

# РОЛЬ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА ИНФИЦИРОВАН- НЫХ ВИЧ-1 CD4<sup>+</sup> ЛИМФОЦИТОВ

Бойчук С.В., Мустафин И.Г., Макарова М.В.

Казанский государственный медицинский университет, Республиканский центр  
по профилактике и борьбе со СПИД и ИЗ МЗ РТ

**Резюме.** Эндотелиальные клетки (ЭК) обладают способностью индуцировать репликацию ВИЧ-1 в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах (Лф) и обуславливают их резистентность к апоптозу. Выявленные факты являются специфическими и обусловлены особенностями межклеточных взаимодействий между ЭК и клетками-продуцентами ВИЧ-1 и также являются следствием активационного статуса “продуктивно инфицированных” Лф.

**Ключевые слова:** эндотелиальные клетки (ЭК), лимфоциты (Лф), ВИЧ-1, репликация, апоптоз.

*Boichuk S.V., Mustafin I.G., Makarova M.V.*

## ROLE OF ENDOTHELIAL CELLS IN REGULATION OF APOPTOSIS OF HIV-1 INFECTED CD4<sup>+</sup> LYMPHOCYTES

**Abstract.** Vascular endothelial cells (VECs) are able to induce HIV-1 replication in CD4<sup>+</sup> T-cells, thus determining their resistance for apoptosis. The revealed facts are specific to EC/T-cell culture and are stipulated by the cell-cell interactions between the VECs and HIV-1 producing cells, thus being a consequence of activation of ‘productively infected’ T cells. (*Med. Immunol.*, 2006, vol.8, № 4, pp 523-530)

## Введение

Несмотря на то, что нарушения в регуляции апоптоза Лф при ВИЧ-инфекции являются в настоящее время убедительно доказанными, механизмы апоптоза инфицированных и неинфицированных ВИЧ-1 CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов остаются до сих пор дискуссионными. С одной стороны, логичными выглядят результаты исследований, иллюстрирующих ослабление программы апоптоза в инфицированных ВИЧ-1 CD4<sup>+</sup> Лф и клеточных линиях, что, в свою очередь, является необходимым фактором, обеспечивающим создание предпосылок для репликации вируса и резервуаров ВИЧ-1 [2, 18]. С другой стороны, также имеются многочисленные данные об усилении гибели CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов периферической крови и клеточных линий лимфоцитов, инфицированных ВИЧ-1 [9, 10, 16]. Данное противоречие может быть лишь отчасти объяснено различиями в лабораторных штаммах, использованных для инфицирования *in*

*vitro* [18]. В то же время, анализ активности различных структурных, регуляторных и вспомогательных белков ВИЧ-1 доказывает правомочность существования двух, противоположных друг другу, точек зрения. Базируясь на традиционных представлениях о том, что одним из характерных признаков патогенеза ВИЧ-инфекции является тенденция к прогрессированию заболевания, характеризующаяся нарастанием виремии и неуклонным снижением абсолютного числа CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, гибнущих преимущественно по механизму апоптоза [6, 14, 15], представляло интерес изучение взаимосвязи между уровнем репликации ВИЧ-1 и апоптозом инфицированных *in vitro* лимфоцитов. Учитывая полученные нами ранее данные, иллюстрирующие способность ЭК индуцировать репликацию ВИЧ-1 в CD4<sup>+</sup>-Лф [1, 4, 5, 21], нами была исследована способность ЭК модулировать восприимчивость к апоптозу у клеток-продуцентов ВИЧ-1.

## Адрес для переписки:

Бойчук Сергей Васильевич, 420012, Казань,  
Бутлерова, 49, Казанский государственный  
медицинский университет, кафедра  
патофизиологии. Тел.: (8432) 36-05-63,  
факс (8432) 36-03-93. E-mail: boichuksergei@mail.ru

## Материалы и методы

**Плазмиды и клеточные линии.** В качестве источника ВИЧ-1 использовали штамм NL4-3 (NIH AIDS Research&Reference Reagents Program, USA), геном которого был представлен в виде 2 плазмид (p83-2 и

p83-10), содержащих соответственно 5'- и 3'- последовательности генома ВИЧ-1 [3]. Плазмидную ДНК последовательно обрабатывали эндонуклеазой *EcoR1* и лигазой *T4* (New England Biolabs) и клонировали с использованием клеточной линии Ultracompetent-X10-Gold (Stratagene). Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Трансфекцию плазмид в клеточную линию CEMx174 (NIH AIDS Research & Reference Reagents Program, USA) осуществляли с использованием DEAE-декстрана (Sigma). Клетки CEMx174 культивировали в среде RPMI 1640 (Gibco), супернатанты аликвотировали и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Определение титров ВИЧ-1 и инфекционной активности.** Титр ВИЧ-1 в супернатантах определяли методом ИФА (EIA p24<sup>gag</sup>, Bio-Rad). Полученный штамм ВИЧ-1 использовали для инфицирования Лф периферической крови доноров, серонегативных по ВИЧ-1. Лф, выделенные центрифугированием на градиенте плотности Ficoll-Нугаке (Pharmacia), инкубировали в течение 3 дней в полной среде RPMI 1640 с добавлением ФГА (Gibco) (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) и IL-2 (Sigma) (10U/мл) с последующим внесением ВИЧ-1 (p24<sup>gag</sup> - 100 ng/мл), полученного в результате трансфекции вирусного генома в CEMx174. Супернатанты аликвотировали, титр вируса определяли методом ИФА (EIA p24<sup>gag</sup>, Bio-Rad) и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Определение инфекционной активности ВИЧ-1 проводили по общепринятым методикам с использованием клеточных линий HeLa/CD4- $\beta$ -gal, MAGI-CCR-5 и CEM-GFP (NIH AIDS Research & Reference Reagents Program, USA).

**Выделение и культивирование клеток.** Эндотелиальные клетки (ЭК) выделяли из вены пуповины с использованием коллагеназы IV типа (Sigma) с последующим культивированием в покрытых желатином пластиковых планшетах (Falcon) в среде 199 (Sigma) с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (Gibco), 2,5 mM L-глутамина (Sigma), гепарина (Sigma) и фактора роста эндотелиальных клеток (BD).

Мононуклеары периферической крови (МНПК) выделяли из периферической крови центрифугированием на градиенте плотности Ficoll-Paque (Pharmacia). CD4<sup>+</sup>-Лф выделяли из МНПК методом негативной иммуномагнитной селекции (Dyna). Популяцию неактивированных CD4<sup>+</sup>-Лф получали путем элиминации Лф, экспрессировавших маркеры активации (CD25, 69 и DR). Элиминацию активированных Лф осуществляли методом позитивной иммуномагнитной селекции (Dyna). Чистоту популяции Лф (CD4<sup>+</sup> 25<sup>-</sup> 69<sup>-</sup> DR<sup>-</sup>), использованных для последующего культивирования с ЭК, определяли методом прямой иммунофлуоресценции на проточном цитометре FACSCalibur (BD). В экспериментах, представленных в настоящей работе, чистота популяции составляла не менее 98%.

**Культивирование ЭК с CD4<sup>+</sup>-Лф.** Для индукции экспрессии молекул МНС II класса, ЭК инкубировали в течение 3-4 дней с IFN- $\gamma$  (1000U/ml) (BioSource) в 24-луночных плоскодонных пластиковых планшетах (Linbro). В лунки, содержащие ЭК (1 $\times 10^5$ ), вносили неактивированные Лф (1 $\times 10^6$ ) в 1 мл среды RPMI 1640 с добавлением 10% ФБС, L-глутамина и антибиотиков (Gibco). В это же время в культуру ЭК/Лф вносили эквивалентные дозы ВИЧ-1. Через 12 часов осуществляли полную замену среды RPMI 1640 с целью удаления не связавшегося ВИЧ-1. Клетки культивировали в течение 15 дней при  $37^{\circ}\text{C}$  и 5% CO<sub>2</sub>. Замену половины среды RPMI 1640 осуществляли каждые 3 дня. Супернатанты клеточных культур хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Определение уровня репликации вируса ВИЧ-1 осуществляли методом ИФА (Bio-Rad). Количество ВИЧ-инфицированных клеток определяли методом проточной цитометрии с использованием p24<sup>gag</sup> МАТ (Coulter).

**Оценка апоптоза инфицированных и неинфицированных клеток** Апоптоз Лф оценивали методом проточной цитометрии по следующим параметрам: снижение величины митохондриального потенциала ( $\Delta\Psi_m$ ), экспрессии фосфатидилсерина (ФС) и фрагментации ДНК. Для этого использовались соответствующие флуорохромы: 1)  $\Delta\Psi_m$  – CMX-Ros (Molecular Probes) и DiOC<sub>6</sub>(3) (Sigma); 2) ФС – MC540 (Sigma) и Annexin V (PharMingen); 3) фрагментация ДНК – PI и 7-ADD (Sigma). Для оценки апоптоза продуктивно инфицированных и не инфицированных Лф проводили многоцветное окрашивание с использованием вышеуказанных флуорохромов и моноклональных АТ к p24<sup>gag</sup> антигену ВИЧ-1 (Coulter).

**Оценка активационного статуса CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов** осуществлялась по экспрессии активационных маркеров CD25, 69, 71 и DR с использованием соответствующих МАТ (все от PharMingen). Проллиферативный ответ Лф, культивированных с ЭК, оценивали методом проточной цитометрии согласно общепринятому протоколу по снижению интенсивности флуоресценции CFSE (Molecular Probes). Анализ активационного статуса и пролиферативного ответа инфицированных и не инфицированных Лф осуществлялся путем проведения вышеуказанных процедур с одновременным проведением окрашивания на наличие внутриклеточного p24<sup>gag</sup> антигена ВИЧ-1 (см. выше).

## Результаты

### Роль ЭК в регуляции апоптоза инфицированных и неинфицированных Лф

Для изучения роли ЭК в регуляции апоптоза продуктивно инфицированных Лф и неинфицированных Лф, был проведен сравнительный анализ и

подсчет количеств клеток, имевших признаки апоптоза, в следующих экспериментальных моделях: 1) инфицирование *in vitro* Лф, культивированных с ЭК; 2) инфицирование *in vitro* ФГА-активированных Лф; 3) инфицирование *in vitro* индикаторной клеточной линии СЕМ-GFP и линии СЕМx174.

Было обнаружено, что подавляющее количество Лф, гибнущих по механизму апоптоза, при культивировании Лф с ЭК составляют неинфицированные Лф (не содержавшие p24<sup>gag</sup>). В то же время Лф, являвшиеся продуцентами ВИЧ-1 (позитивные по p24<sup>gag</sup>), обладали выраженной устойчивостью к программированной клеточной гибели (рис.1). Важно отметить, что в культуре ФГА- активированных Лф, клетки-продуценты ВИЧ-1 обладали значительно меньшей устойчивостью к апоптозу, а % клеток с признаками апоптоза был одинаковым среди инфицированной и неинфицированной популяции Лф. Аналогичная динамика прослеживалась и при инфицировании клеточных линий.

### Активационный статус инфицированных и неинфицированных Лф

Базирясь на традиционных представлениях о различной чувствительности к апоптозу активированных и неактивированных клеток, представляло интерес изучение экспрессии ранних и поздних маркеров активации инфицированных и неинфицированных Лф, культивированных с ЭК, а также в культуре ФГА-активированных Лф. Было выявлено, что в культуре Лф, культивированных с ЭК, клетки-продуценты ВИЧ-1 не экспрессируют практически ни один из промежуточных (CD25) и поздних (VLA-1, DR) маркеров активации (рис.2 – правые верхние квадраты в режиме dot-plot). Лишь незначительная фракция продуктивно инфицированных Лф экспрессировала ранний маркер активации - CD69 (рис.2 – правый верхний квадрат в режиме dot-plot). Тем не менее, важно отметить, что ЭК обладали способностью активировать Лф. Об этом свидетель-

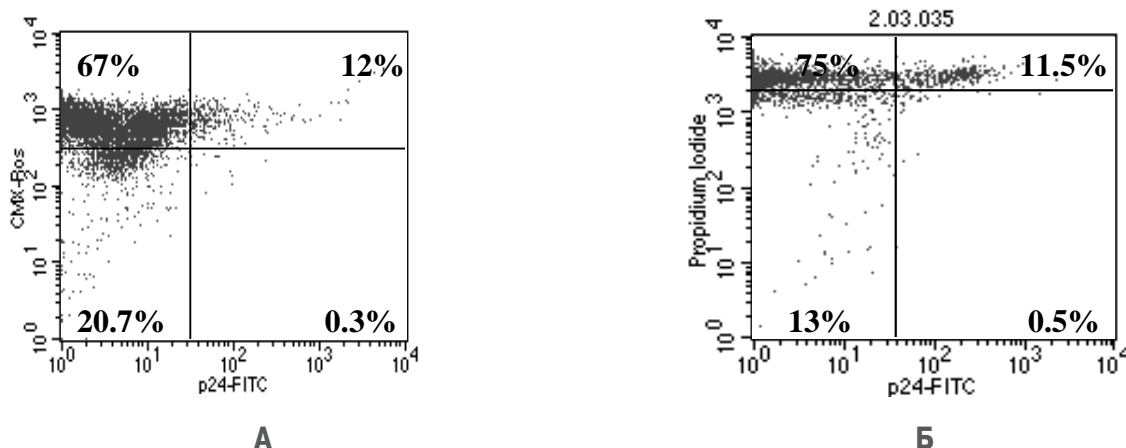


Рис. 1. Снижение величины митохондриального потенциала (А) и фрагментация ДНК (Б) у продуктивно инфицированных (p24<sup>gag</sup> –позитивных) и неинфицированных (p24<sup>gag</sup> –негативных) Лф, культивированных с ЭК.

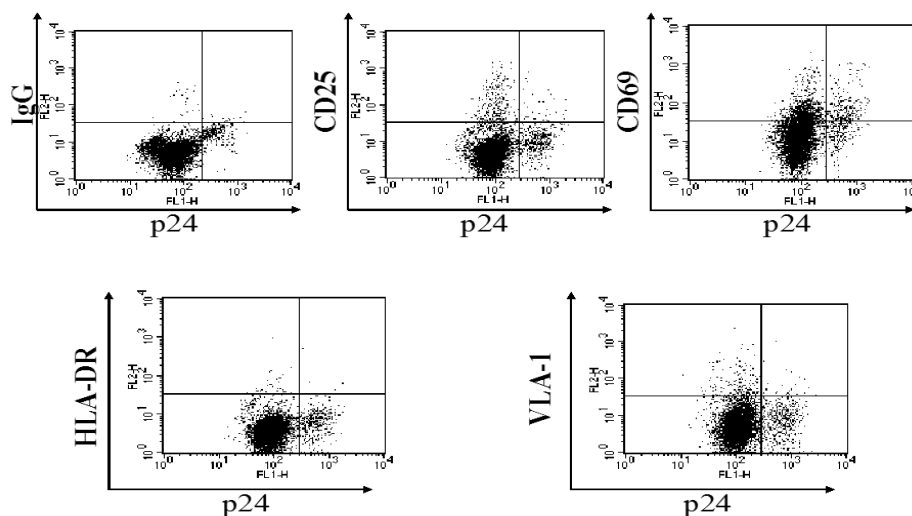


Рис.2. Экспрессия ранних (CD69), промежуточных (CD25) и поздних (HLA-DR и VLA-1) активационных маркеров на поверхности продуктивно инфицированных (p24<sup>gag</sup>-позитивных) и неинфицированных (p24<sup>gag</sup>-негативных) Лф, культивированных с ЭК.

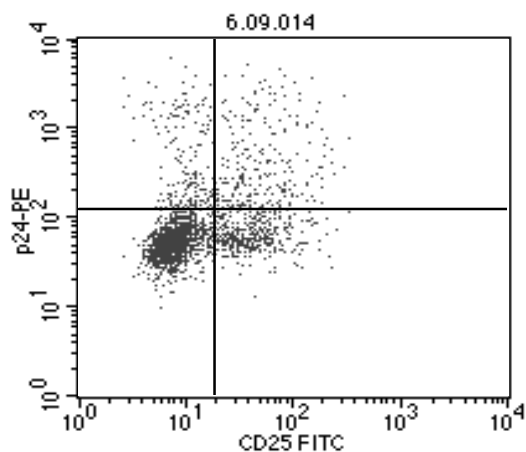


Рис. 3. Экспрессия CD25 на поверхности продуктивно инфицированных (p24<sup>agg</sup> – положительных) и неинфицированных (p24<sup>agg</sup> – негативных) Лф, в культуре ФГА-активированных Лф.

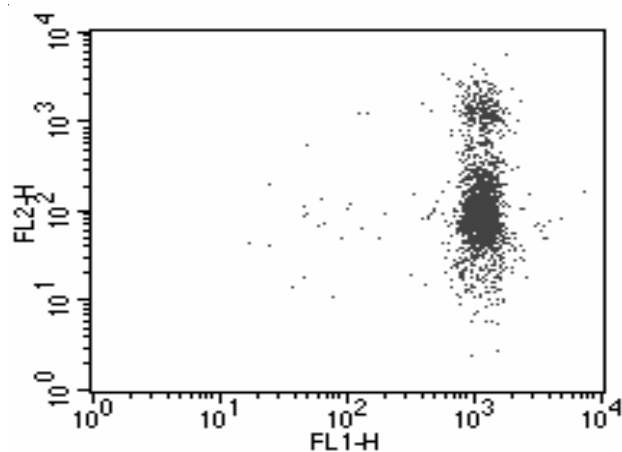
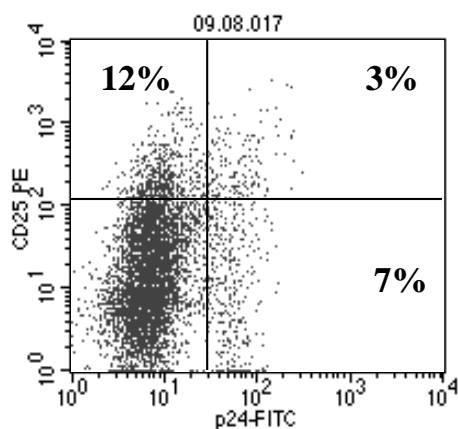
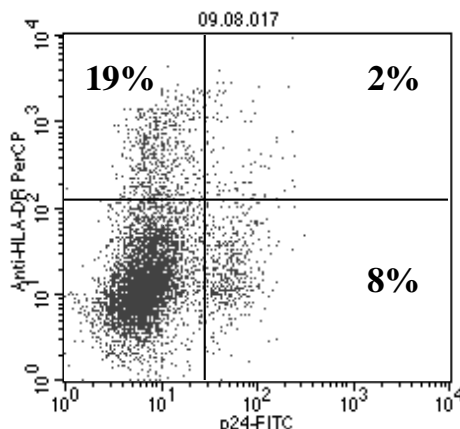


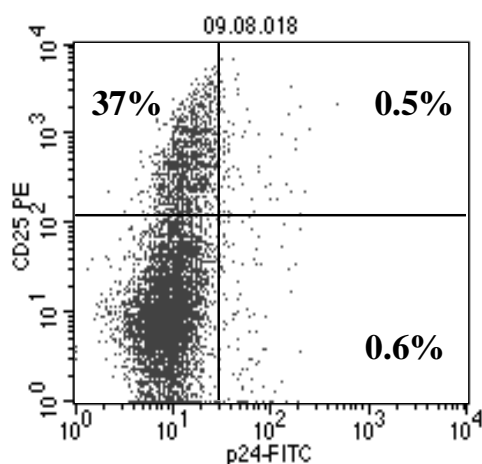
Рис. 4. Проллиферативный статус Лф, культивированных с ЭК и инфицированных *in vitro* ВИЧ-1. По оси абсцисс (FL 1) – интенсивность флуоресценции CFSE, снижение интенсивности флуоресценции которого свидетельствует о клеточном делении. По оси ординат (FL2) – интенсивность флуоресценции МАТ к p24<sup>agg</sup> антигену ВИЧ-1, конъюгированных с PE.



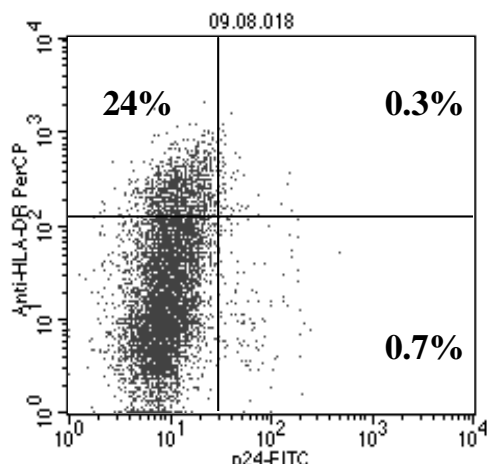
А



Б

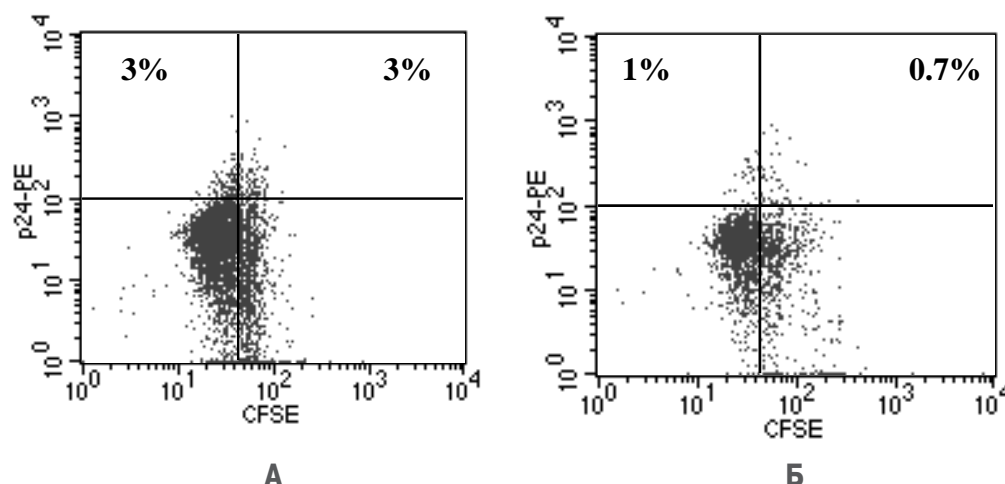


В



Г

Рис. 5. Экспрессия активационных маркеров (CD25, HLA-DR) на поверхности инфицированных Лф (левые квадраты режима dot-plot) и не инфицированных Лф (правые квадраты режима dot-plot), культивированных в присутствии IL-7 (А, Б) и IL-2 (В, Г).



**Рис.6.** Проллиферативный статус Лф, инфицированных *in vitro* и культивированных в присутствии IL-7 (А) и IL-2 (Б). Снижение интенсивности флуоресценции CFSE свидетельствует о клеточном делении. Повышение интенсивности флуоресценции МАТ к р24<sup>gag</sup> антигену ВИЧ-1 ( по сравнению с изотипическим контролем) свидетельствует о наличии пула продуктивно инфицированных Лф.

ствовал факт экспрессии вышеуказанных маркеров на неинфицированной популяции Лф (рис.2– левые верхние квадраты в режиме dot-plot). Анализ экспрессии аналогичных активационных маркеров у инфицированных и неинфицированных клеток в культуре ФГА-активированных Лф выявил существенные различия по сравнению с Лф, культивированными с ЭК. В частности, было выявлено, что значительная часть Лф (> 60%), являвшихся продуцентами ВИЧ-1, экспрессировала молекулу CD25, являющуюся, как известно,  $\alpha$ -цепью рецептора к IL-2 (рис.3 - правый верхний квадрат в режиме dot-plot).

#### Проллиферативная способность инфицированных и неинфицированных Лф

Учитывая тот факт, что клеточные линии обладают заведомо высоким пролиферативным индексом, был проведен сравнительный анализ пролиферативной способности инфицированных и неинфицированных Лф только на первых 2-х моделях (Лф, культивированные в присутствии ЭК, и ФГА-активированные Лф).

Было показано, что клетками-продуцентами ВИЧ-1 в культуре Лф, культивированных с ЭК, являются непродлиферирующие клетки (рис.4). В то же время подавляющее большинство (>90%) клеток-продуцентов ВИЧ-1 в культуре ФГА-активированных Лф было представлено пролиферирующей популяцией Лф.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что при инфицировании *in vitro*  $CD4^+$  Т-Лф, культивированных с ЭК, большинство клеток-продуцентов ВИЧ-1 резистентны к апоптозу, что, по всей видимости, обусловлено состоянием их активационного статуса и клеточного цикла.

В остальных экспериментальных моделях (ФГА-активированные Лф, лимфоидные линии СЕМ-GFP и СЕМ х 174) высокий пролиферативный индекс и активационный статус клеток-продуцентов ВИЧ-1 обуславливал их подверженность апоптозу.

#### Роль цитокинов в активации Лф и репликации ВИЧ-1

Было выявлено, что культивирование неактивированных Лф в присутствии IL-2 и IL-7 дозозависимо индуцировало их активацию и пролиферацию и активацию (рис.5, 6). Важно отметить, что, несмотря на выраженный активационный эффект IL-2, количество клеток-продуцентов ВИЧ-1 было незначительным (рис.5, В, Г). Более того, клетками-продуцентами ВИЧ-1 являлись как клетки, экспрессировавшие активационные маркеры, так и без них. Аналогичная закономерность была выявлена и при исследовании пролиферативного статуса клеток-продуцентов ВИЧ-1, инкубированных с IL-2 (рис. 6Б). Несмотря на то, что количество активированных и пролиферирующих Лф, культивированных в присутствии IL-7, было меньшим по сравнению с Лф, культивированными с IL-2 (рис. 5, 6), количество продуктивно инфицированных Лф в первом случае было выше ( $p < 0,01$ ). Полученные данные указывают на существование гетерогенного (по активационному и пролиферативному статусу) пула клеток-продуцентов ВИЧ-1. В данной модели подтвердилась выявленная нами ранее закономерность (рис.4), свидетельствующая о возможности репликации ВИЧ-1 в непродлиферирующих Лф и не экспрессирующих классические маркеры активации. Тем не менее, следует отметить, что пул продуктивно инфицированных Лф, культивированных с ЭК, был представлен однородной популяцией клеток (неактивированные и непродлиферирующие Лф) (рис. 2, 4).



Роль цитокинов в регуляции апоптоза клеток-продуцентов ВИЧ-1.

Исследование апоптоза Лф, культивированных в присутствии IL-2 и IL-7 показало, что количество продуктивно инфицированных Лф, имевших признаки апоптоза существенно выше по сравнению с таковыми в культуре Лф, культивированных с ЭК.

Таким образом, цитокины (IL-2, IL-7) обладают способностью индуцировать репликацию ВИЧ-1 в Лф. Однако изменение активационного и пролиферативного статуса Лф, а также подверженность клеток-продуцентов ВИЧ-1 к апоптозу при их культивировании с цитокинами, свидетельствует о том, что резистентность продуктивно инфицированных клеток к апоптозу в культуре ЭК/Лф не связана с секрецией цитокинов как самими ЭК (в случае IL-7), так и активированными Лф (применимо как для IL-2, так и IL-7).

## Обсуждение

Проведенные исследования, посвященные механизмам репликации ВИЧ-1 и чувствительности клеток-продуцентов ВИЧ-1 к апоптозу, выявили несколько заслуживающих внимания фактов, выносимых на обсуждение.

Во-первых, нами была установлена возможность репликации ВИЧ-1 в неактивированных и непродлиферирующих Лф.

Во-вторых, именно этот статус клеток-продуцентов ВИЧ-1 является фактором, обуславливающим их устойчивость к запрограммированной клеточной гибели, так как пролиферирующие и активированные Лф (стимулированные с помощью ФГА), а также клеточные линии при их инфицировании ВИЧ-1, интенсивно погибают по механизму апоптоза.

В-третьих, ЭК обладают способностью индуцировать репликацию ВИЧ-1 и обуславливать резистентность клеток-продуцентов ВИЧ-1 к апоптозу. Эта способность, по всей видимости, не связана с секрецией цитокинов (продуцируемых как самими ЭК, так и пулом ЭК-активированных Лф) и обусловлена лиганд-рецепторными взаимодействиями между ЭК и клетками-продуцентами ВИЧ-1.

Статус клеток-продуцентов ВИЧ-1, культивированных с ЭК, может быть обусловлен, в свою очередь, несколькими факторами. Во-первых, ЭК как полупрофессиональные антиген-презентирующие клетки (АПК) в силу отсутствия экспрессии ко-стимулирующих молекул (семейства B7), могут обладать уникальной способностью стимулировать репликацию ВИЧ-1 в Лф при их минимальной активации, не сопровождающейся экспрессией “классических” активационных маркеров и входом клеток в одну из фаз клеточного цикла. Во-вторых, “минимальная активация” клеток-продуцентов ВИЧ-1

может быть обусловлена межклеточными взаимодействиями между гетерогенной популяцией Лф (ЭК-активированных и неактивированных – см. рис. 4), культивированных в присутствии ЭК.

Логичным выглядело предположение о том, что пул Лф, активированных (но не инфицированных ВИЧ-1) после стимуляции со стороны ЭК, способен взаимодействовать (секреция растворимых факторов или лиганд-рецепторное взаимодействие) с Лф, вызывая их субпороговую активацию и индуцировать тем самым репликацию ВИЧ-1. Учитывая литературные данные (порой противоречивые) о том, что цитокины (IL-2, 6, 7, 15, TNF- $\alpha$ ) обладают способностью индуцировать репликацию ВИЧ-1 в клетках, не вызывая при этом значительных изменений их состояния (без признаков активации и пролиферации), нами было сделано предположение о том, что цитокины, секретируемые ЭК и/или пулом ЭК-активированных Лф, способны индуцировать репликацию ВИЧ-1 в непродлиферирующих и минимально активированных Лф.

Для проверки данной гипотезы были проведены эксперименты с культивированием неактивированных Лф (CD25<sup>+</sup>69<sup>+</sup>71<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>) в присутствии цитокинов. Результаты исследований последних лет свидетельствуют о том, что IL-7 обладает наиболее выраженной способностью индуцировать репликацию ВИЧ-1 в Лф, не изменяя существенным образом их состояние [7, 13, 17, 19, 20, 22]. Кроме того, имеются данные, что IL-7, являющийся важнейшим фактором лимфопоеза, обладает выраженными антиапоптотическими свойствами по отношению к Лф. В то же время существует и противоположная точка зрения [11, 12]. В связи с этим для проверки нашей гипотезы нами был выбран именно IL-7, продуцентами которого могли стать как ЭК, так и активированные Лф. Результаты экспериментов с культивированием Лф в присутствии IL-2 (потенциальными продуцентами которого могли явиться только активированные Лф), позволили бы нам разграничить эффекты ЭК и ЭК-активированных Лф в индукции резистентности к апоптозу продуктивно инфицированных Лф, культивированных с ЭК.

Результаты исследования по инкубации Лф в присутствии цитокинов (IL-2, 7) показали, что резистентность к апоптозу у клеток-продуцентов ВИЧ-1, культивированных с ЭК, не связана с секрецией цитокинов, продуцируемых активированными Лф (т.к. отсутствовал эффект IL-2). Способность ЭК индуцировать репликацию ВИЧ-1 в Лф и обуславливать резистентность к апоптозу у продуктивно инфицированных Лф, по всей видимости, не связана с секрецией растворимых факторов (т.к. отсутствовал эффект IL-7). Следовательно, наиболее вероятной причиной выявленного нами феномена являются межклеточные лиганд-рецепторные взаимодействия между ЭК и продуктивно инфициро-

ванными Лф. Для окончательного утверждения правомочности данного предположения, требуется проведение дальнейших исследований. Одним из направлений может являться культивирование Лф в присутствии других цитокинов, потенциальными продуцентами которых могут являться ЭК. В случае выявления у какого-либо из исследуемых цитокинов эффекта, аналогичного эффекту ЭК (репликация ВИЧ-1 в неактивированных и непродлиферирующих Лф, сопровождающаяся их резистентностью к апоптозу), целесообразным будет проведение исследований с использованием блокирующих моноклональных АТ к соответствующему цитокину (ам). Доказательством в пользу существования лиганд-рецепторных взаимодействий между ЭК и продуктивно инфицированными Лф, обуславливающими их резистентность к апоптозу, будут являться результаты экспериментов по раздельному культивированию ЭК и Лф (культивирование CD4<sup>+</sup>-Лф, разделенных от ЭК полупроницаемой мембраной), а также эксперименты с использованием блокирующих мАТ к соответствующим парам лиганд-рецепторных взаимодействий между ЭК и Лф.

Резюмируя вышеизложенное, следует отметить, что пул неактивированных и непродлиферирующих Лф, образующийся в ходе межклеточных взаимодействий с ЭК и являющийся источником репликации ВИЧ-1, может служить предпосылкой для длительной персистенции вируса в силу невосприимчивости клеток с вышеизложенными характеристиками к антиретровирусной терапии и их устойчивости к апоптозу. В то же время подавляющее количество клеток, погибающих по механизму апоптоза, составляют неинфицированные и/или латентно инфицированные Лф, культивированные с ЭК. Следует также отметить, что используемая нами модель инфицирования *in vitro* Лф при их культивировании с ЭК, является, на наш взгляд, максимально приближенной к ситуации *in vivo*, где подавляющее количество клеток, гибнущих по механизму апоптоза, представлено неинфицированной популяцией [8]. Способность ЭК индуцировать репликацию ВИЧ-1 и обуславливать резистентность клеток-продуцентов ВИЧ-1 к апоптозу может являться важным фактором патогенеза ВИЧ-инфекции, особенно на стадии прогрессирования заболевания, сопровождающейся, как известно, деструктивными изменениями в лимфоидной ткани, и исключаящими возможность межклеточных взаимодействий между профессиональными АПК и инфицированными Лф, приводящих к активации последних и индуцирующих в них репликацию ВИЧ-1.

## Список литературы

1. Бойчук С.В., Мустафин И.Г. Роль эндотелиальных клеток и ВИЧ-1 белка *Nef* в патогенезе

ВИЧ-инфекции: новые механизмы репликации ВИЧ-1 // Медицинская иммунология - 2004. - Т.6., № 6. - С. 499-506.

2. Antoni B., Sabbatini P., Rabson A., White E. Inhibition of apoptosis in human immunodeficiency virus-infected cells enhances virus production and facilitates persistent infection // J. Virol., 69. - 1995 - P. 2384-2392.

3. Adachi A., Gendelman H. E., Koenig S., Folks T., Willey R., Rabson A., Martin M.A.. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone // J. Virol. - 1986. - Vol. 59. - P. 284-291.

4. Boichuk S., Choi J., Walker J., Pober J., Alexander L. Vascular endothelial cells (VECs) form the surface of blood vessels therefore are in frequent contacts with HIV-infected T-cells. Abstr. of Cold Spring Harbor Conference "Retroviruses", New-York, 2003, p. 38-39.

5. Choi J., Walker J., Boichuk S., Kirkiles-Smith N., Pober J.S., Alexander L. Human endothelial cells enhance human immunodeficiency virus type 1 replication in CD4<sup>+</sup> T cells in a Nef-dependent manner *in vitro* and *in vivo* // J. Virol. - 2005. - Vol 79(1) - P. 264-276.

6. Desrosiers R. Prospects for live attenuated HIV // Nat. Med. - 1998. - Vol. 4(9) - P.982.

7. Ducrey-Rundquist O., Guyader M., Trono D. Modalities of interleukin-7-induced human immunodeficiency virus permissiveness in quiescent T lymphocytes // J Virol. - 2002. - Vol. 76(18). - P. 9103-9111.

8. Finkel T.H., Tudor-Williams G., Banda N.K., Cotton M.F., Curiel T., Monks C., Baba T.W., Ruprecht R.M., Kupfer A. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes // Nat. Med. - 1995 - Vol. 1. - P129-134.

9. Gadhi R., Chen B., Straus S., Dale J., Lenardo M. Baltimore D. HIV-directly kills CD4<sup>+</sup> T cells by Fas-independent mechanism // J. Exp. Med. -1998. - Vol. 187. - P. 1113-1122.

10. Herbein G., van Lint., J. Lovett., E. Verdin. Distinct mechanisms trigger apoptosis in human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected bystander T lymphocytes // J. Virol. - 1998. - Vol. 72. - P. 660-670

11. Jaleco S., Kinet S., Hassan J., Dardalhon V., Swainson L., Reen D., Taylor N. IL-7 and CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation // Blood. - 2002.- Vol. 100(13). - P. 4676-4677.

12. Lelievre J.D., Petit F., Arnoult D., Ameisen J.C., Estaquier J. Interleukin 7 increases human immunodeficiency virus type 1 LAI-mediated Fas-induced T-cell death // J. Virol. - 2005 - Vol. 79(5). - P. 3195-3199.

13. Lehrman G., Ylisastigui L., Bosch R.J., Margolis D.M. Interleukin-7 induces HIV type 1 outgrowth from peripheral resting CD4<sup>+</sup> T cells // J. Acquir Immune Defic Syndr. - 2004 - Vol.36(5). P. 1103-1104.

14. Lifson J.D., Nowak M.A., Goldstein S., Rossio J.L., Kinter A., Vasquez G., Wiltrout T.A., Brown C., Schneider D., Wahl L., Lloyd A.L., Williams J., Elkins W.R., Fauci A.S., Hirsch V.M. The extent of early viral replication is a critical determinant of the natural history of simian immunodeficiency virus infection // J Virol. - 1997. - Vol. 71(12). - P. 9508-9514.
15. Mellors J.W., Rinaldo C.R., Gupta P., White R.M., Todd J.A., Kingsley L.A. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus plasma // Science. - 1996. - Vol. 272. - P. 1167-1170.
16. Noraz N., Gozlan J., Corbeil J., Brunner T., Spector S. HIV-induced apoptosis of activated primary CD4<sup>+</sup> T lymphocytes is not mediated by Fas-Fas ligand // AIDS. - 1997. - Vol. 11. - P. 1671-1680.
17. Pett S.L., Kelleher A.D. Cytokine therapies in HIV-1 infection: present and future // Expert Rev Anti Infect Ther. - 2003. - Vol. 1(1). - P. 83-96.
18. Rapaport E., Casella C., Ikle D., Mustafa F., Isaak D., Finkel T. Mapping of HIV-1 determinants of apoptosis in infected T cells // Virology - 1998. - Vol. 252. - P. 407-417.
19. Scripture-Adams D.D., Brooks D.G., Korin Y.D., Zack J.A. Interleukin-7 induces expression of latent human immunodeficiency virus type 1 with minimal effects on T-cell phenotype // J. Virol. 2002. - Vol. 76(24). - P. 13077-13082.
20. Unutmaz D., KewalRamani V.N., Marmon S., Littman D.R. Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes // J. Exp. Med. - 1999. - Vol. 189(11). - P. 1735-46.
21. Walker J., Choi J., Boichuk S., Kirkiles-Smith N., Pober J.S., Alexander L. HIV-1 Nef Mediates Vascular Endothelial Cell Signals Greatly Enhancing HIV-1 Replication in Extra-nodal CD4<sup>+</sup> Memory T cells. Abstr. of 11<sup>th</sup> Conference of Retroviruses and Opportunistic Infections, San-Francisco, 2004, № 69.
22. Wang F.X., Xu Y., Sullivan J., Souder E., Argyris E.G., Acheampong E.A., Fisher J., Sierra M., Thomson M.M., Najera R., Frank I., Kulkosky J., Pomerantz R.J., Nunnari G. IL-7 is a potent and proviral strain-specific inducer of latent HIV-1 cellular reservoirs of infected individuals on virally suppressive HAART // J. Clin. Invest. - 2005. - Vol. 115(1). - P. 128-137.

*поступила в редакцию 16.02.2006*

*отправлена на доработку 21.03.2006*

*принята к печати 05.04.2006*