaus J., Jacobs D.R., Baker J.V., Calmy A., Duprez D., La Rosa A. et al. Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *J. Infect. Dis.* 2010; 201 (12): 1788–1795. DOI: 10.1086/652749. <Go to ISI>://WOS:000277687900003.
5. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22: 531–562. DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032588>.
6. Zhang W., Sharma R., Ju S., He X., Tao Y., Tsuneyama K. et al. Deficiency in regulatory T cells results in development of antimicrobial antibodies and autoimmune cholangitis. *Hepatology.* 2009; 49 (2): 545–552. DOI: 10.1002/hep.22651.
7. Moreno-Fernandez M.E., Zapata W., Blackard J.T., Franchini G., Chougnat C.A. Human regulatory T cells are targets for human immunodeficiency Virus (HIV) infection, and their susceptibility differs depending on the HIV type 1 strain. *J. Virol.* 2009; 83 (24): 12925–12933. DOI: 10.1128/JVI.01352-09. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19828616>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2786841/pdf/1352-09.pdf>.
8. Miyara M., Yoshioka Y., Kitoh A., Shima T., Wing K., Niwa A. et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 2009; 30 (6): 899–911. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.03.019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19464196>. [https://www.cell.com/immunity/pdf/S1074-7613\(09\)00202-7.pdf](https://www.cell.com/immunity/pdf/S1074-7613(09)00202-7.pdf).

9. Venken K., Thewissen M., Hellings N., Somers V., Hensen K., Rummens J.L. et al. A CFSE based assay for measuring CD4+CD25+ regulatory T-cell mediated suppression of auto-antigen specific and polyclonal T cell responses. *J. Immunol. Methods.* 2007; 3 22 (1–2): 1–11. DOI: 10.1016/j.jim.2007.01.025. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368474>.
10. Ndhlovu L.C., Loo C.P., Spotts G., Nixon D.F., Hecht F.M. FOXP3 expressing CD127lo CD4+ T cells inversely correlate with CD38+ CD8+ T-cell activation levels in primary HIV-1 infection. *J. Leukoc. Biol.* 2008; 83 (2): 254–262. DOI: 10.1189/jlb.0507281. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982112>. <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1189/jlb.0507281>.
11. Eggena M.P., Barugahare B., Jones N., Okello M., Mutalya S., Kityo C. et al. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J. Immunol.* 2005; 174 (7): 4407–4414. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778406>. <http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/174/7/4407.full.pdf>.
12. Prendergast A., Prado J.G., Kang Y.H., Chen F., Riddell L.A., Luzzi G. et al. HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161+ Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells. *AIDS.* 2010; 24 (4): 491–502. DOI: 10.1097/QAD.0b013e3283344895. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20071976>.
13. Lim A., Tan D., Price P., Kamarulzaman A., Tan H.Y., James I. et al. Proportions of circulating T cells with a regulatory cell phenotype increase with HIV-associated immune activation and remain high on antiretroviral therapy. *AIDS.* 2007; 21 (12): 1525–1534. DOI: 10.1097/QAD.0b013e32825e-ab8b. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17630546>.
14. Cao W., Jamieson B.D., Hultin L.E., Hultin P.M., Detels R. Regulatory T cell expansion and immune activation during untreated HIV type 1 infection are associated with disease progression. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2009; 25 (2): 183–191. DOI: 10.1089/aid.2008.0140. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19239357>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2782619/pdf/aid.2008.0140.pdf>.
15. Tenorio A.R., Spritzler J., Martinson J., Gichinga C.N., Pollard R.B., Lederman M.M. et al. The effect of aging on T-regulatory cell frequency in HIV infection. *Clin. Immunol.* 2009; 130 (3): 298–303. DOI: 10.1016/j.clim.2008.10.001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19008157>.
16. Zhang Z., Jiang Y., Zhang M., Shi W., Liu J., Han X. et al. Relationship of frequency of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells with disease progression in antiretroviral-naive HIV-1 infected Chinese. *Jpn. J. Infect Dis.* 2008; 61 (5): 391–392. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806350>.
17. Marziali M., de Santis W., Carello R., Leti W., Esposito A., Isgro A. et al. T-cell homeostasis alteration in HIV-1 infected subjects with low CD4 T-cell count despite undetectable virus load during HAART. *AIDS.* 2006; 20 (16): 2033–2041. DOI: 10.1097/01.aids.0000247588.69438.f. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053349>.
18. Weiss L., Piketty C., Assoumou L., Didier C., Caccavelli L., Donkova-Petrini V. et al. Relationship between regulatory T cells and immune activation in human immunodeficiency virus-infected patients interrupting antiretroviral therapy. *PLoS One.* 2010; 5 (7): e11659. DOI: 10.1371/journal.pone.0011659. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20657770>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2908121/pdf/pone.0011659.pdf>.
19. Chevalier M.F., Weiss L. The split personality of regulatory T cells in HIV infection. *Blood.* 2013; 121 (1): 29–37. DOI: 10.1182/blood-2012-07-409755. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23043072>. <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/121/1/29.full.pdf>.
20. Mason G.M., Lowe K., Melchioni R., Ellis R., de Rinaldis E., Peakman M. et al. Phenotypic complexity of the human regulatory T-cell compartment revealed by mass cytometry. *J. Immunol.* 2015; 195 (5): 2030–2037. DOI: 10.4049/jimmunol.1500703. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26223658>.
21. Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P., Yamaguchi T., Miyara M., Fehervari Z. et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science.* 2008; 322 (5899): 271–275. DOI: 10.1126/science.1160062. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18845758>. <http://science.sciencemag.org/content/322/5899/271.long>.
22. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008; 133 (5): 775–787. DOI: 10.1016/j.cell.2008.05.009. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18510923>.

Вклад авторов

Черешнев В.А. – проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение рукописи для публикации. Сайдакова Е.В. – анализ и интерпретация данных. Королевская Л.Б. – выполнение экспериментальной части работы. Шмагель Н.Г. – организация сбора биологического материала и подбор клинических групп. Шмагель К.В. – разработка концепции и дизайна исследования.

Authors contribution

Chereshnev V.A. – verification of critical intellectual content and final approval of the manuscript for publication. Saidakova E.V. – data analysis and interpretation. Korolevskaya L.B. – execution of the experimental part of the work. Shmagel N.G. – organization of the collection of biological material and selection of clinical groups. Shmagel K.V. – concept development and research design.

Сведения об авторах

Черешнев Валерий Александрович, д-р мед. наук, академик РАН, гл. науч. сотрудник, ПФИЦ УрО РАН; зав. кафедрой микробиологии и иммунологии, ПГНИУ; гл. науч. сотрудник, ИИФ УрО РАН, президент Российского научного общества иммунологов, г. Екатеринбург. ORCID iD 0000-0003-4329-147X.

Сайдакова Евгения Владимировна, канд. биол. наук, мл. науч. сотрудник, ПФИЦ УрО РАН; доцент, кафедра микробиологии и иммунологии, ПГНИУ, г. Пермь. ORCID iD 0000-0002-4342-5362.

Королевская Лариса Борисовна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь. ORCID iD 0000-0001-9840-7578.

Шмагель Надежда Геннадьевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, ПФИЦ УрО РАН; врач-иммунолог, Центр СПИД, г. Пермь, Россия. ORCID iD 0000-0002-2763-3620.

Шмагель Константин Владимирович, д-р мед. наук, зав. лабораторией, ПФИЦ УрО РАН; профессор, кафедра микробиологии и иммунологии, ПГНИУ, г. Пермь. ORCID iD 0000-0001-6355-6178.

(✉) **Сайдакова Евгения Владимировна**, e-mail: radimira@list.ru.

Authors information

Chereshnev Valery A., DM, Academician of RAS, Chief Researcher, PFRC UB RAS; Head of the Department, PSU, Perm, Russian Federation; Chief Researcher, IIF UB RAS, President of Russian Society for Immunology, Yekaterinburg, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-4329-147X.

Saidakova Evgeniya V., PhD, Junior Researcher, PFRC UB RAS, Perm, Russian Federation; Associate Professor, PSU, Perm, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4342-5362.

Korolevskaya Larisa B., PhD, Researcher, PFRC UB RAS, Perm, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-9840-7578.

Shmagel Nadezhda G., PhD, Senior Researcher, PFRC UB RAS, Perm, Russian Federation; Immunologist, Perm AIDS Center, Perm, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-2763-3620.

Shmagel Konstantin V., DM, Head of the Department, PFRC UB RAS, Perm, Russian Federation; Professor, PSU, Perm, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-6355-6178.

(✉) **Saidakova Evgeniya V.**, e-mail: radimira@list.ru.

Received 18.09.2018

Accepted 17.12.2018

Поступила в редакцию 18.09.2018

Подписана в печать 17.12.2018