

# РОЛЬ КОИНФЕКЦИИ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С В НАРУШЕНИИ ПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ ТИМУСА У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ НА ФОНЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИ НЕЭФФЕКТИВНОЙ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

Сайдакова Е.В.<sup>1</sup>, Королевская Л.Б.<sup>1</sup>, Шмагель Н.Г.<sup>2</sup>,  
Шмагель К.В.<sup>1</sup>, Черешнев В.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» Уральского отделения РАН, г. Пермь, Россия

<sup>2</sup> ГКУЗ «Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», г. Пермь, Россия

<sup>3</sup> ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия

**Резюме.** Исследована роль коинфекции вирусным гепатитом С (ВГС) в нарушении восстановления CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных больных, получающих антиретровирусную терапию (АРТ). Обследовано 78 пациентов с эффективным вирусологическим ответом на АРТ (вирусная нагрузка < 50 копий/мл), ответивших и не ответивших ростом числа CD4<sup>+</sup>Т-клеток на терапию через два года лечения. Контрольную группу составил 21 относительно здоровый доброволец. Проведена оценка количества основных субпопуляций Т-лимфоцитов, определены темпы их гибели. Продуктивная функция тимуса оценивалась по числу αTREC-положительных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеток. Показано, что для ВИЧ/ВГС-коинфекции характерно более низкое, по сравнению с ВИЧ-моноинфекцией, количество CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в крови, что не связано с увеличенными темпами их гибели. Также продемонстрировано, что коинфекция ВГС снижает продукцию CD4<sup>+</sup>, но не CD8<sup>+</sup>Т-клеток вилочковой железой.

**Ключевые слова:** ВИЧ/ВГС-коинфекция, антиретровирусная терапия, иммунологический неответ, апоптоз, продуктивная функция тимуса

## Адрес для переписки:

Сайдакова Евгения Владимировна  
аспирант лаборатории экологической  
иммунологии Института экологии  
и генетики микроорганизмов УрО РАН  
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.  
Тел.: 8 (342) 280-83-34.  
Факс: 8 (342) 280-92-11.  
E-mail: radimira@list.ru

## Авторы:

Сайдакова Е.В. — аспирант лаборатории  
экологической иммунологии ФГУН «Институт  
экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН,  
г. Пермь, Россия  
Королевская Л.Б. — к.м.н., младший научный  
сотрудник лаборатории экологической  
иммунологии ФГУН «Институт экологии и генетики  
микроорганизмов» УрО РАН, г. Пермь, Россия  
Шмагель Н.Г. — к.м.н., врач-иммунолог ГКУЗ  
«Пермский краевой центр по профилактике и борьбе  
со СПИД и инфекционными заболеваниями», г. Пермь,  
Россия  
Шмагель К.В. — д.м.н., заместитель директора  
по научной работе ФГУН «Институт экологии  
и генетики микроорганизмов» УрО РАН, г. Пермь  
Черешнев В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН и  
РАМН, директор ФГБУН «Институт иммунологии  
и физиологии» УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

Поступила 10.04.2013

Отправлена на доработку 19.04.2013

Принята к печати 24.04.2013

# ROLE OF HEPATITIS C VIRUS COINFECTION IN VIOLATION OF PRODUCTIVE THYMIC FUNCTION IN HIV-INFECTED PATIENTS UNDER IMMUNOLOGICALLY INEFFICIENT ANTIRETROVIRAL THERAPY

Saidakova E.V.<sup>a</sup>, Korolevskaya L.B.<sup>a</sup>, Shmagel N.G.<sup>b</sup>,  
Shmagel K.V.<sup>a</sup>, Chereshnev V.A.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Ural branch, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> Perm Regional Center for Protection against AIDS and Infectious Diseases, Perm, Russian Federation

<sup>c</sup> Institute of Immunology and Physiology, Russian Academy of Sciences, Ural branch, Ekaterinburg, Russian Federation

**Abstract.** The role of hepatitis C virus (HCV) co-infection in violation of restoring CD4<sup>+</sup>T cells in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy (ART) was investigated. Seventy eight patients with effective virological response to ART (viral load < 50 copies/ml) who either had or had no good immunological CD4<sup>+</sup>T-cell response after two years of treatment were recruited. Twenty one relatively healthy volunteers served as controls. The numbers of main T-lymphocyte populations and their apoptosis rates were determined. Thymus productive function was assessed by the number of  $\alpha$ TREC-positive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T cells. It is shown that HIV/HCV co-infection is characterized by lower numbers of CD4<sup>+</sup>T-lymphocytes in patients' blood compared with HIV-monoinfection. This is not associated with the cells' increased death rates. We also demonstrate that HCV coinfection reduces the production of CD4<sup>+</sup>, but not CD8<sup>+</sup>T-lymphocytes, by the thymus. (*Med. Immunol.*, 2013, vol. 15, N 6, pp 543-552)

**Keywords:** HIV/HCV-coinfection, antiretroviral therapy, immunological areactivity, apoptosis, thymic productive function

## Address for correspondence:

Saidakova Evgenia V.  
PhD Candidate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Ural branch  
614081, Russian Federation, Perm, Goleva str., 13  
Phone: 7 (342) 280-83-34.  
Fax: 7 (342) 280-92-11.  
E-mail: radimira@list.ru

## Authors:

Saidakova E.V., PhD Candidate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Ural branch, Perm, Russian Federation  
Korolevskaya L.B., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Ural branch, Perm, Russian Federation  
Shmagel N.G., PhD (Medicine), Clinical Immunologist, Perm Regional Center for Protection against AIDS and Infectious Diseases, Perm, Russian Federation  
Shmagel K.V., PhD, MD (Medicine), Deputy Director for Research, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Ural branch, Perm, Russian Federation  
Chereshnev V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member of Russian Academy of Sciences and Russian Academy of Medical Science, Director, Institute of Immunology and Physiology, Russian Academy of Sciences, Ural branch, Ekaterinburg, Russian Federation

Received 10.04.2013

Revision received 19.04.2013

Accepted 24.04.2013

## Введение

Особенностью ВИЧ-инфекции в России является преимущественно парентеральный путь заражения. По данным Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом, употребление наркотиков — основной фактор риска заражения в 2000–2011 гг. [1]. В Пермском крае передача ВИЧ-инфекции при употреблении внутривенных наркотиков достигает 66,4% [2]. В связи с тем, что вирусный гепатит С (ВГС) и ВИЧ имеют общие пути заражения, ВИЧ/ВГС-коинфекция является широко распространенным явлением. Известно, что эти два заболевания могут взаимно отягощать течение друг друга [3]. Поэтому изучение вопросов, касающихся особенностей восстановления иммунитета у больных сочетанной патологией ВИЧ/ВГС на фоне антиретровирусной терапии (АРТ), является актуальным.

Под влиянием АРТ, как правило, отмечается выраженное снижение вирусной нагрузки ВИЧ (до уровня ниже чувствительности тест-систем) и прогрессивное нарастание численности CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов в крови. Однако, несмотря на устойчивое подавление репликации вируса, у части пациентов (10–30% больных) не происходит увеличения количества CD4<sup>+</sup>T-клеток в течение длительного времени. Этим больных называют «иммунологическими неответчиками». Такие пациенты выявлены многими исследователями [4, 5]. Причины феномена на сегодняшний день остаются невыясненными. Проведенный нами ранее анализ зависимости иммунологического ответа от коинфекции ВГС выявил наличие достоверной обратной связи между этими параметрами [2]. При этом обнаружилось, что вероятность развития выраженной CD4-лимфопении у ВИЧ-инфицированных больных с ВГС была в 1,9 раз выше, чем у пациентов без него. Напротив, при отсутствии коинфекции, шансы на сохранение высокой исходной численности CD4<sup>+</sup>T-клеток и, следовательно, возможности ответа на АРТ возрастали в 4,5 раза. И хотя нам удалось установить взаимосвязь между ВГС-коинфекцией и увеличением риска развития иммунологического неответа на терапию, механизмы этого явления остаются невыясненными.

Причиной CD4<sup>+</sup>T-лимфопении может быть убыль этих клеток на периферии [6] или дефицит поступления наивных лимфоцитов из вилочковой железы [7]. При этом на фоне ВИЧ-инфекции тимус может подвергаться патологическим морфологическим изменениям, таким как сокращение числа тимоцитов, ускоренная инволюция и нарушение архитектуры стромы железы [8]. ВИЧ-инфекция также может оказывать влияние на продуктивную функцию тимуса, снижая эф-

фективность иммунологического ответа на АРТ [9]. Влияние ВГС на функциональную активность вилочковой железы на сегодняшний день не изучено. **Целью настоящего исследования** было выявление влияния ВГС-коинфекции на апоптоз Т-лимфоцитов и нарушение продуктивной функции тимуса у ВИЧ-инфицированных пациентов на фоне вирусологически эффективной АРТ.

## Материалы и методы

### Пациенты

Всего обследовано 99 человек: 78 ВИЧ-инфицированных пациентов, наблюдающихся в ГКУЗ «ПКЦ СПИД и ИЗ», и 21 условно здоровый доброволец без ВИЧ- и ВГС-инфекции. Все ВИЧ-инфицированные пациенты до начала АРТ имели уровень CD4<sup>+</sup>T-клеток в крови < 200 в мкл, находились на терапии не менее двух лет и к моменту обследования репликация ВИЧ у них была полностью подавлена (< 50 копий в мл крови). Исходя из наличия ВГС-коинфекции и уровня иммунологического ответа (стандартного или ослабленного восстановления числа CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов) на АРТ, они были разделены на 4 группы (табл. 1):

- 1) ВИЧ<sup>+</sup>/ВГС<sup>+</sup>, число CD4<sup>+</sup>T-клеток через 2 года лечения > 350 в мкл (n = 21);
- 2) ВИЧ<sup>+</sup>/ВГС<sup>-</sup>, число CD4<sup>+</sup>T-клеток через 2 года лечения > 350 в мкл (n = 20);
- 3) ВИЧ<sup>+</sup>/ВГС<sup>+</sup>, число CD4<sup>+</sup>T-клеток через 2 года лечения < 350 в мкл (n = 21);
- 4) ВИЧ<sup>+</sup>/ВГС<sup>-</sup>, число CD4<sup>+</sup>T-клеток через 2 года лечения < 350 в мкл (n = 16).

План исследовательской работы был одобрен этическим комитетом ГКУЗ «ПКЦ СПИД и ИЗ». Каждый пациент дал письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Забор крови осуществляли в пробирки типа «Vacutainer», содержащие ЭДТА. У всех обследованных были определены: общее количество лейкоцитов и лимфоцитов крови, абсолютное и относительное количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>T-клеток. Численность субпопуляций Т-лимфоцитов устанавливали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur («Becton Dickinson», США) с использованием набора моноклональных антител Simultest™ (Becton Dickinson, США). Вирусную нагрузку ВИЧ в крови инфицированных контролировали на анализаторе Versant 440 (Siemens) с использованием набора «Versant HIV-1 RNA 3.0 assay b». Число копий ВГС в крови определяли на термоциклере iCycler IQ5 (BioRad) с помощью набора «ОТ Гепатоген С». Функциональное состояние печени оценивали по биохимическим показателям крови: альбумин, АЛТ, АСТ, гамма-ГТ. Мононуклеары периферической крови вы-

деляли путем центрифугирования в градиенте плотности диаколла ( $p = 1,077$ ; «Диа-М») общепринятым методом.

#### Определение апоптоза

Исследование спонтанного апоптоза лимфоцитов проводили с использованием набора «Annexin V-FITC/7-AAD» (IM3614, «Beckman Coulter Company», США) согласно инструкции производителя. Субпопуляционное разделение апоптотических клеток выполняли с помощью коммерческих антител к поверхностным антигенам CD4 и CD8, конъюгированных с фикоэритрином («Beckman Coulter Company», США). Проточно-цитофлуориметрический анализ проводился на приборе FACSCalibur («Becton Dickinson», США). При исследовании каждого образца накапливали до 10000 событий. Из общего количества клеток в гейте лимфоцитов считали 7-AAD<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> (CD8<sup>-</sup>) клетки. Оставшиеся события принимали за 100%. Уровень спонтанного апоптоза рассчитывали путем вы-

читания из полученного пула клеток AnnexinV<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>(CD8<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов.

#### Магнитная сепарация клеток

Мононуклеары периферической крови разделяли на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> субпопуляции при помощи магнитных бус (Miltenyi Biotec, Германия). В клеточную суспензию вносили магнитные бусы, конъюгированные с анти-CD4 антителами, в концентрациях, рекомендованных производителем. После инкубации клетки отмывали и наносили на колонку, помещенную в магнитное поле. Фракцию клеток, прошедшую через колонку, собирали для последующего выделения CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов. Связавшиеся с магнитной колонкой CD4<sup>+</sup>Т-клетки смывали в отдельную пробирку и освобождали от магнитных бус. Для выделения CD8<sup>+</sup> фракции Т-клеток процедуру повторяли с использованием магнитных бус, конъюгированных с анти-CD8 антителами.

#### Получение клеточных лизатов для ПЦР

Выделенные клетки были лизированы в растворе протеиназы К (по 10 мкл фермента концен-

**ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ, РАЗДЕЛЕННЫХ НА ГРУППЫ НА ОСНОВЕ НАЛИЧИЯ КОИНФЕКЦИИ ВГС И ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ОТВЕТА НА АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ**

Показатели	ВИЧ-инфицированные пациенты				Здоровые люди
	Отвечающие на АРТ		Не отвечающие на АРТ		
	ВГС+ (n = 21)	ВГС- (n = 20)	ВГС+ (n = 21)	ВГС- (n = 16)	(n = 21)
Пол					
мужской	9 (42,9%)	4 (20,0%)	16 (76,2%)	4 (25,0%)	8 (38,1%)
женский	12 (57,1%)	16 (80,0%)	5 (23,8%)	12 (75,0%)	13 (61,9%)
Средний возраст (лет)	35,4±1,6	36,2±1,9	34,5±0,8	35,8±1,4	32,2±1,9
Путь передачи					
наркотический	16 (76,2%)	1 (5,0%)	20 (95,2%)	0 (0,0%)	–
половой	5 (23,8%)	19 (95,0%)	1 (4,8%)	16 (100%)	–
Уровень CD4+Т-лимфо- цитов перед АРТ (кл/мм³)	141,0±7,7	158,2±9,5	114,3±9,5	115,1±14,9	–
Вирусная нагрузка ВИЧ перед АРТ (копии/мл)	83700 (33000-630000)	37650 (500-171000)	48000 (500-403000)	137300 (37480-623000)	–
Длительность АРТ (мес.)	47,3±3,3	48,3±3,5	44,0±3,2	44,0±4,0	–
Вирусная нагрузка при обследовании:					
ВИЧ (копии/мл)	< 50*	< 50	< 50	< 50	< 50**
ВГС (копии/мл)	49000 (16600-144750)	< 750*	291700 (128870-660270)	< 750	< 750**

**Примечание.** \* – предел чувствительности тест-систем; \*\* – антитела к вирусам не обнаружены.  
Сокращения: АРТ – антиретровирусная терапия; ВГС – вирусный гепатит С.

трацией 100 мкг/мл на каждые 100000 клеток). Стоковый раствор протеиназы К был разведен до нужной концентрации в 10 mM Tris-HCl буфере, pH = 8,0 (Sigma, США).

#### ПЦР-РВ

Для определения количества  $\alpha$ TREC был использован метод количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Референсом послужила геномная последовательность человеческого альбумина (*Alb*). В пробирки, содержащие реакционную смесь (Platinum Buffer 2,5 мкл; 50 mM Mg 1,75 мкл; Platinum Taq 0,125 мкл [Invitrogen, США]; 10 mM dNTP 0,5 мкл [Fermentas, США]), вносили по 1 мкл прямого и обратного праймеров (12,5 пкмоль/мкл) к последовательностям  $\alpha$ TREC (TCR2) или *Alb* (Синтол, Россия), по 1 мкл (5 пкмоль/мкл) флуоресцентных зондов, соответственно, «TCR2 зонд» или «*Alb* зонд» (Синтол, Россия) и по 5 мкл клеточного лизата, что соответствовало 50000 клеток. Общий объем реакционной смеси – 25 мкл – достигался добавлением деионизированной воды. Каждая проба была представлена в дубле.

Стандарты для абсолютного количественного определения последовательностей  $\alpha$ TREC и *Alb* были любезно предоставлены лабораторией профессора Д. Дуэка (Национальный институт здоровья, США).

Реакцию осуществляли на термоциклере CFX-96 (Bio-Rad, США) по программе: 95 °C – 5 минут для активации Platinum Taq-полимеразы (1 цикл); 95 °C – 30 сек., 60 °C – 60 сек. (45 циклов). Измерение уровня флуоресценции проводили при температуре 60 °C в каждом цикле амплификации.

Прямой праймер TCR2: 5'-CACATCCC-TTTCACCATGCT; обратный праймер TCR2: 3' - G C C A G C T G C A G G G T T T A G G ; флуоресцентный зонд TCR2: FAM-ACACCT-STGGTTTGTGTAAGGTGCCCACT-BHQ1; прямой праймер Alb: TGCATGA-GAAAACGCCAGTAA; обратный праймер Alb: ATGGTCGCCTGTTACCAA; флуоресцентный зонд Alb: FAM-TGACAGAGTCACCAAATGCT-GCACAGAA-BHQ1

#### Статистический анализ

Статистическая обработка результатов выполнялась методами параметрического и непараметрического анализов. При наличии нормального распределения в выборке определяли среднюю арифметическую ( $M$ ) и ее ошибку ( $m$ ). Сравнение средних величин проводили по  $t$ -критерию Стьюдента. При отсутствии нормального распределения расчеты проводили с использованием метода Манна–Уитни. Для оценки влияния

факторов применяли дисперсионный анализ. Вычисления проводили с использованием пакета компьютерных программ «STATISTICA 6».

## Результаты

Уровень лейкоцитов крови у всех ВИЧ-инфицированных пациентов был снижен по сравнению с соответствующим показателем здоровых людей (табл. 2). У ВГС<sup>+</sup> и ВГС<sup>-</sup> иммунологических неответчиков абсолютные количества лейкоцитов и лимфоцитов оказались наименьшими и статистически отличались от соответствующих показателей групп больных, ответивших на терапию ростом числа клеток, и здоровых добровольцев. Проведенный факторный анализ не выявил влияния ВГС-коинфекции на наличие лейкопении или лимфопении ( $P_F > 0,05$ ).

Исследование состава основных субпопуляций Т-клеток показало, что относительное и абсолютное содержание CD4<sup>+</sup> лимфоцитов понижено у всех ВИЧ-инфицированных пациентов относительно аналогичных показателей здоровых людей. Наиболее глубокий дефицит этих клеток наблюдался в группах иммунологических неответчиков. В то же время относительная численность CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов во всех группах больных, инфицированных ВИЧ, была достоверно выше, чем у здоровых добровольцев. По абсолютному содержанию CD8<sup>+</sup>Т-клеток крови иммунологические неответчики не имели статистически достоверных отличий от показателей соответствующих групп ВИЧ-инфицированных пациентов, давших адекватный иммунологический ответ на АРТ. Вместе с тем именно на субпопуляциях Т-лимфоцитов проявилось влияние ВГС-коинфекции. Ее наличие у больных приводило к более существенному снижению относительного содержания и общей численности CD4<sup>+</sup>Т-клеток по сравнению с ВИЧ-инфицированными пациентами без коинфекции. Присутствие в организме вируса гепатита С вызывало также достоверное ( $P_F < 0,05$ ) увеличение доли CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, не оказывая влияния на абсолютную численность этих клеток.

Предположив, что низкий уровень CD4<sup>+</sup> лимфоцитов может быть связан с усиленным апоптозом этих клеток, мы определили количество фосфатидилсерин-позитивных лимфоцитов в периферической крови пациентов пяти групп (табл. 3). Наименьшая доля умирающих CD4<sup>+</sup>Т-клеток была зафиксирована у здоровых добровольцев. У ВИЧ-инфицированных пациентов, ответивших на АРТ подъемом численности CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, показатель апоптоза был на 30-40% выше. Наибольшего уровня доля умирающих клеток достигала в группах ВИЧ-

**ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ЛЕЙКОЦИТОВ, ЛИМФОЦИТОВ И ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-КЛЕТОК КРОВИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ, КОИНФИЦИРОВАННЫХ ВГС, ОТВЕЧАЮЩИХ И НЕ ОТВЕЧАЮЩИХ РОСТОМ ЧИСЛА CD4<sup>+</sup>Т-КЛЕТОК НА АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ**

Показатели	Здоровые люди (контроль)	ВИЧ-инфицированные пациенты			
		Отвечающие на АРТ		Не отвечающие на АРТ	
		ВГС <sup>+</sup>	ВГС <sup>-</sup>	ВГС <sup>+</sup>	ВГС <sup>-</sup>
		1	2	3	4
Лейкоциты ( $\times 10^6/\text{л}$ )	7514 $\pm$ 543	6645 $\pm$ 705 $P_{K-1} > 0,05$ $P_{1-2} > 0,05$	6613 $\pm$ 394 $P_{K-2} > 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$	5788 $\pm$ 338 $P_{K-3} = 0,01$ $P_{1-3} > 0,05$	5284 $\pm$ 441 $P_{K-4} < 0,01$ $P_{3-4} > 0,05$
Лимфоциты ( $\times 10^6/\text{л}$ )	2325 $\pm$ 173	1978 $\pm$ 125 $P_{K-1} > 0,05$ $P_{1-2} > 0,05$	2187 $\pm$ 174 $P_{K-2} > 0,05$ $P_{2-4} < 0,002$	1493 $\pm$ 165 $P_{K-3} < 0,002$ $P_{1-3} < 0,05$	1398 $\pm$ 148 $P_{K-4} < 0,001$ $P_{3-4} > 0,05$
CD4 <sup>+</sup> Т-клетки, %	37,8 $\pm$ 1,5	26,6 $\pm$ 1,6 $P_{K-1} < 0,001$ $P_{1-2} > 0,05$	29,0 $\pm$ 1,8 $P_{K-2} < 0,001$ $P_{2-4} < 0,05$	17,2 $\pm$ 1,3 $P_{K-3} < 0,001$ $P_{1-3} < 0,001$	21,8 $\pm$ 2,5 $P_{K-4} < 0,001$ $P_{3-4} > 0,05$
CD4 <sup>+</sup> Т-клетки ( $\times 10^6/\text{л}$ )	893 $\pm$ 85	515 $\pm$ 57 $P_{K-1} < 0,001$ $P_{1-2} > 0,05$	657 $\pm$ 73 $P_{K-2} < 0,05$ $P_{2-4} < 0,001$	243 $\pm$ 20 $P_{K-3} < 0,001$ $P_{1-3} < 0,001$	263 $\pm$ 28 $P_{K-4} < 0,001$ $P_{3-4} > 0,05$
CD8 <sup>+</sup> Т-клетки, %	22,3 $\pm$ 1,3	35,5 $\pm$ 1,7 $P_{K-1} < 0,001$ $P_{1-2} > 0,05$	33,3 $\pm$ 2,0 $P_{K-2} < 0,001$ $P_{2-4} > 0,05$	40,8 $\pm$ 1,7 $P_{K-3} < 0,001$ $P_{1-3} < 0,05$	36,1 $\pm$ 2,6 $P_{K-4} < 0,001$ $P_{3-4} > 0,05$
CD8 <sup>+</sup> Т-клетки ( $\times 10^6/\text{л}$ )	518 $\pm$ 55	703 $\pm$ 59 $P_{K-1} < 0,05$ $P_{1-2} > 0,05$	768 $\pm$ 85 $P_{K-2} < 0,02$ $P_{2-4} > 0,05$	652 $\pm$ 83 $P_{K-3} > 0,05$ $P_{1-3} > 0,05$	509 $\pm$ 103 $P_{K-4} > 0,05$ $P_{3-4} > 0,05$

**Примечание.** Сокращения: АРТ – антиретровирусная терапия; ВГС – вирусный гепатит С.

инфицированных иммунологических неответчиков (на 60-80% выше соответствующего показателя здоровых людей). Исследование роли ВГС-коинфекции в апоптозе лимфоцитов показало, что она не влияет на программную гибель CD4<sup>+</sup>Т-клеток ( $P_F > 0,05$ ), но повышает темпы умирания CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов ( $P_F < 0,05$ ). Оценивая роль коинфекции ВГС, можно заключить, что отмеченный выше эффект снижения численности CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов у коинфицированных пациентов не связан с увеличением темпов гибели этой субпопуляции Т-клеток.

Так как снижение числа CD4<sup>+</sup>Т-клеток при ВИЧ/ВГС-коинфекции оказалось не связанным с их гибелью на периферии, была предпринята попытка оценить продуктивную функцию вилочковой железы. Наибольшая численность  $\alpha$ TREC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов (рис. 1) наблюдалась в группе неинфицированных добровольцев (медиана составила 44,3  $\times 10^6/\text{л}$ ). В группах с иммунологическим ответом на АРТ (ВИЧ<sup>+</sup>ВГС<sup>+</sup> и ВИЧ<sup>+</sup>ВГС<sup>-</sup>) было отмечено снижение числа CD4<sup>+</sup>Т-клеток, содержащих  $\alpha$ TREC, по сравнению с аналогичным показателем здоровых лю-

дей (медианы: 21,3  $\times 10^6/\text{л}$  [ $P < 0,01$ ] и 34,4  $\times 10^6/\text{л}$  [ $P > 0,05$ ] соответственно). Между собой эти две группы также имели статистически достоверное различие ( $P < 0,05$ ): коинфекция вирусным гепатитом С достоверно снижала продукцию CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов вилочковой железой. Группы с иммунологическим неответом (ВИЧ<sup>+</sup>ВГС<sup>+</sup> и ВИЧ<sup>+</sup>ВГС<sup>-</sup>) незначительно отличались между собой по численности CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов крови, несущих  $\alpha$ TREC (медианы: 1,9  $\times 10^6/\text{л}$  и 2,5  $\times 10^6/\text{л}$  соответственно;  $P > 0,05$ ). Однако содержание  $\alpha$ TREC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Т-клеток у них было статистически значимо снижено относительно соответствующего показателя в группах ВИЧ-инфицированных пациентов (как ВГС-позитивных, так и ВГС-негативных) с адекватным иммунологическим ответом на АРТ ( $P < 0,001$ ). Проведенный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что оба фактора – ВГС-коинфекция и иммунологический неответ – оказывали влияние на численность  $\alpha$ TREC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в крови ( $P_F < 0,05$  и  $P_F < 0,001$  соответственно). При этом следует отметить, что достоверный эффект ВГС-коинфекции наблюдался в снижении выхода

**ТАБЛИЦА 3. АПОПТОЗ Т-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ, КОИНФИЦИРОВАННЫХ ВГС, ОТВЕЧАЮЩИХ И НЕ ОТВЕЧАЮЩИХ РОСТОМ ЧИСЛА CD4<sup>+</sup>-КЛЕТОК НА АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ**

Т-лимфоциты	Здоровые люди (контроль)	ВИЧ-инфицированные пациенты			
		Отвечающие на АРТ		Не отвечающие на АРТ	
		ВГС <sup>+</sup>	ВГС <sup>-</sup>	ВГС <sup>+</sup>	ВГС <sup>-</sup>
	К	1	2	3	4
CD4 <sup>+</sup> PS <sup>+</sup> , %	10,3±0,9	14,7±1,4 P <sub>К-1</sub> < 0,02 P <sub>1-2</sub> > 0,05	13,2±1,3 P <sub>К-2</sub> > 0,05 P <sub>2-4</sub> < 0,02	16,7±1,8 P <sub>К-3</sub> < 0,01 P <sub>1-3</sub> > 0,05	18,7±1,7 P <sub>К-4</sub> < 0,001 P <sub>3-4</sub> > 0,05
CD4 <sup>+</sup> PS <sup>+</sup> (10 <sup>6</sup> /л)	108±16	88±11 P <sub>К-1</sub> > 0,05 P <sub>1-2</sub> > 0,05	92±9 P <sub>К-2</sub> > 0,05 P <sub>2-4</sub> < 0,02	45±8 P <sub>К-3</sub> < 0,002 P <sub>1-3</sub> < 0,01	63±8 P <sub>К-4</sub> < 0,02 P <sub>3-4</sub> > 0,05
CD8 <sup>+</sup> PS <sup>+</sup> , %	24,8±2,1	28,9±2,7 P <sub>К-1</sub> > 0,05 P <sub>1-2</sub> > 0,05	26,9±2,7 P <sub>К-2</sub> > 0,05 P <sub>2-4</sub> > 0,05	24,9±1,9 P <sub>К-3</sub> > 0,05 P <sub>1-3</sub> > 0,05	31,2±2,5 P <sub>К-4</sub> > 0,05 P <sub>3-4</sub> > 0,05
CD8 <sup>+</sup> PS <sup>+</sup> (10 <sup>6</sup> /л)	168±32	251±36 P <sub>К-1</sub> > 0,05 P <sub>1-2</sub> > 0,05	247±38 P <sub>К-2</sub> > 0,05 P <sub>2-4</sub> > 0,05	179±27 P <sub>К-3</sub> > 0,05 P <sub>1-3</sub> > 0,05	185±27 P <sub>К-4</sub> > 0,05 P <sub>3-4</sub> > 0,05

**Примечание.** Сокращения: АРТ – антиретровирусная терапия; ВГС – вирус гепатита С; PS – фосфатидилсерин.

наивных CD4<sup>+</sup> клеток в группе пациентов, ответивших на терапию ростом числа лимфоцитов.

Количество αTREC-позитивных CD8<sup>+</sup>-клеток (рис. 2) также оказалось сниженным у ВИЧ-инфицированных пациентов с эффективным иммунологическим ответом (ВИЧ<sup>+</sup>ВГС<sup>+</sup> и ВИЧ<sup>+</sup>ВГС<sup>-</sup>) относительно аналогичного показателя здоровых добровольцев (медианы: 19,4 × 10<sup>6</sup>/л [P < 0,05]; 24,8 × 10<sup>6</sup>/л [P > 0,05]; 42,8 × 10<sup>6</sup>/л соответственно). У пациентов с иммунологическим неответом (ВИЧ<sup>+</sup>ВГС<sup>+</sup> и ВИЧ<sup>+</sup>ВГС<sup>-</sup>) количество αTREC<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов было значительно ниже, чем в соответствующих группах ВИЧ-инфицированных пациентов с адекватным иммунологическим ответом на АРТ (медианы: 2,0 × 10<sup>6</sup>/л [P < 0,001]; 1,3 × 10<sup>6</sup>/л [P < 0,001] соответственно). Статистически достоверных различий между группами иммунологических неответчиков выявлено не было (P > 0,05). Двухфакторный дисперсионный анализ выявил высокодостоверное влияние иммунологически неэффективной АРТ на численность αTREC<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-клеток. При этом достоверный эффект ВГС-коинфекции отсутствовал.

Таким образом, мы показали, что коинфекция вирусным гепатитом С у пациентов, способных давать увеличение числа периферических CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов крови во время лечения, влияет на продукцию наивных CD4<sup>+</sup>, но не CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов вилочковой железой.

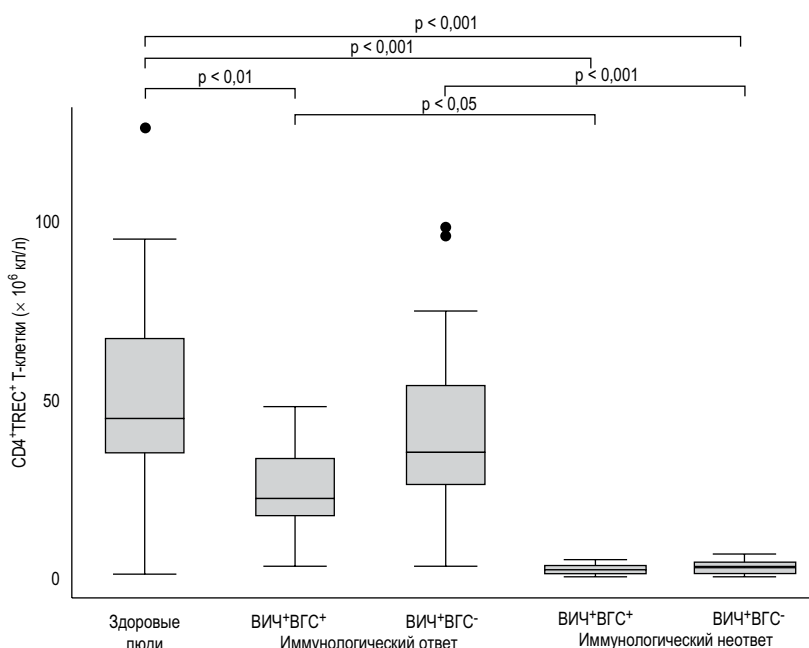
## Обсуждение

В настоящей работе была исследована роль коинфекции вирусным гепатитом С в нарушении восстановления иммунитета у ВИЧ-

инфицированных пациентов, получающих АРТ. Установлено, что лейкопения и лимфопения, в разной степени присутствующие у всех больных, объясняются дефицитом CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов в периферической крови. Самые низкие значения этого показателя отмечены у иммунологических неответчиков, что согласуется с данными, представленными другими авторами [10, 11]. Наличие ВГС-коинфекции приводит к более существенному снижению числа CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов и увеличению доли CD8<sup>+</sup>-клеток, при сравнении с показателями ВИЧ-моноинфицированных пациентов.

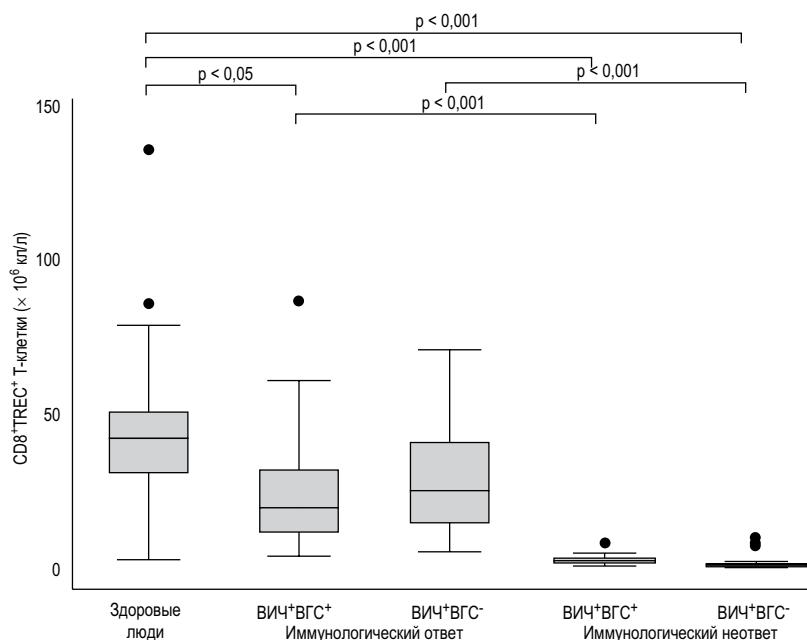
Дефицит CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов может быть обусловлен увеличенными темпами программной клеточной гибели клеток на периферии [6, 12]. Однако в нашем исследовании не было обнаружено существенного увеличения количества CD4<sup>+</sup>-клеток в стадии апоптоза у ВГС-коинфицированных пациентов. Это свидетельствует о том, что причина слабого восстановления иммунитета не связана с ростом гибели CD4<sup>+</sup>-клеток на периферии. Вместе с тем у ВГС-коинфицированных пациентов было обнаружено увеличение доли фосфатидилсерин-позитивных CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов. Повышенное количество таких клеток у ВИЧ-инфицированных пациентов, принимающих АРТ, уже отмечалось ранее [13, 14]. Было показано, что высокий уровень апоптоза CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов был связан с дефицитом регуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-клеток [13].

Один из современных способов оценки функциональной активности вилочковой железы – количественный анализ концентрации αTREC



**Рисунок 1. Количество CD4<sup>+</sup>αTREC<sup>+</sup>Т-клеток ( $\times 10^6$ ) у ВИЧ-инфицированных пациентов, коинфицированных ВГС, отвечающих и не отвечающих ростом числа CD4<sup>+</sup>Т-клеток на антиретровирусную терапию**

**Примечание.** На диаграмме размаха для каждой группы показаны: медиана, квартильный размах (25%, 75% перцентили), размах (10%, 90%) и единичные выбросы.



**Рисунок 2. Количество CD8<sup>+</sup>αTREC<sup>+</sup>Т-клеток ( $\times 10^6$ ) у ВИЧ-инфицированных пациентов, коинфицированных ВГС, отвечающих и не отвечающих ростом числа CD4<sup>+</sup>Т-клеток на антиретровирусную терапию**

**Примечание.** На диаграмме размаха для каждой группы показаны: медиана, квартильный размах (25%, 75% перцентили), размах (10%, 90%) и единичные выбросы.



(T cell receptor excision circles — вырезанные кольца  $\alpha$ -цепи Т-клеточного рецептора) — молекулярного маркера недавних эмигрантов из тимуса [15]. Исследователи уже отмечали снижение количества  $\alpha$ TREC-позитивных CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов у больных со слабым иммунологическим ответом на АРТ [16, 17]. Наши данные также подтверждают ярко выраженное уменьшение продукции CD4<sup>+</sup>Т-клеток вилочковой железой (рис. 1) в этих группах пациентов. В свою очередь, у больных с адекватным иммунологическим ответом на терапию более высокие значения числа  $\alpha$ TREC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Т-клеток свидетельствуют об активной продукции CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов вилочковой железой. Мы обнаружили, что у пациентов, коинфицированных вирусом гепатита С, наблюдается более слабый выход CD4<sup>+</sup>Т-клеток, чем в группе больных с ВИЧ-моноинфекцией. Ранее было показано, что ВГС способен проникать в лимфоциты через ко-рецептор CD81 [18], присутствующий, в том числе, и на формирующихся тимоцитах [19]. После внедрения в клетку ВГС способен подавлять пролиферацию и усиливать Fas-зависимый апоптоз [20]. Вероятно, описанные эффекты могут объяснить отмеченное нами негативное влияние ВИЧ/ВГС-коинфекции на выход CD4<sup>+</sup> недавних эмигрантов из тимуса.

При анализе количества TREC<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-клеток были обнаружены схожие закономерности (рис. 2). Низкое число этих клеток в группах с недостаточным иммунологическим ответом на терапию свидетельствует об угнетенной про-

дуктивной активности вилочковой железы у данной категории больных. Продукция наивных CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов вилочковой железой была значительно более эффективной в группах с адекватным иммунологическим ответом на АРТ.

Таким образом, нами установлено, что для ВГС-коинфекции характерны более низкое, чем при ВИЧ-моноинфекции содержание CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, не связанное с усиленным апоптозом этих клеток, и значительное уменьшение продукции CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов вилочковой железой. Полученные данные свидетельствуют о том, что ВГС-коинфекция, по-видимому, может вносить дополнительный вклад в истощение иммунитета у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Данное исследование было поддержано Национальным институтом аллергических и инфекционных заболеваний (NIAID) Национального института здоровья США (проект номер P01AI076174, соглашение Национального научного фонда № OISE-9531011). Оно также было поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 12-04-91441-НИЗ\_а) и Уральским отделением Российской академии наук (проект № 12-С-4-1033). Содержание статьи находится исключительно под ответственностью авторов и не обязательно отражает официальное мнение Национального института здоровья, NIAID, Национального научного фонда или CRDF Global.

## Список литературы

1. ВИЧ-инфекция. Информационный бюллетень № 36. — М., Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом, 2012.
2. Шмагель Н.Г., Шмагель К.В., Черешнев В.А. Клинические аспекты неэффективности высокоактивной антиретровирусной терапии // Инфекционные болезни. — 2011. — Т. 9, № 1. — С. 5-10.

Ссылки 3-20 см. в References (стр. 551-552). See References for numbers 3-20 at pp. 551-552.

## References

1. VICH-infektsiya. Informatsionnyy byulleten' № 36 [HIV-infection. Newsletter number 36]. Moscow, Federal Research and Methodological Center for the Prevention and Control of AIDS, 2012. 53 p.
2. Shmagel N.G., Shmagel K.V., Chereshnev V.A. Klinicheskie aspekty neeffektivnosti vysokoaktivnoy antiretrovirusnoy terapii [Clinical aspects of inefficiency of highly active antiretroviral therapy]. *Infektsionnye bolezni — Infectious Diseases*, 2011, vol. 9, no. 1, pp. 5-10.
3. Flynn J.K., Dore G.J., Matthews G., Hellard M., Yeung B., Rawlinson W.D., White P.A., Kaldor J.M., Lloyd A.R., French R.A., ATAC Study Group. Impaired hepatitis C virus (HCV)-specific interferon-responses in individuals with HIV who acquire HCV infection: correlation with CD4(+) T-cell counts. *J. Infect. Dis.*, 2012, vol. 206, pp. 1568-1576.
4. Gazzola L., Tincati C., Bellistr G.M., Monforte Ad., Marchetti G. The absence of CD4<sup>+</sup> T cell count recovery despite receipt of virologically suppressive highly active antiretroviral therapy: clinical risk, immunological gaps, and therapeutic options. *AIDS*, 2009, vol. 48, pp. 328-337.
5. Autran B. Effects of antiretroviral therapy on immune reconstitution. *Antivir. Ther.*, 1999, vol. 4, pp. 3-6.

6. 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, pp. 129-134.
7. Pakker N.G., Notermans D.W., de Boer R.J., Roos M.T., de Wolf F., Hill A., Leonard J.M., Danner S.A., Miedema F., Schellekens P.T. Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat. Med.*, 1998, vol. 4, pp. 208-214.
8. Haynes B.F., Markert M.L., Sempowski G.D., Patel D.D., Hale L.P. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu Rev. Immunol.*, 2000, vol. 18, pp. 529-560.
9. McCune J.M. Thymic function in HIV-1 disease. *Semin. Immunol.*, 1997, vol. 9, pp. 397-404.
10. Robbins G.K., Spritzler J.G., Chan E.S., Asmuth D.M., Gandhi R.T., Rodriguez B.A., Skowron G., Skolnik P.R., Shafer R.W., Pollard R.B., AIDS Clinical Trials Group 384 Team. Incomplete reconstitution of T cell subsets on combination antiretroviral therapy in the AIDS Clinical Trials Group protocol 384. *Clin. Infect. Dis.*, 2009, vol. 48, pp. 350-361.
11. Gonzalez V.D., Falconer K., Blom K.G., Reichard O., Mørn B., Laursen A.L., Weis N., Alaeus A., Sandberg J.K. High levels of chronic immune activation in the T-cell compartments of patients coinfectd with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 and on highly active antiretroviral therapy are reverted by alpha interferon and ribavirin treatment. *J. Virol.*, 2009, vol. 21, pp. 11407-11141.
12. Gougeon M.L., Montagnier L. Apoptosis in AIDS. *Science.*, 1993, vol. 260, pp. 1269-1270.
13. Jiao Y., Fu J., Xing S., Fu B., Zhang Z., Shi M., Wang X., Zhang J., Jin L., Kang F., Wu H., Wang F.S. The decrease of regulatory T cells correlates with excessive activation and apoptosis of CD8+ T cells in HIV-1-infected typical progressors, but not in long-term non-progressors. *Immunology*, 2009, vol. 128, pp. e366-375.
14. Lewis D.E., Gross K.L., Diez M.M., Martinez M.L., Lukefahr H.N., Kozinetz C.A., Arduino R.C. CD8 apoptosis may be a predictor of T cell number normalization after immune reconstitution in HIV. *Journal of Translational Medicine*, 2007, vol. 5, pp. 9-21.
15. Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H., Gage E.A., Massey J.M., Haynes B.F., Polis M.A., Haase A.T., Feinberg M.B., Sullivan J.L., Jamieson B.D., Zack J.A., Picker L.J., Koup R.A. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, 1998, vol. 396, pp. 690-695.
16. Teixeira L., Valdez H., McCune J.M., Koup R.A., Badley A.D., Hellerstein M.K., Napolitano L.A., Douek D.C., Mbisa G., Deeks S., Harris J.M., Barbour J.D., Gross B.H., Francis I.R., Halvorsen R., Asaad R., Lederman M.M. Poor CD4 T cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function. *AIDS*, 2001, vol. 15, pp. 1749-1756.
17. Douek D.C., Betts M.R., Hill B.J., Little S.J., Lempicki R., Metcalf J.A., Casazza J., Yoder C., Adelsberger J.W., Stevens R.A., Baseler M.W., Keiser P., Richman D.D., Davey R.T., Koup R.A. Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J. Immunol.*, 2001, vol. 167, pp. 6663-6668.
18. Zhang J., Randall G., Higginbottom A., Monk P., Rice C.M., McKeating J.A. CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, pp. 1448-1455.
19. Todd S.C., Lipps S.G., Crisa L., Salomon D.R., Tsoukas C.D. CD81 expressed on human thymocytes mediates integrin activation and interleukin 2-dependent proliferation. *J. Exp. Med.*, 1996, vol. 184, pp. 2055-2060.
20. Kondo Y., Machida K., Liu H.M., Ueno Y., Kobayashi K., Wakita T., Shimosegawa T., Lai M.M. Hepatitis C virus infection of T cells inhibits proliferation and enhances fas-mediated apoptosis by down-regulating the expression of CD44 splicing variant 6. *J. Infect. Dis.*, 2009, vol. 199, pp. 726-736.