

УДК 616.98:578.828-085.281.8-036.8-07:616.155.32

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АКТИВИРОВАННЫХ CD4⁺ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НЕОТВЕТЧИКОВ НА ВЫСОКОАКТИВНУЮ АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ

© 2021 г. В. В. Власова^{1,*}, Е. В. Сайдакова¹, Л. Б. Королевская¹,
Н. Г. Шмагель², академик РАН В. А. Черешнев^{1,3}, К. В. Шмагель¹

Поступило 09.07.2021 г.

После доработки 31.08.2021 г.

Принято к публикации 31.08.2021 г.

Термином иммунологические неответчики (ИН) обозначают группу ВИЧ-инфицированных пациентов, у которых снижение вирусной нагрузки под действием высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) не приводит к эффективной регенерации пула CD4⁺ Т-клеток. Известно, что слабое восстановление численности CD4⁺ Т-лимфоцитов в организме ИН обусловлено непродуктивным делением клеток памяти. Исходя из того, что способность лимфоцитов к пролиферации во многом определяется активностью метаболических процессов, целью настоящей работы была оценка показателей митохондриального дыхания и гликолиза в CD4⁺ Т-клетках памяти у ИН. Обследованы две группы ВИЧ-инфицированных больных, получающих ВААРТ: иммунологические неответчики и пациенты с эффективным восстановлением иммунитета (иммунологические ответчики – ИО). В контрольную группу (К) вошли здоровые добровольцы. Установлено, что в двух группах ВИЧ-позитивных пациентов интенсивность гликолиза в CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти снижена по сравнению с таковой в группе К. Активность митохондриального дыхания в CD4⁺ Т-клетках памяти ИО на базальном уровне была сопоставима с показателями К, но после стимуляции не достигала значений неинфицированных доноров. В группе ИН интенсивность митохондриального дыхания в CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти была наименьшей и статистически значимо отличалась от значений ИО и К как на базальном уровне, так и после стимуляции. Полученные данные демонстрируют, что у ИН низкая регенераторная способность активированных CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти может быть связана с метаболическими нарушениями в данных клетках.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, высокоактивная антиретровирусная терапия, CD4⁺ Т-лимфоциты, метаболизм, гликолиз, митохондрии

DOI: 10.31857/S2686738921060160

Высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ) вызывает выраженное снижение вирусной нагрузки у ВИЧ-инфицированных больных

[1], что, как правило, сопровождается увеличением численности CD4⁺ Т-лимфоцитов [2]. Однако у 10–30% пациентов подавление репликации ВИЧ не приводит к эффективной регенерации пула CD4⁺ Т-клеток [3]. Такие субъекты – “иммунологические неответчики” (ИН) – имеют высокий риск развития как ассоциированных, так и не ассоциированных со СПИД заболеваний, и повышенный уровень смертности [4].

Слабый прирост численности CD4⁺ Т-лимфоцитов у ИН, в значительной мере, обусловлен низкой продуктивностью пролиферации клеток памяти [5], которые являются основным источником регенерации CD4⁺ Т-лимфоцитов при лимфопении [6]. Известно, что способность клеток к делению в значительной степени зависит от активности их метаболических процессов, особенно гликолиза и митохондриального дыхания

¹ “Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук” – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

² Государственное казенное учреждение здравоохранения Пермского края “Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями”, Пермь, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

*e-mail: violetbaudelaire73@gmail.com

[7]. Так, аэробный гликолиз служит основным источником субстратов, участвующих в биосинтезе липидов, аминокислот и нуклеотидов – строительных блоков для дочерних лимфоцитов [8]. В свою очередь, митохондрии обеспечивают пролиферирующие клетки энергией, промежуточными продуктами синтеза белков и жирных кислот, а также сигнальными молекулами [9, 10]. Известно, что нарушение гликолиза или митохондриального дыхания в CD4⁺ Т-лимфоцитах приводит к остановке деления [11]. Ранее было показано, что в CD4⁺ Т-клетках ВИЧ-инфицированных пациентов, принимающих ВААРТ, снижена интенсивность окислительного фосфорилирования [12]. При этом активность метаболических процессов в CD4⁺ Т-клетках памяти у больных с неэффективным восстановлением иммунитета никем ранее не изучалась. Целью данной работы была оценка показателей митохондриального дыхания и гликолиза в CD4⁺ Т-клетках памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на высокоактивную антиретровирусную терапию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические группы. План работы был одобрен этическим комитетом Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (рег. № комитета IRB00008964). В исследование были включены ВИЧ-инфицированные пациенты, получающие ВААРТ более двух лет (вирусная нагрузка <50 копий/мл): 1) иммунологические неответчики (ИН; CD4⁺ Т-лимфоциты менее 350/мкл; $n = 4$); 2) иммунологические ответчики (ИО; CD4⁺ Т-клетки более 350/мкл; $n = 4$). В контрольную группу (К) вошли 4 неинфицированных ВИЧ добровольца.

Получение биоматериала. Забор крови осуществлялся натощак из локтевой вены в пробирки типа “Vacutainer”, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту. Численность CD4⁺ Т-лимфоцитов крови оценивали с использованием коммерческого набора BD Simultest™ IMK-Lymphocyte (“BD Biosciences”, США) на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (“Beckman Coulter”, США). Уровень вирусной нагрузки ВИЧ устанавливали наборами “Versant HIV-1 RNA 3.0 assay b” на анализаторе Versant 440 (“Siemens”, Германия).

Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности Диаколла (1.077 г/мл, “Диаэм”, Россия). Образцы помещали в жидкий азот в среде, содержащей 90% эмбриональной телячьей сыворотки (“Biowest”, Франция) и 10% диметилсульфоксида (“Appli-Chem”, Германия). После разморозки клеток CD4⁺ Т-лимфоциты памяти выделяли методом

магнитной сепарации с использованием коммерческого набора Memory CD4⁺ T Cell Isolation Kit (“Miltenyi Biotec”, Германия) согласно инструкции производителя.

Анализ метаболических процессов. Изолированные CD4⁺ Т-клетки памяти ресуспендировали в среде XF RPMI Medium (“Agilent Technologies”, США), содержащей 10 мМ глюкозы (“Sigma”, США), 2 мМ глутамин (“Диа-М”, Россия) и 1 мМ пирувата натрия (“Sigma”, США) и вносили по 3×10^5 клеток в лунки планшета (“Agilent Technologies”, США), предварительно обработанные поли-D-лизином (50 мкг/мл, “Sigma”, США). Планшет центрифугировали в течение 2 мин при 200 g для формирования монослоя клеток. Объем лунки доводили до 150 мкл средой, планшет инкубировали при +37°C в течение 60 мин. Активность митохондриального дыхания и гликолиза определяли с использованием анализатора Seahorse XFe96 (“Agilent Technologies”, США) по показателям скорости потребления кислорода (oxygen consumption rate (англ.) – OCR) и скорости ацидификации среды (extracellular acidification rate (англ.) – ECAR) соответственно. Измерения производили на базальном уровне и после 40 мин стимуляции фитогемагглютинином (ФГА, 15 мкг/мл, “Serva”, Германия). На финальном этапе к образцам вносили ротенон и антимицин А (0.5 мкМ; “Agilent Technologies”, США), ингибирующие комплексы I и III дыхательной цепи митохондрий, соответственно, что позволило исключить из анализа немитохондриальное потребление кислорода.

Статистический анализ данных. Данные представлены в виде медиан, интерквартильных размахов (25–75 перцентиль) и 10–90%-ных интервалов. Достоверность различий между группами устанавливали на основе U-критерия Манна–Уитни. Проведение статистических расчетов и построение графиков осуществляли с использованием программного обеспечения “Statistica 6”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все исследуемые группы были сопоставимы по возрасту и полу (табл. 1). Группы ВИЧ-инфицированных пациентов не отличались по длительности инфекции, продолжительности приема ВААРТ и вирусной нагрузке. Количество CD4⁺ Т-клеток в крови ИН было существенно снижено в сравнении с аналогичными показателями ИО и К ($p < 0.01$).

Базальная скорость потребления кислорода CD4⁺ Т-клетками памяти, полученными от ИН, была меньше, чем у ИО ($p < 0.05$) и К ($p < 0.001$; рис. 1a).

Кратковременная активация клеток ФГА приводила к увеличению показателя митохондриаль-

Таблица 1. Клинические характеристики ВИЧ-инфицированных и здоровых лиц

Характеристики	ИН, $n = 4$	ИО, $n = 4$	К, $n = 4$
Возраст (годы)	38.5* (33.3–44.5)	43.0 (37.0–52.0)	44.5 (28.0–58.8)
Женщины (%)	50	50	75
Длительность инфекции (годы)	5 (3–13)	6 (4–13)	–
Продолжительность ВААРТ (годы)	3.2 (2.3–12.9)	5.2 (3.1–6.2)	–
Вирусная нагрузка ВИЧ в крови (копии/мл)	<50**	<50	–
Численность CD4 ⁺ Т-клеток на момент исследования (мкл ⁻¹)	224 (193–272) $p_{\text{ИН-ИО}} < 0.01$ $p_{\text{ИН-К}} < 0.01$	814 (522–870)	847 (607–1112)

Примечание: * – указаны медианы и интерквартильные размахи. ИН – иммунологические неответчики; ИО – иммунологические ответчики; К – контроль; ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия. ** – предел чувствительности тест-системы. Статистические расчеты выполнены по методу Манна–Уитни.

ного дыхания во всех исследуемых группах ($p < 0.01$). Однако активированные CD4⁺ Т-клетки памяти ВИЧ-инфицированных пациентов демонстрировали сниженный, в сравнении со здоровыми людьми, показатель OCR ($p_{\text{ИН-К}} < 0.001$; $p_{\text{ИО-К}} < 0.01$; рис. 1б). Важно отметить, что наиболее низкая скорость потребления кислорода стимулированными CD4⁺ Т-лимфоцитами памяти была отмечена у ИН ($p_{\text{ИН-ИО}} < 0.05$).

Показатель, отражающий скорость ацидификации среды CD4⁺ Т-клетками памяти, у ИН был

ниже, чем у К ($p < 0.001$), однако превышал соответствующее значение, установленное у ИО ($p < 0.05$; рис. 2а).

Внесение ФГА вызывало увеличение интенсивности гликолиза в клетках, что сопровождалось ростом значений ЕСАР во всех исследуемых группах ($p < 0.01$). При этом в обеих группах ВИЧ-инфицированных пациентов интенсивность этого процесса так и не достигла уровня, характерного для лимфоцитов здоровых субъектов ($p < 0.001$; рис. 2б). Между показателями ИН и

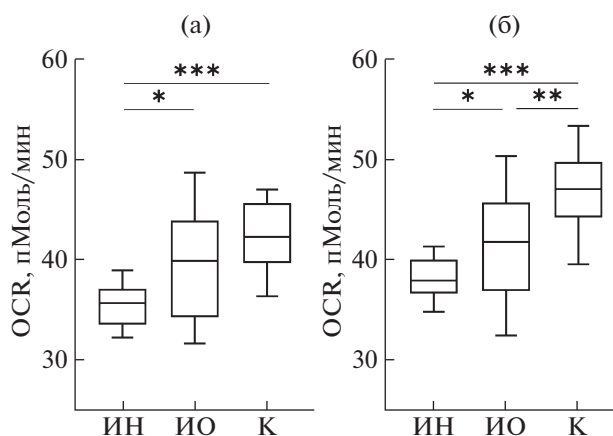


Рис. 1. Базальная скорость потребления кислорода CD4⁺ Т-клетками памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на высокоактивную антиретровирусную терапию.

По оси абсцисс: группы больных; по оси ординат: (а) скорость потребления кислорода (oxygen consumption rate – OCR) нестимулированными CD4⁺CD45RO⁺ Т-клетками; (б) скорость потребления кислорода CD4⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитами, стимулированными фитогемагглютинином. Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10–90%-ные интервалы (вертикальные отрезки). ИН – иммунологические неответчики; ИО – иммунологические ответчики; К – контроль. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ (U-тест Манна–Уитни).

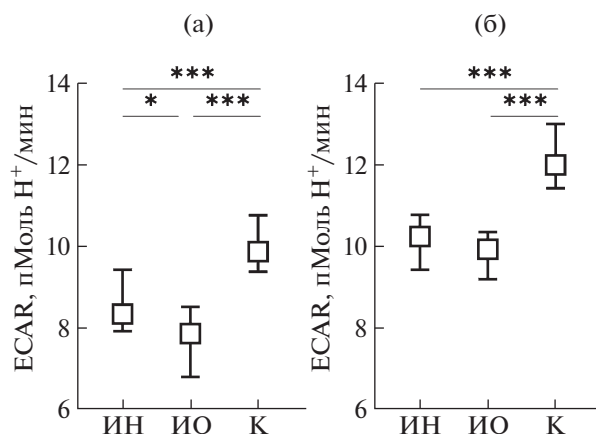


Рис. 2. Скорость ацидификации среды CD4⁺ Т-клетками памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на высокоактивную антиретровирусную терапию.

По оси абсцисс: группы больных; по оси ординат: (а) скорость ацидификации среды (extracellular acidification rate – ECAR) нестимулированными CD4⁺CD45RO⁺ Т-клетками; (б) скорость ацидификации среды CD4⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитами, стимулированными фитогемагглютинином. Представлены медианы (квадраты) и интерквартильные размахи (вертикальные отрезки). ИН – иммунологические неответчики; ИО – иммунологические ответчики; К – контроль. * – $p < 0.05$, *** – $p < 0.001$ (U-тест Манна–Уитни).

ИО статистически значимых отличий обнаружено не было ($p > 0.05$).

Таким образом, в настоящей работе нами впервые показано, что у ВИЧ-инфицированных пациентов, принимающих ВААРТ, снижена активность аэробного гликолиза в CD4⁺ Т-клетках памяти. Более того, впервые отмечено, что у иммунологических неответчиков на лечение по сравнению со здоровыми добровольцами и ВИЧ-позитивными пациентами, давшими стандартный ответ на терапию, уменьшение гликолитической активности в CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти сопровождается существенным снижением уровня митохондриального дыхания. Несмотря на то что под действием стимуляции интенсивность окислительного фосфорилирования в CD4⁺ Т-клетках памяти иммунологических неответчиков увеличивается, показатели этих пациентов не достигают значений, зафиксированных у ИО и здоровых субъектов. В совокупности полученные данные указывают на выраженное нарушение дыхательной функции митохондрий в CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти ВИЧ-инфицированных пациентов с неэффективным восстановлением иммунной системы в ответ на ВААРТ. Следует отметить, что представленные результаты функциональных тестов подтверждают данные, полученные нами ранее при исследовании CD4⁺ Т-клеток памяти *ex vivo* [5]. В частности, было установлено, что у иммунологических неответчиков на ВААРТ по сравнению с лицами, давшими стандартный ответ на лечение, в активированных/циклирующих CD4⁺ Т-лимфоцитах памяти подавлена экспрессия генов, вовлеченных в энергетический обмен, в том числе кодирующих комплексы дыхательной цепи и ферменты цикла трикарбоновых кислот. Более того, активированные/циклирующие CD4⁺ Т-клетки памяти ИИ имели сниженный трансмембранный потенциал митохондрий, что не зависело от массы органелл.

Как было отмечено ранее, способность Т-клеток к делению напрямую зависит от активности митохондриального дыхания. Действительно, недавнее исследование показало, что внесение ингибитора комплекса II электрон-транспортной цепи в культуру Т-лимфоцитов приводит к снижению мембранного потенциала митохондрий и пролиферативной активности данных клеток [13]. Аналогичный эффект на пролиферацию CD4⁺ Т-клеток оказывает ротенон – ингибитор комплекса I [11]. Кроме того, было показано, что в CD4⁺ Т-лимфоцитах нокаут гена *IRF4*, участвующего в регуляции метаболизма глюкозы и окислительного фосфорилирования, вызывает снижение активности дыхательной цепи и предотвращает деление [14]. Ранее нами также было установлено, что активированные/циклирующие CD4⁺ Т-клетки памяти ВИЧ-инфицированных

пациентов с неэффективным восстановлением иммунитета не способны к продуктивной пролиферации *in vitro* и обладают низкой жизнеспособностью [5]. Представленные данные впервые позволяют заключить, что у иммунологических неответчиков на ВААРТ низкая регенераторная способность CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти может быть связана с нарушением процессов гликолиза и митохондриального дыхания.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Пермского края в рамках научного проекта № 20-415-596002. В работе было использовано оборудование ЦКП “Исследования материалов и вещества” ПФИЦ УрО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Collier A.C., Coombs R.W., Schoenfeld D.A., et al. Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine. AIDS Clinical Trials Group // N Engl J Med. 1996. V. 334. № 16. P. 1011–1017.
2. Autran B., Carcelain G., Li T.S., et al. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4⁺ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease // Science. 1997. V. 277. № 5322. P. 112–116.
3. Kelley C.F., Kitchen C.M., Hunt P.W., et al. Incomplete peripheral CD4⁺ cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment // Clin Infect Dis. 2009. V. 48. № 6. P. 787–794.
4. Piketty C., Weiss L., Thomas F., et al. Long-term clinical outcome of human immunodeficiency virus-infected patients with discordant immunologic and virologic responses to a protease inhibitor-containing regimen // Journal of Infectious Diseases. 2001. V. 183. № 9. P. 1328–1335.
5. Younes S.A., Talla A., Ribeiro S.P. et al. Cycling CD4⁺ T cells in HIV-infected immune nonresponders have mitochondrial dysfunction // J Clin Invest. 2018. V. 128. № 11. P. 5083–5094.
6. Koehne G., Zeller W., Stocksclaeder M., et al. Phenotype of lymphocyte subsets after autologous peripheral blood stem cell transplantation // Bone Marrow Transplant. 1997. V. 19. № 2. P. 149–156.
7. Wahl D.R., Byersdorfer C.A., Ferrara J.L., et al. Distinct metabolic programs in activated T cells: opportunities for selective immunomodulation // Immunol Rev. 2012. V. 249. № 1. P. 104–115.
8. Donnelly R.P., Finlay D.K. Glucose, glycolysis and lymphocyte responses // Mol Immunol. 2015. V. 68. № 2. P. 513–519.
9. Diebold L., Chandel N.S. Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells // Free Radic Biol Med. 2016. V. 100. P. 86–93.
10. Ahn C.S., Metallo C.M. Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation // Cancer Metab. 2015. V. 3. № 1. P. 1.

11. Cao Y., Rathmell J.C., Macintyre A.N. Metabolic reprogramming towards aerobic glycolysis correlates with greater proliferative ability and resistance to metabolic inhibition in CD8 versus CD4 T cells // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 8. P. e104104.
12. Korencak M., Byrne M., Richter E., et al. Effect of HIV infection and antiretroviral therapy on immune cellular functions // *JCI Insight*. 2019. V. 4. № 12. P. 126675.
13. Nastasi C., Willerlev-Olsen A., Dalhoff K., et al. Inhibition of succinate dehydrogenase activity impairs human T cell activation and function // *Sci Rep*. 2021. V. 11. № 1. P. 1458.
14. Mahnke J., Schumacher V., Ahrens S., et al. Interferon Regulatory Factor 4 controls TH1 cell effector function and metabolism // *Sci Rep*. 2016. V. 6. P. 35521.

METABOLIC FEATURES OF ACTIVATED MEMORY CD4⁺ T-CELLS DERIVED FROM HIV-INFECTED IMMUNOLOGICAL NON-RESPONDERS TO HIGHLY ACTIVE ANTIRETROVIRAL THERAPY

V. V. Vlasova^{a,#}, E. V. Saidakova^a, L. B. Korolevskaya^a, N. G. Shmagel^b,
Academician of the RAS V. A. Chereshnev^{a,c}, and K. V. Shmagel^a

^a *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation*

^b *Perm Regional Center for Protection against AIDS and Infectious Diseases, Perm, Russian Federation*

^c *Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation*

[#]*e-mail: violetbaudelaire73@gmail.com*

Immunological non-responders (INR) are HIV-infected subjects that fail to restore CD4⁺ T-cell counts despite undetectable HIV viral load, which is controlled by highly active antiretroviral therapy (HAART). In INR, impaired immune restoration is linked to low-productive proliferation of memory CD4⁺ T-lymphocytes. Taking into account that T-cell ability to divide depends on the activity of metabolic pathways, we aimed to determine rates of mitochondrial respiration and glycolysis in memory CD4⁺ T-cells of INR. Two groups of HIV-infected HAART-treated patients were studied: immunological non-responders and subjects with an adequate immunological response to therapy (immunological responders – IR). Healthy control (HC) group comprised uninfected volunteers. In both groups of HIV-infected patients glycolytic activity of memory CD4⁺ T-cells was lower than that in HC. Mitochondrial respiration rate in memory CD4⁺ T-cells derived from IR was comparable to that of HC at basal state, however, after stimulation IR failed to reach the values of uninfected subjects. INR had the lowest mitochondrial respiration rate both at basal state and after stimulation. Taken together, the data presented herein demonstrate that low regenerative potential of memory CD4⁺ T-cells derived from INR might be linked to diminished lymphocytes' metabolic activity.

Keywords: HIV-infection, highly active antiretroviral therapy, CD4⁺ T-lymphocytes, metabolism, glycolysis, mitochondria