



Л.А. Котиева, И.И. Андреева, Л.П. Сизякина

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНЫХ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОЙ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ В ДИНАМИКЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

*Ростовский государственный медицинский университет,
кафедра клинической иммунологии и аллергологии ФПК и ППС
Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. E-mail: iai3012@rambler.ru*

Цель: изучение патогенетической значимости клеточных факторов врожденного иммунитета в развитии опосредованного ВИЧ инфекционного процесса

Материалы и методы: изучали кислородзависимый метаболизм нейтрофильных гранулоцитов, цитолитическую активность натуральных киллеров, продукцию интерферона- γ . Под наблюдением находилось 36 инфицированных ВИЧ пациентов.

Результаты и выводы: после этапа активации клеточных механизмов врожденной противовирусной защиты формируется функциональная супрессия, вносящая существенный вклад в прогрессию ВИЧ-инфекции.

Ключевые слова: натуральные киллеры, ВИЧ-инфекция, интерферон- γ .

L.A. Kotieva, I.I. Andreeva, L.P. Sizyakina

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF CELLULAR FACTORS OF THE INNATE IMMUNE PROTECTION IN THE DYNAMICS OF HIV-INFECTION

*Rostov State Medical University,
Department of Immunopathology and Allergology of Professional
and Training Development Department
29 Nakhichevansky st., Rostov-on-Don, 344022, Russia. E-mail: iai3012@rambler.ru*

Purpose: To study the pathogenetic significance of cellular factors in the development of innate immunity mediated by HIV infection

Materials and Methods: Oxygen-dependent metabolism of neutrophil granulocytes, the cytolytic activity of NK cells, production of IFN – γ were studied. We observed 36 HIV-infected patients.

Results and Summary: It is shown that after the stage of activation of cellular innate antiviral defense mechanisms formed functional suppression, making a significant contribution to the progression of HIV infection.

Keywords: natural killer cells, HIV infection, IFN- γ .



Введение

Несмотря на многообразие исследований, посвященных инфекции, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), имеющиеся в настоящее время достижения в области профилактики и терапии этого заболевания далеки от окончательного решения [1,2]. Поиски методов эффективного противостояния ВИЧ-инфекции способствуют детальному изучению патогенетических механизмов развития опосредованного ВИЧ-инфекционного процесса и роли иммунной системы в его контроле [3,4]. До настоящего времени нет ответа на вопрос о том, каким образом зараженному ВИЧ удастся в течение многих лет противостоять инфекции, каковы критерии прогноза вариантов прогрессии инфекции и почему неполноценность иммунного ответа в одних случаях приводит к доминирующей роли инфекций, а в других - к поломке системы сдерживания опухолевого роста? Учитывая тот факт, что при ВИЧ-инфекции основным объектом инфицирования являются иммунокомпетентные клетки, обеспечивающие формирование адаптивного иммунного ответа, представляет интерес анализ динамики реакции клеточно-опосредованных механизмов врожденной защиты на вирусную экспансию [5,6]. Проведение такого исследования позволит прояснить некоторые аспекты иммунопатогенеза ВИЧ-инфекции и способствовать оптимизации диагностических и прогностических критериев течения заболевания, улучшению контроля эффективности проводимой терапии.

Цель исследования - анализ функциональных параметров натуральных киллеров и нейтрофильных гранулоцитов в динамике инфекционного процесса, опосредованного ВИЧ.

Материалы и методы

Под наблюдением находились инфицированные ВИЧ пациенты в возрасте 20-45 лет. Диагноз ВИЧ-инфекции был поставлен на основании обнаружения в сыворотке обследуемых лиц антител к ВИЧ методом иммуноферментного анализа (ИФА) с дальнейшим подтверждением в иммуноблоте и определением антител к белкам, кодируемым генами *env* — *gp* 160, 110/120, 41, *gag* — *p55*, 40, 24/25, 18, *pol* — *p68*, 52, 34. Определение стадий ВИЧ-инфекции осуществлялось в соответствии с комплексной клинико-иммунологической классификацией центра контроля по болезням (CDC, 1993): в соответствии с этой классификацией по клиническим признакам разграничиваются три категории, обозначаемые как А (генерализованная лимфаденопатия - ГЛАП), В (пре-СПИД) и С (СПИД). Клиническая категория А соответствует стадии первичных проявлений. Клиническая категория С — развитию СПИДа. Категория В выделена как промежуточная. У находящихся под наблюдением пациентов стадия ГЛАП зарегистрирована у 6, пре-СПИД - у 22, СПИД - у 8 человек. В качестве контрольной группы обследовано 20 практически здоровых доноров крови. Иммунофенотипирование натуральных киллеров, а также анализ экспрессии на мононуклеарах периферической крови рецепторов к ИФН- γ (CD119) проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием моно-

клональных антител производства Becton Coulter на цитометре Cytomics FC 500. Интенсивность кислород-зависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов и его адаптационные возможности оценивали по способности нейтрофилов восстанавливать нитросиний тетразолий (НСТ) в диформаза. Определяли спонтанную (НСТсп.) и стимулированную латексом (НСТст.) активность. Коэффициент стимуляции рассчитывали по формуле: $Kст. = НСТст./НСТсп.$ Цитотоксическую активность (ЦТА) натуральных киллеров (НК) определяли по их способности [7], опосредованной Fc γ R III типа (CD16), лизировать комплекс ЭБ-IgG. Литическую активность оценивали по выходу гемоглобина из разрушенных эритроцитов барана (ЭБ) при совместном культивировании лимфоцитов и ЭБ, предварительно инкубированных с гипериммунной анти-сывороткой [8].

Уровень в периферической крови ИФН γ , а также его спонтанную и стимулированную продукцию мононуклеарами определяли методом ИФА на диагностических тест-системах производства ЗАО «Вектор-Бест». Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета программ Microsoft Excel, Windows Statistica с использованием параметрических и непараметрических методов. Полученные результаты выражались в форме среднего арифметического (M) $\pm$ его ошибки (m). Статистически значимыми считали различия, если вероятность случайного их характера не превышала 5% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Выявлено, что начальная стадия инфекционного процесса характеризуется выраженной активацией метаболизма нейтрофилов – продукция активных форм кислорода этими клетками на треть превышает показатели группы сравнения при сохранности их адаптационных резервов. Так, в условиях дополнительной стимуляции *in vitro* определяется дальнейшее усиление метаболической активности, что документируется значением коэффициента стимуляции на уровне контроля.

Также отмечается повышение активности натуральных киллеров – основного клеточного фактора врожденного иммунитета в отношении вирусной инфекции. При этом нами не отмечено увеличения содержания этих клеток в общем пуле периферических лимфоцитов, однако их функциональная активность превышает контрольное значение ЦТА практически вдвое, что отражает высокий активационный потенциал НК на начальном этапе формирования иммунного ответа к ВИЧ. Активация клеточных механизмов противовирусной защиты определяется, в том числе, увеличением выработки одного из ведущих цитокинов, обеспечивающих реализацию иммунного ответа по клеточному типу – интерферона гамма; выявлено практически четырехкратное увеличение его сывороточного уровня при сохранении адаптационных резервов интерферонпродуцирующих клеток в условиях дополнительного стимула. В то же время следует отметить, что стимулирующие эффекты ИФН- γ не сопровождались увеличением экспрессии его рецепторов: количество CD119+ лимфоцитов не имело достоверных отличий от контрольной группы (табл. 1).



Таблица 1.

Параметры клеточных факторов врожденного иммунитета инфицированных ВИЧ в стадии генерализованной лимфаденопатии (ГЛАП) в сравнении со здоровыми донорами

	НСТсп у.е.	Кстим.	CD16 %	ЦТА у.е.	ИФН-γ (сыв) пкг/мл	ИФН-γ спонт пкг/мл	ИС ИФН	CD119 %
Здоровые доноры	100,0±4,2	1,8±0,1	12,1±1,2	44,5±5,3	18±21	91±17	24±7	16,0±3,6
Инфицированные в стадии ГЛАП	133,0±5,0*	1,6±0,2	11,8±8,6	70,7±10*	89,3±34,1*	118±47,5	17±9	15±3,7

Примечание: *отмечены статистически достоверные различия показателей по сравнению со здоровыми при $p < 0,05$

Дальнейшее развитие иммуносупрессии при ВИЧ-инфекции, приводящее к стадии пре-СПИД, характеризуется угнетением механизмов естественной противовирусной резистентности. Так, статистически значимо по сравнению с контрольными значениями и начальной стадией ВИЧ-инфекции снижен Кст. НСТ-теста, что свидетельствует об истощении потенциальных резервов нейтрофилов. Также исчерпаны функциональные резервы натуральных киллеров. Этот факт документируется снижением цитотоксической активности не только в сравнении с начальной стадией, но и по отношению к контрольным параметрам, несмотря на сохранность общего количества этих клеток на уровне нормативных значений. Об истощении адаптационных возможностей клеточных механизмов иммунной системы в условиях продолжающейся вирусной агрессии свидетельствует снижение коэффициента стимуляции продукции активирующего их функцию ИФН-гамма: в условиях дополнительного воздействия на мононуклеары периферической крови *ин vitro* коэффициент стимуляции практически вдвое снижен по отношению к контролю. Тем не менее уровень сывороточного ИФН-γ, так же как и его спонтанная продукция, сравнимы с соответствующими параметрами стадии ГЛАП и превышают, соответственно, значения группы сравнения. В то же время неизменным остается экспрессия рецепторов к ИФН-γ,

что свидетельствует о дискоординации процессов секреции и возможности рецепции данного цитокина (табл.2). Терминальная стадия ВИЧ-инфекции - СПИД, характеризующаяся развитием необратимых патологических изменений, проявляется принципиально значимым угнетением функциональной активности, в том числе клеточных факторов врожденного иммунитета. В частности, нейтрофильные фагоциты практически не отвечают в условиях *ин vitro* на дополнительный стимул, что свидетельствует о полном истощении их функциональных резервов. Также, несмотря на то, что количество НК в периферической крови остается на уровне нормативных значений, их цитолитическая активность составляет лишь треть от функциональной возможности НК группы сравнения. Кроме того, отмечается шестикратное снижение индекса стимуляции продукции мононуклеарами периферической крови ИФН-γ при продолжающейся дискоординации процессов секреции и рецепции. Таким образом, в стадии СПИД, несмотря на сохранную, относительно нормы, количественную характеристику параметров клеточного звена врожденной иммунной защиты, функциональные показатели принципиально снижены, что отражает окончательный срыв компенсаторных возможностей и является патогенетической основой несостоятельности иммунной системы, определяющей летальный исход заболевания (табл. 2).

Таблица 2.

Параметры клеточных факторов врожденного иммунитета инфицированных ВИЧ в стадии СПИД в сравнении со здоровыми донорами

	НСТсп у.е.	Кстим.	CD16 %	ЦТА у.е.	ИФН-γ (сыв) пкг/мл	ИФН-γ спонт пкг/мл	ИС ИФН	CD119 %
Здоровые доноры	100,0±4,2	1,8±0,1	12,1±1,2	44,5±5,3	18±21	91±17	24±7	16,0±3,6
Инфицированные в стадии пре-СПИД	146,0±4,7*	1,3±0,1*	11,2±6,0	24,3±9,5*	99,4± 38,0*	132±50	11±6*	17,8±5,5
Инфицированные в стадии СПИД	131,0±43,1	1,0±0,1*	12,7±4,8	11,6±4,4*	147±57*	197±102	3,6±1,3*	16,9±6,2

Примечание: *отмечены статистически достоверные различия показателей по сравнению со здоровыми при $p < 0,05$



Заключение

Представленные данные свидетельствуют о том, что ВИЧ-инфекция — уникальная природная модель, раскрывающая механизмы и исходы формирования тотального иммунодефицита не только за счет лимфоцитов, формирующих адаптивные иммунные процессы, но и

при участии клеточных факторов врожденного иммунитета. В динамике ВИЧ-инфекции после этапа активации клеточных механизмов врожденной противовирусной защиты формируется функциональная супрессия, вносящая существенный вклад в прогрессию ВИЧ-инфекции (рис.1).

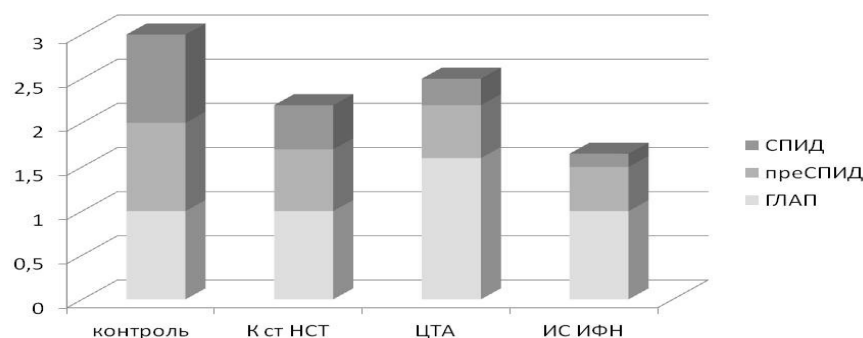


Рис. 1. Относительная динамика функциональных параметров клеточных факторов врожденного иммунного ответа при ВИЧ-инфекции

Выявленные этапы прогрессии иммунодефицита как следствие противостояния «ВИЧ — иммунная система» могут определить диагностические и прогностические

критерии развития вторичного иммунодефицита, а также предположить варианты его своевременной коррекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гудима Г.О., Сидорович И.Г., Карамов Э.В., Хаитов Р.М. Современная стратегия биомедицинской профилактики ВИЧ-инфекции/СПИДа //Иммунология. - 2013. - Т.34.№1. - С.4-9.
2. Сизякина Л.П., Андреева И.И., Кузина Т.Н. Иммунодефициты, обусловленные Т-лимфотропными вирусами. - Ростов-на-Дону, 2008. - 374 с.
3. Дунаев П.Д., Иванкова А.В., Бойчук С.В., Мустафин И.Г. Исследование роли цитокинов в патогенезе ВИЧ-инфекции // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия. - 2010. - Т.2.№3. - С.55-57.
4. Сотниченко С.А., Скляр Л.Ф., Маркелова Е.П. Некоторые иммунологические аспекты у больных ВИЧ-инфекцией в различных стадиях, сочетанной с туберкулезом. //Иммунология. - 2008. - Т.29.№1. - С.1-6.
5. Maizels R.M., Smith K.A. Regulatory T-cells in infection // Advances in immunology. - 2011. - Т.112. - P.73-136.
6. Conzaes V.D., Sandberg J.K., Landay A.L. Innate immunity and chronic immune activation in HCV/HIV-1 coinfection //Clinical immunology. - 2010. - Т.135.№1. - P.12-25.
7. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 352 с.
8. Клиническая иммунология: Учебник для вузов / А.М. Земсков, В.М.Земсков, А.В. Караулов; Под ред. А.М. Земскова - М., 2005. - 320с.

ПОСТУПИЛА 28.03.2013