

# ОЦЕНКА ЗАВИСИМОСТИ УРОВНЯ $\gamma\delta$ Т-КЛЕТОК У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ ОТ УРОВНЯ $CD3^+CD4^+$ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Зурочка А.В.<sup>1</sup>, Гаврилова Т.В.<sup>2</sup>, Шестакова Е.В.<sup>3</sup>,  
Квятковская С.В.<sup>3</sup>, Миркина Т.В.<sup>3</sup>, Черешнев В.А.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Самостоятельный курс клинической лабораторной диагностики ГОУ ВПО ЧелГМА Росздрава, г. Челябинск

<sup>2</sup>Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера, г. Пермь

<sup>3</sup>Клиника ГОУ ВПО ЧелГМА Росздрава, Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, г. Челябинск

<sup>4</sup>Учреждение РАН НИИ иммунологии и физиологии Уро РАН, г. Екатеринбург

**Резюме.** Нами было проведено иммунофенотипирование лимфоцитов методом проточной цитометрии у 150 больных ВИЧ-инфекцией. Все обследованные лица были распределены на три группы в зависимости от абсолютного числа  $CD3^+CD4^+$  Т-лимфоцитов в периферической крови согласно классификации стадий ВИЧ-инфекции у взрослых и подростков в редакции CDC (США). Выявлено, что снижение абсолютного уровня Т-хелперов с каждой последующей стадией заболевания сопровождается падением относительного и абсолютного числа лимфоцитов, общего числа Т-лимфоцитов, снижением абсолютного уровня цитотоксических Т-лимфоцитов при повышении их относительного числа, как следствие, падением соотношения  $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ , снижением уровня дважды позитивной субпопуляции, снижением относительного и абсолютного уровня  $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов и значительное падение абсолютного уровня  $\gamma\delta$ Т-клеток при сохранном их относительном содержании. Все это также указывает на отсутствие иммунологической реактивности в ответ на длительно персистирующий в организме антиген.

**Ключевые слова:** Т $\gamma\delta$ -лимфоциты, ВИЧ-инфекция, Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты, иммунофенотипирование.

Zurochka A.V., Gavrilova T.V., Shestakova E.V., Kvyatkovskaya S.V., Mirkina T.V., Chereshev V.A.

## EVALUATION OF INTERDEPENDENCE BETWEEN $\gamma\delta$ T-CELL LEVELS AND $CD3^+CD4^+$ T-LYMPHOCYTE CONTENTS IN HIV-INFECTED PATIENTS

**Abstract.** We have performed immunophenotyping of lymphocytes in 150 HIV-positive patients, by means of flow cytometry. All the persons under study were classified into three groups, depending on absolute contents of  $CD3^+CD4^+$  T-lymphocytes in peripheral blood, according to HIV infection staging in adults and adolescents, as amended by CDC (USA). It was revealed that, at each subsequent stage of disease, a decrease in absolute numbers of T-helpers is accompanied by drop in relative and absolute numbers of lymphocytes, as well as in total T-lymphocyte numbers, and decreased amounts of absolute cytotoxic T-lymphocytes levels, combined with increase in their relative contents, along with decreased  $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$  ratio, diminished levels of double-positive subpopulation, decrease in relative and absolute levels of  $\alpha\beta$ T-lymphocytes and significant drop in absolute levels of  $\gamma\delta$ T-cells, while their relative amounts remained normal. These findings demonstrate a pattern typical to the absence of immunological reactions in response to antigens persisting in the organism. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 4-5, pp 425-428)

**Keywords:** T $\gamma\delta$ -lymphocytes, HIV infection, helper T cells, cytotoxic T lymphocytes, immunophenotyping.

### Адрес для переписки:

Зурочка Александр Владимирович,  
454000 г. Челябинск, ул. Воровского, 15б,  
МЛЦ «Familia».  
Тел.: 8-919-307-75-98.  
E-mail: familia@inbox.ru

### Введение

$\gamma\delta$ Т-лимфоциты впервые были описаны в середине 1980-х Saito et al. и Brenner et al. (1986) как гетерогенная субпопуляция Т-клеток с Т-клеточным рецептором, состоящим из  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепей ( $\gamma\delta$ TcR) [2, 4, 6]. У людей и многих животных большинство

Т-клеток экспрессируют Т-клеточный рецептор, состоящий из  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей, и лишь небольшое количество Т-клеток несет Т-клеточный рецептор с  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепями. В отличие от  $\alpha\beta$ Т-клеток,  $\gamma\delta$ Т-клетки напрямую распознают белковые и небелковые фосфолипиды без участия главного комплекса гистосовместимости.  $\gamma\delta$ Т-клетки участвуют в антимикробном иммунитете и обладают эффекторными функциями. Роль  $\gamma\delta$ Т-клеток в иммунных процессах при различных заболеваниях и их взаимодействие с другими клетками организма до сих пор остаются до конца не выясненными. Но уже накопилось достаточно информации, которая доказывает необходимость существования подобной популяции клеток. Известно, что  $V\delta 1^+\gamma\delta$  вовлечены в механизмы местной иммунной защиты при ВИЧ- и цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции и при определенных бактериальных инфекциях [3]. Так же оказалось, что  $\gamma\delta$ Т-клетки оказывают цитотоксическое действие с участием механизмов апоптоза [1, 7]. Приведенные выше факты свидетельствуют в пользу того, что для более полной характеристики Т-клеток пациента анализ следует проводить не только по таким специфическим и безусловно важным при ВИЧ-инфекции маркерам как  $CD3^+$ ,  $CD3^+CD4^+$  и  $CD3^+CD8^+$ , но и по наличию субпопуляций  $\alpha\beta$ Т-клеток и  $\gamma\delta$ Т-клеток. Важность определения последних очевидна при ВИЧ-инфекции, сопровождающейся длительной персистенцией антигена в организме на фоне депрессии Т-клеточного звена иммунной системы, для контроля эффективности терапии, прогноза развития и течения заболевания.

## Материалы и методы

Нами было проведено исследование иммунного статуса 150 больных ВИЧ-инфекцией, средний возраст которых составил  $30,9 \pm 5,8$  лет. Все пациенты находились на диспансерном учете в Центре по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями Клиники ЧелГМА г. Челябинска. Мы распределили больных на три группы согласно классификации стадий ВИЧ-инфекции у взрослых и подростков в редакции CDC (США). В первую группу вошло 23 пациента с абсолютным числом  $CD4^+$  Т-лимфоцитов в периферической крови более 500 клеток/мкл. Вторую группу составили 69 человек с абсолютным числом  $CD4^+$ Т-лимфоцитов 200–499 клеток/мкл. Третью группу составили 53 пациента с абсолютным уровнем  $CD4^+$ Т-лимфоцитов менее 200 клеток/мкл. Различия показателей в зависимости от пола в обследуемых группах не имело статистической значимости, в связи с чем мы сочли возможным объединить пациентов без учета их половой принадлежности.

Для определения общего количества лейкоцитов, подсчета абсолютного и относительного соотношения лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов, а также популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов методом проточной цитометрии кровь брали из локтевой вены в вакуумную пробирку, содержащую антикоагулянт К3ЕДТА ( $1,5 \pm 0,15$  мг на 1 мл крови). Подсчет общего числа лейкоцитов проводился с использованием одно-платформенной технологии с помощью гетерогенного гейтирования по панлейкоцитарному маркеру  $CD45^+$  и показателям светорассеяния с применением калибровочных частиц Flow-Count Fluorespheres фирмы Beckman Coulter, США. Популяции лимфоцитов выделяли при помощи гетерогенного гейтирования — область событий, имеющих яркую флуоресценцию  $CD45-FITC$  и низкий уровень сигнала светорассеяния под углом  $90^\circ$  (SS), моноцитов — область событий, имеющих менее яркую флуоресценцию  $CD45-FITC$  и более высокий уровень сигнала светорассеяния под углом  $90^\circ$ , гранулоцитов — область событий, имеющих самую низкую флуоресценцию  $CD45-FITC$  и высокий уровень сигнала светорассеяния под углом  $90^\circ$ .

С целью определения популяционного состава лимфоцитов для окрашивания нами были использованы четырехпараметрические реагенты линии IQTest:  $CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5$ , а также смесь монопараметрических реагентов  $CD45-PC5$ , TCR Pan  $\alpha\beta$ -PE, TCR Pan  $\gamma\delta$ -FITC фирмы Beckman Coulter, США. Наличие пан-Т-лимфоцитарного маркера  $CD3^+$  при отсутствии  $CD19^+$  характерно для Т-лимфоцитов; коэкспрессия  $CD3^+$  и  $CD4^+$  — для Т-хелперно/индукторных лимфоцитов; коэкспрессия  $CD3^+$  и  $CD8^+$  — для Т-цитотоксических лимфоцитов; коэкспрессия  $CD3^+$  и  $CD4^+CD8^+$  — для субпопуляции дубльпозитивных Т-лимфоцитов, экспрессия  $CD3^+$  при отсутствии экспрессии  $CD4^+$  и  $CD8^+$  — для дважды негативной субпопуляции Т-лимфоцитов, коэкспрессия  $CD45^+$  и TCR Pan  $\alpha\beta$  — для  $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов, коэкспрессия  $CD45^+$  и TCR Pan  $\gamma\delta$  — для  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов.

## Результаты

При анализе лейкограммы (табл. 1) нами выявлено падение от стадии к стадии общего уровня лейкоцитов, связанное с этим значительное снижение относительного и абсолютного числа лимфоцитов при переходе заболевания в последующие стадии и снижении уровня Т-хелперов, снижение абсолютного числа моноцитов, а также повышение относительного числа гранулоцитов в группах по сравнению с пациентами с уровнем Т-хелперов  $CD3^+CD4^+$  более 500/мкл.

При анализе популяций лимфоцитов (табл. 2) нами выявлено значительное статистиче-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ЛЕЙКОГРАММЫ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИЦ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (M±m)

Показатели обследованных лиц	Группа 1 (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> 500 клеток/мкл и более)	Группа 2 (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> 200-499 клеток/мкл)	Группа 3 (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> 199 и менее клеток/мкл)
	n = 28	n = 69	n = 53
Лейкоциты, x10 <sup>9</sup> /л	6,07±1,72	5,14±1,6*	4,4±1,7***
Гранулоциты, %	55,86±7,67	61,28±11,0*	63,4±13,9*
Гранулоциты, x10 <sup>9</sup> /л	3,45±1,3	3,24±1,47	2,93±1,46
Моноциты, %	8,11±1,79	8,41±2,9	8,7±2,8
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,49±0,16	0,42±0,17*	0,38±0,17*
Лимфоциты, %	36,04±8,08	29,96±10,0*	25,1± 9,9***
Лимфоциты, x10 <sup>9</sup> /л	2,14±0,57	1,47±0,48*	1,04±0,36***

**Примечание.** \* – достоверность различий показателей в группах 2 и 3 по сравнению с группой 1 по U-критерию Манна–Уитни (p < 0,05); \*\* – достоверность различий показателей больных группы 3 по сравнению с группой 2 по U-критерию Манна–Уитни: p < 0,05.

ски значимое снижение абсолютного уровня Т-лимфоцитов при переходе заболевания в последующие стадии, сопровождающееся падением относительного и абсолютного уровня Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) и ростом относительного уровня цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), что обуславливает резкое снижение соотношения CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Но при этом мы выявили снижение абсолютного числа CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в группах с уровнем Т-хелперов от 200 до 499/мкл и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> менее 200/мкл, что связано со снижением общего числа Т-лимфоцитов. Со стороны дважды позитивной субпопуляции Т-лимфоцитов в исследуемых группах прослеживается снижение абсолютного их числа по сравнению с группой лиц с уровнем CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> более

500/мкл, при этом наблюдается рост абсолютного уровня дважды негативной субпопуляции Т-лимфоцитов, наблюдаемый во всех сравниваемых группах.

Так как популяция Т-лимфоцитов характеризуется такими двумя вариантами в зависимости от вида ТсR, как αβТ- и γδТ-клетки, то мы более подробно изучили их в зависимости от изменений уровня Т-хелперов. При анализе αβТ- и γδТ-клеток мы выявили статистически значимое снижение во всех группах относительного и абсолютного уровня αβТ-лимфоцитов, что связано также с падением общего числа Т-лимфоцитов и значительное падение абсолютного уровня γδТ-клеток в группах с уровнем CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 200-499/мкл и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> менее 200/мкл по сравнению с груп-

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ ЛИМФОЦИТОВ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИЦ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (M±m)

Показатели обследованных лиц	Группа 1 (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> 500 клеток/мкл и более)	Группа 2 (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> 200-499 клеток/мкл)	Группа 3 (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> 199 и менее клеток/мкл)
	n = 28	n = 69	n = 53
CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> , %	75,88±7,49	79,46±6,9*	75,5±7,1**
CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> , %	1650,0±542,37	1164,41±406,7*	784,4± 274,9***
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , %	31,83±6,2	25,88±8,8*	12,3±5,0***
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , абс	668,54±190,69	346,97±79,5*	120,2± 48,6***
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , %	41,5±9,6	49,53±11,1*	57,3±9,0***
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , абс	908,79±384,03	756,01±382,6*	598,1±241,8***
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> , у.е.	0,83±0,36	0,58±0,3*	0,2±0,1***
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , %	1,61±1,0	1,31±0,9	1,6±1,1
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , абс	24,93±14,59	14,84±10,2*	17,2±17,6*
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , %	5,24±2,19	6,96±3,3*	9,6±6,1***
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , абс	86,5±45,63	79,93±45,1	85,0±72,0

**Примечание.** \* – достоверность различий показателей в группах 2 и 3 по сравнению с группой 1 по U-критерию Манна–Уитни: p < 0,05; \*\* – достоверность различий показателей больных группы 3 по сравнению с группой 2 по U-критерию Манна–Уитни: p < 0,05.

ТАБЛИЦА 3.  $\alpha\beta$ Т-ЛИМФОЦИТОВ И  $\gamma\delta$ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИЦ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ  $CD3^+CD4^+$  ( $M \pm m$ )

Показатели обследованных лиц	Группа 1 ( $CD3^+CD4^+$ 500 клеток/мкл и более)	Группа 2 ( $CD3^+CD4^+$ 200-499 клеток/мкл)	Группа 3 ( $CD3^+CD4^+$ 199 и менее клеток/мкл)
	n = 28	n = 69	n = 53
$\alpha\beta$ Т-лимфоциты, %	72,18 $\pm$ 6,49	74,39 $\pm$ 6,9	69,7 $\pm$ 8,7**
$\alpha\beta$ Т-лимфоциты, абс	1553,04 $\pm$ 505,51	1091,45 $\pm$ 391,7*	723,8 $\pm$ 269,4* **
$\gamma\delta$ Т-лимфоциты, %	3,24 $\pm$ 1,8	3,4 $\pm$ 1,9	4,5 $\pm$ 3,7
$\gamma\delta$ Т-лимфоциты, абс	70,5 $\pm$ 47,66	48,97 $\pm$ 31,9*	41,3 $\pm$ 30,2*
Вирусная нагрузка	184,19 $\pm$ 69,7	2261,2 $\pm$ 2064,5*	572376 $\pm$ 437603* **

Примечание: \* – достоверность различий показателей в группах 2 и 3 по сравнению с группой 1 по U-критерию Манна–Уитни:  $p < 0,05$ ; \*\* – достоверность различий показателей больных группы 3 по сравнению с группой 2 по U-критерию Манна–Уитни:  $p < 0,05$ .

пой лиц с уровнем  $CD3^+CD4^+$  более 500/мкл при сохранном их относительном содержании. При этом мы наблюдаем рост уровня ВН, коррелирующий с падением уровня Т-хелперов ( $CD3^+CD4^+$ ) (табл. 3). Все это также указывает на истощение резервов иммунной системы в ответ на длительно персистирующий в организме антиген.

## Обсуждение

Таким образом, мы наблюдаем во всех исследуемых группах падение общего числа Т-лимфоцитов, снижение уровня как Т-хелперов, так и цитотоксических Т-лимфоцитов, как следствие падение соотношения  $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$  (за счет более глубокого угнетения Т-хелперов), снижение уровня дважды позитивной субпопуляции, т.е. истощение всех субпопуляций Т-лимфоцитов, коррелирующее со стадией заболевания. Все это также указывает на отсутствие активности Т-клеточного звена иммунной системы в ответ на рост как количества, так и длительности персистенции антигена в организме. Помимо этого, снижение  $CD3^+CD4^+$  клеток у ВИЧ-инфицированных лиц находится в тесной взаимосвязи с падением количества Т-клеток, несущих TCR $\gamma\delta$  рецептор, что подтверждается данными зарубежных исследований [8] о положительной корреляции  $\gamma\delta$ Т-клеток с уровнем  $CD3^+CD4^+$  лимфоцитов. Это указывает на формирование нарушения ответа на антиген не только зависимо от главного комплекса гистосовместимости (МНС), но также и независимого от МНС. Механизмы количественного и качественного истощения субпопуляции  $\gamma\delta$ Т-клеток неизвестны, частично потому, что эти клетки не несут рецептор  $CD4$  и, следовательно, устойчивы к ВИЧ. Помимо этого в течение ВИЧ-инфекции, происходит ослабление функциональных способностей  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, что может влиять на прогрессирование заболевания [5].

## Список литературы

1. Boullier S., Dadaglio G., Lafeuillade A. V delta 1 T cells expanded in the blood throughout HIV infection display a cytotoxic activity and are primed for TNF-alpha and INF-gamma production but are not selected in lymph nodes // J. Immunol. – 1997. – Vol. 159. – P. 3629-3667.
2. Bucy P., Chen C.L., Cihak J. Avian T-cells expressing  $\gamma\delta$  receptors localise in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium // J. Immunol. – 1988. – Vol. 141. – P. 2200-2205.
3. Dechanet J., Merville P., Lim A. Implication of  $\gamma\delta$  T cells in human immune response to cytomegalovirus // J. Clin. Invest. – 1999. – Vol. 103. – P. 1437-1449.
4. Hein W.R., Mackay C.R. Prominence of  $\gamma\delta$  T-cell in the ruminant immune system // Immunol. Today. – 1991. – Vol. 12. – P. 30-34.
5. Kosub D.A., Lehrman G., Milush J.M. Gamma/delta T-cell functional responses differ after pathogenic human immunodeficiency virus and nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections // J. Virol. – 2008. – Vol. 82. – P. 1155-1165.
6. Kuziel W.A., Takashima A., Bonyhadi M. Regulation of T-cell receptor g chain expression in murine thy-1 (+) dendritic epidermal cells // Nature. – 1987. – Vol. 328. – P. 263-266.
7. Li H., Peng H., Ma P., Pauza D., Shao Y. Association between V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T cells and disease progression after infection with closely-related viral strains of HIV in China // Clin. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 46. – P. 1466-1472.
8. Pawelec G., Sayers T., Busch F. Regulation of normal myelopoiesis and chronic myelogenous leukemia cell proliferation through a non-cytotoxic mechanism by a  $\gamma\delta$  cell clone // M. Immunol. Lett. – 1989. – Vol. 22. – P. 199-204.

поступила в редакцию 08.02.2010  
принята к печати 15.02.2010