



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

ОСОБЕННОСТИ КООПЕРАЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В ДИНАМИКЕ ПРОГРЕССИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

*Ростовский государственный медицинский университет,
Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. E-mail: iai3012@rambler.ru.*

Цель: характеристика количественных и функциональных параметров Т-, В- лимфоцитов и натуральных киллеров в динамике прогрессии ВИЧ-инфекции. **Материалы и методы:** исследованы количественные и функциональные показатели Т-, В-лимфоцитов, натуральных киллеров у инфицированных ВИЧ, использовали иммунофенотипирование, реакцию бласттрансформации лимфоцитов, иммуноферментный анализ. Обследованы 50 человек. При определении стадий инфекционного процесса ориентировались на клинико-иммунологическую классификацию центра контроля по болезням (CDC, 1993). **Результаты:** прогрессия вторичного иммунодефицита связана не только с количественными изменениями Т-лимфоцитов, но и нарушениями их регуляторных функций, которые влекут за собой несостоятельность и неэффективность В-лимфоцитов. **Выводы:** лимфоидная популяция врожденного иммунитета проявляет максимально выраженную сохранность механизмов функционирования.

Ключевые слова: ВИЧ, Т-, В-лимфоциты, натуральные киллеры.

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

FEATURES OF COOPERATION LYMPHOCYTE POPULATIONS IN THE DYNAMICS OF HIV INFECTION

*Rostov State Medical University,
29 Nakhichevansky st., Rostov-on-Don, 344022, Russia. E-mail: iai3012@rambler.ru*

Purpose: the determination of quantitative and functional parameters of T, B lymphocytes and natural killer cells in patients in the dynamics of HIV infection. **Materials and methods:** the immunophenotyping, reaction of blast transformation of lymphocytes, enzyme immunoassay were used in 50 HIV-infected patients. Clinical stage was determined in accordance with the classification of the CDC (1993). **Results:** the progression of HIV infection connected with impaired function of regulatory T-lymphocytes. B cells lost their ability to produce high-affinity antibodies in the dynamics of HIV infection. **Summary:** the innate immune cells retain their functional capacity at the same time.

Keywords: HIV, T-, B-lymphocytes, natural killer.



Введение

ВИЧ-инфекция, как модель формирования вторичного иммунодефицита, по-прежнему является объектом пристального исследования [1]. Это определяется уникальностью патогена, точкой приложения которого являются Т-лимфоциты: клетки иммунной системы, влияющие на процессы становления, дифференцировки и реализации иммунного ответа [2]. Изучить функциональные, компенсаторные и адаптивные свойства иммунной системы в условиях прогрессии ВИЧ-инфекции значит познать механизм реализации иммунной защиты [3]. В связи с этим принципиально важным представляется анализ функционального потенциала не только CD4+Т-лимфоцитов как основной мишени вирусной экспансии, но и других составляющих лимфоидной клеточной линии в силу существенной взаимосвязи и взаимообусловленности функционирования иммунокомпетентных клеток (ИКК). Эти исследования интересны для изучения механизмов прогрессии иммунной дисфункции при ВИЧ-инфекции как с позиции прямой вирусной экспансии, так и с точки зрения выявления тех реакций иммунной системы, которые, с одной стороны, способствуют ее сдерживанию, а с другой, вносят вклад в формирование патологически значимых изменений прогрессии иммунодефицита [4,5,6]. Каждая из популяций лимфоцитов обладает отличительными механизмами противовирусного реагирования, которые обеспечивают комплекс адаптивных и неспецифических защитных реакций. Сопоставительный анализ динамики этих процессов в условиях прогрессирующего вторичного иммунодефицитного состояния представляет несомненный интерес.

Цель исследования – изучить характеристику количественных и функциональных параметров Т-, В-лимфоцитов инатуральных киллеров в динамике прогрессии ВИЧ-инфекции.

Материалы и методы

Представлены результаты оценки параметров иммунной системы 50 инфицированных ВИЧ пациентов в возрасте 22-36 лет. Диагноз ВИЧ-инфекция был поставлен на основании обнаружения в сыворотке обследуемых лиц антител к ВИЧ методом иммуноферментного анализа (ИФА) с дальнейшим подтверждением в иммуноблоте. Определение стадий ВИЧ-инфекции осуществлялось по клинико-иммунологической классификации центра контроля по болезням (CDC, 1993), в соответствии с которой разграничиваются три категории, обозначаемые как А (генерализованная лимфаденопатия — ГЛАП), В (пре-СПИД) и С (СПИД). Клиническая категория А соответствует стадии первичных проявлений, С — развитию СПИДа. Категория В выделена как промежуточная. В исследованиях стадия ГЛАП зарегистрирована у 14 пациентов, пре-СПИД — у 26, СПИД — у 10 человек. В качестве контрольной группы обследованы 10 практически здоровых доноров крови. Фенотипический анализ лимфоцитов, а именно определение экспрессии CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25, HLA DR проводили методом иммунофенотипирования с учетом результатов на проточном лазерном цитофлюориметре «FC 500» и использованием соответствующих

моноклональных антител с двойной и тройной меткой (BeckmanCoulter). Оценка пролиферативной способности Т-клеток осуществлялась посредством реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) при спонтанном и стимулированном ФГА культивировании с радиометрическим учетом и расчётом индекса стимуляции (ИС) [7]. Определение относительной аффинности антител IgG к антигенам ВИЧ проводили на основании методики, предложенной R.W. Luxton, E.J. Thompson (1990) с вычислением коэффициента снижения аффинности (K.C.af.) [8]. Цитолитическую активность НК определяли по их способности, опосредованной FcγRIII типа (CD16), лизировать комплекс эритроцитов барана (ЭБ)-IgG. Степень лизиса оценивали по выходу гемоглобина из разрушенных ЭБ, предварительно инкубированных с гипериммунной антисывороткой при совместном культивировании с лимфоцитами и выражали показателем относительной и абсолютной цитотоксической активности (ЦТА) [9]. Содержание сывороточных иммуноглобулинов класса А, М, G оценивали в реакции радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини. Математическую обработку полученных данных проводили на ПК Microsoft Windows XP professional, используя программу Statistica 7.0. Достоверность различий в группах оценивали с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия, если вероятность случайного их характера не превышала 5% ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение

ВИЧ — это вирус, внедрение которого в клетку-мишень опосредуется тропностью адгезивных структур к поверхностным молекулам рецепторного репертуара Т-лимфоцитов. Т-лимфоциты в количественном аспекте занимают лидирующую позицию в лимфоидной популяции клеток. У практически здоровых взрослых на долю зрелых CD3+Т-клеток приходится 65-75% лимфоцитов периферической крови. В условиях ВИЧ-инфекции Т-лимфоциты являются и объектом непосредственного вирусного воздействия, и основным механизмом обеспечения адаптивного противовирусного иммунитета, и объектом антигензависимого и неспецифического цитолиза. При исследовании динамики количества Т-лимфоцитов у больных в прогрессии ВИЧ-инфекции отмечаем, что уменьшение как относительного содержания, так и абсолютного числа клеток этой популяции в циркуляции отмечается лишь в терминальной стадии СПИД. В течение начального бессимптомного периода и в стадии обратимых клинических проявлений процентное содержание Т-лимфоцитов находится в пределах нормативных параметров, а в пересчете на абсолютное число лейкоцитов крови даже превышает контрольные цифры (табл. 1). Таким образом, абсолютная или частичная возможность контроля за инфекцией сопряжена с количественной сохранностью Т-популяции и только полная несостоятельность иммунной системы при ВИЧ-инфекции сопровождается количественным истощением Т-клеток. Реакция Т-лимфоцитов на вирусную экспансию проявляется активацией функционального потенциала. Это в данных исследованиях подтверждается анализом экспрессии активационных маркеров (табл. 1). Так, на всех этапах развития иммунодефицитного со-



стояния готовность к восприятию активирующего воздействия интерлейкина-2 находится на одном и том же повышенном уровне, что верифицируется относительным количеством CD3+CD25+-клеток. Однако абсолютное число Т-лимфоцитов, экспрессирующих ранний активационный маркер CD25, в стадии ГЛАП и пре-СПИД практически вдвое выше, а в терминальной стадии приближается к контрольным цифрам. Свидетельством существенного вовлечения функциональных ресурсов является также увеличение в циркуляции Т-клеток, экспрессирующих HLA II класса, что маркирует позднюю активацию (табл. 1). Таким образом, Т-звено иммунной системы демонстрирует высокую активационную готовность, однако способность к реализации полноценного функционирования снижается уже на начальном клиническом этапе инфекции. Это подтверждает результат ис-

следования бласттрансформации лимфоцитов. Так, в стадии ГЛАП спонтанная и стимулированная Т-митогеном пролиферация ниже, чем у здоровых доноров. В стадии пре-СПИД принципиальное угнетение пролиферативной активности подтверждается четырехкратным снижением ИС РБТЛ. Такая несостоятельность основополагающего свойства ИКК создает функциональную базу прогрессии иммунодефицита, что подтверждается данными исследования пролиферативной способности Т-клеток в стадии СПИД, где ИС РБТЛ в шесть раз ниже контрольных параметров (табл. 1). Таким образом, основным патогенетическим механизмом и информативным критерием развивающегося иммунодефицита является несостоятельность Т-лимфоцитов отвечать на стимулирующее воздействие адекватной пролиферацией и, соответственно, последующей реализацией эффекторных свойств.

Таблица 1

Количественные и функциональные параметры Т-лимфоцитов в динамике ВИЧ-инфекции

Показатели	ГЛАП	Пре-СПИД	СПИД	контроль
CD3+, %	68,55±1,35	68,94±1,77	“51,20±3,77* **	68,88±0,38
CD3+, 10 ⁹ /л	“1,53±0,07	“1,58±0,09	“0,87±0,10* **	1,22±0,03
CD3+CD25+, %	“3,48±0,21	“3,07±0,30	“3,01±0,50	2,15±0,17
CD3+CD25+, 10 ⁹ /л	“0,09±0,01	“0,07±0,01	“0,048±0,01* **	0,04±0,01
CD3+HLA DR+, %	“10,08±0,52	“12,48±0,43	“10,38±1,33	8,04±0,14
CD3+HLA DR+, 10 ⁹ /л	“0,25±0,02	“0,30±0,03	0,16±0,02* **	0,14±0,01
РБТЛ сп, имп/мин	“152±6	188±8	“244±34	198±3
РБТЛ ФГА, имп/мин	“8895±1121	“3146±408	“2289±795	12581±204
РБТЛ ИС	55,58±8,31	“16,60±2,87*	“9,60±3,30* **	63,60±0,87

Примечание: Статистическая значимость различий $p < 0,05$ между группами обозначена: « – по отношению к контролю; * – ГЛАП-преСПИД, ГЛАП-СПИД; ** – преСПИД-СПИД

В-лимфоциты при ВИЧ-инфекции, в отличие от Т-лимфоцитов, не являются клетками-мишенями первого порядка, а вовлечены в систему специфической противовирусной защиты. Их роль в данном случае сводится к продукции вируснейтрализующих антител и участию в антителозависимых механизмах лизиса инфицированных клеток. Анализ В-клеток при ВИЧ-инфекции демонстрирует полную относительную и абсолютную количественную сохранность в сравнении с нормативными показателями (табл. 2). Традиционно наглядным параметром, отражающим реакцию В-лимфоцитов, является содержание сывороточных иммуноглобулинов. При ВИЧ-инфекции этот показатель неуклонно растет – уже в начальной стадии регистрируется гипериммуноглобулинемия IgM и IgG, в стадии пре-СПИД присоединяется гиперпродукция сывороточного IgA, в терминальной стадии отмечается еще более значительная иммуноглобулинпродуцирующая активность В-лимфоцитов (табл. 2). Следует отметить, что это явление не сопровождается увеличением В-лимфоцитов в циркуляции и подтверждает существенную активацию функциональных свойств резидентных В-клеток периферических лимфоидных ор-

ганов. Тот факт, что клиническая прогрессия иммунодефицита находится в прямой корреляции с увеличением продукции иммуноглобулинов, служит подтверждением функциональной неэффективности В-системы иммунитета в противостоянии ВИЧ-инфекции. Другим объективным доказательством неэффективности антигеннейтрализующих свойств анти-ВИЧ-иммуноглобулинов является анализ аффинности специфических IgG-антител. В исследовании показано, что коэффициент снижения аффинности, то есть степени конгруэнтности связи антиген-антитело, уже в стадии ГЛАП составляет 20%, способность связывать антигены ВИЧ IgG в стадии ГЛАП падает на 50%, а в терминальной стадии – практически на 70% (табл. 2). Эти данные свидетельствуют о неуклонно прогрессирующем снижении антигенсвязывающей способности основного сывороточного иммуноглобулина класса G. Таким образом, при ВИЧ-инфекции количественная гиперпродукция эффекторных молекул В-звена адаптивного иммунитета не выполняет функцию противостояния вирусной экспансии, скорее, наоборот, стоит на чаше весов вовлечения иммунопатологических механизмов.



Таблица 2.

Количественные и функциональных параметры В-лимфоцитов в динамике ВИЧ-инфекции

Показатели	ГЛАП	Пре-СПИД	СПИД	контроль
CD20+, %	5,91±0,45	5,90±0,49	6,80±1,06	6,20±0,24
CD20+, 10 ⁹ /л	0,15±0,02	0,13±0,01	0,09±0,02* **	0,11±0,01
IgA г/л	1,83±0,12	“2,03±0,12*“	“2,74±0,20* **“	1,4 ±0,3
IgM г/л	“1,45±0,10“	“1,73±0,09*“	“1,95±0,19*“	1,1 ±0,1
IgG г/л	“12,89±0,48“	“13, 52±0,33*“	“14,21±0,50*“	10,3± 1,3
K.C.af.,%	20,2±3,1	45,4 ±5,2*	67,9±6,9* **	

Примечание: Статистическая значимость различий p<0,05 между группами обозначена: « – по отношению к контролю; *— ГЛАП-преСПИД, ГЛАП-СПИД; ** — преСПИД-СПИД

Первой линией защиты при любой вирусной инфекции служит лимфоидная популяция системы врожденного иммунитета – натуральные киллеры. При ВИЧ-инфекции эти клетки системы иммунологического надзора демонстрируют полную относительную количественную сохранность в циркуляции на протяжении всех этапов прогрессии иммунодефицита. Абсолютное же количество НК, оставаясь в пределах нормативных показателей в стадии ГЛАП и пре-СПИД, снижается лишь в терминальной стадии (табл. 3). Количественная сохранность НК сопряжена с активацией функциональных свойств этой системы клеток. Наши исследования процессов антителозависимой цитотоксичности НК выявили практически двукратное увеличение Fc-γR (CD16)-опосредованного цитолиза на начальном этапе

формирования вторичного иммунодефицита и на стадии относительного контроля прогрессии пре-СПИД. В то же время клинический этап необратимой иммунной супрессии сопряжен со статистически значимым угнетением функциональных ресурсов НК-лимфоцитов (табл. 3). Таким образом, лимфоидная популяция врожденного иммунитета в динамике ВИЧ-инфекции демонстрирует максимальную сохранность своего количественного и функционального потенциала. Данное заключение служит свидетельством того факта, что наиболее древняя антигеннеспецифическая система противовирусной резистентности является более стойким и, соответственно, наименее уязвимым механизмом в противодействии прогрессии вторичного T-клеточного иммунодефицита (табл. 3).

Таблица 3.

Количественные и функциональные параметры НК в динамике ВИЧ-инфекции

Показатели	ГЛАП	Пре-СПИД	СПИД	контроль
CD16+, %	11,88±1,69	11,87±1,97	11,33±2,60	12,12±0,25
CD16+, 10 ⁹ /л	0,26±0,04	0,27±0,05	“0,16±0,02* **“	0,21±0,01
ЦТА, у.е.	6,93±3,35	“7,52±1,44“	2,64±1,23* **	3,54±0,12
ЦТА, 10 ⁹ /л	“1,58±0,31“	“1,52±0,28“	“0,44±0,23* **“	0,75±0,02

Примечание: Статистическая значимость различий p<0,05 между группами обозначена: « – по отношению к контролю; *— ГЛАП-преСПИД, ГЛАП-СПИД; ** — преСПИД-СПИД

Заключение

Основная патогенетическая мишень—T-лимфоциты— демонстрируют количественную сохранность достаточно долго, в то время как основополагающее свойство функционирования – пролиферация –снижается уже в начальной стадии. Угнетение пролиферации является следствием активации запрограммированной гибели T-клеток, следовательно, наблюдается классическое проявление апоптотического иммунодефицита. Это служит убедительным свидетельством важности оценки не только количественных, но и функциональных показателей при доказательной базе вторичного T-клеточного иммунодефицита. Параметры функционирования В-лимфоцитов при исходном дефекте T-популяции меняются достаточно наглядно — от стадии к стадии уве-

личивается общий синтез иммуноглобулинов при снижении антигенсвязывающей функции специфических антител. Нарушения регуляторных процессов адаптивного иммунитета, связанные с изменениями в T-системе иммунитета, влекут за собой несостоятельность и неэффективность В-звена. В то же время лимфоидная популяция врожденного иммунитета в условиях исходного повреждения клеточного компонента адаптивной системы проявляет максимально выраженную сохранность. Цитолитический потенциал НК снижается только в терминальной стадии, причем, в большей степени, за счет снижения абсолютного числа в циркуляции, опосредованного системной лимфопенией. Полученные выводы могут стать основанием для выбора стратегии и тактики диагностики и коррекции вторичного T-клеточного иммунодефицита.



ЛИТЕРАТУРА

1. Chinen J., Shearer W. T. Secondary immunodeficiencies, including HIV infection. //J Allergy ClinImmunol. 2010; 125: S195-203.
2. Сизякина Л.П. Кузина Т.Н. Андреева И. И. Иммунодефициты, обусловленные Т-лимфотропными вирусами. - Ростов н/Дону: «Экспертное бюро»; 2008.
3. Baliga C.S., Paul M.E., Chine J., Shearer W.T. HIV infection and the acquired immunodeficiency syndrome. In: Rich RR, editor. Clinical immunology. Principles and practice. 3th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2008. p. 553-60.
4. Симонова А.В., Пинегин Б.В., Хаитов Р.М., Прокопенко В.Д. и др. Некоторые особенности гуморального антибактериального иммунитета у ВИЧ-инфицированных и больных СПИДом. //Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1998 - №3 - С. 35-39.
5. Freguja R., Gianesin K., Zanchetta M., De Rossi A. Cross-talk between virus and host innate immunity in pediatric HIV-1 infection and disease progression. //New Microbiol. 2012 Jul;35(3):249-57.
6. Baranova S. V., Buneva V. N., Kharitonova M. A., Sizyakina L. P., et al. HIV-1 integrase-hydrolyzing IgM antibodies from sera of HIV-infected patients. //International Immunology. 2010; 22(8): 671-80.
7. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей. - М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.
8. Сизякина Л.П. , Андреева И. И. Способ диагностики стадий ВИЧ – инфекции. Патент РФ № 2251701;2005.
9. Караулов А.В. Клиническая иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов. - М.: МИА; 1990.

ПОСТУПИЛА: 02.03.2016