

МАРТЫНОВА ЕКАТЕРИНА ВЛАДИМИРОВНА

**РОЛЬ ПЛАЗМОЦИТОИДНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК В
ПАТОГЕНЕЗЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и иммунологической лаборатории ГБУЗ «РЦПБ СПИД и ИЗ МЗ РТ», отдельные этапы работ проводились в НОЦ фармацевтики ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научные руководители: Доктор биологических наук, доцент
Ризванов Альберт Анатольевич

Доктор медицинских наук, профессор
Анохин Владимир Алексеевич

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук, профессор, ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия» Минздрава России, профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии;

Шевлюк Николай Николаевич

Доктор медицинских наук, доцент, ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, заведующий лабораторным отделением (диагностика ВИЧ-инфекций и вирусных гепатитов) центра клинической диагностики;

Буланьков Юрий Иванович

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение Высшего профессионального образования «**Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова**» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «18» декабря 2015 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.034.01 при ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49, корпус Б) и на сайте: <http://www.kgmu.kcn.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



Л.Д. Зубаирова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Одной из глобальных угроз человечеству в новейшей истории, безусловно, является ВИЧ-инфекция. Гигантский объем исследований по изучению этого заболевания не позволяет, тем не менее, однозначно объяснить генез ряда его проявлений. Одним из звеньев инфекционного процесса, как показали последние наблюдения, является фиксация ВИЧ фолликулярными дендритными клетками. (Scialdone et al., 2015). При кажущемся очевидном участии в развитии самой инфекции плазматоидных дендритных клеток (пДК), роль их остается мало понятной (Gilliet et al., 2008). пДК – популяция сравнительно небольшого пула антиген-презентирующих клеток (0,2-0,5% от мононуклеарных клеток периферической крови) (Petit et al., 2005). Однако, при этом пДК играют значимую роль в индукции адаптивного иммунного ответа (Bignold et al., 2009). Выделяют миелоидные (CD11c⁺) и плазматоидные (CD11c⁻/CD123) ДК, имеющие общих предшественников с макрофагами и лимфоцитами, и выполняющие в организме различные функции. Клетки Лангерганса участвуют в первых этапах ВИЧ-инфицирования, экспрессируя на своей поверхности CD4⁺, рецепторы хемокинов (CXCR4, CCR5). Однако, вопрос о вовлечении ДК в механизм прогрессирования ВИЧ остается неясным, поскольку зараженные клетки, в отличие от лимфоцитов, не погибают. Существует вероятность того, что ДК могут служить своеобразным резервуаром ВИЧ (Gezelter et al., 1995; Santos et al., 2004; Veazey and Lackner, 2004). В исследованиях Bridgeman показано, что снижение числа дендритных клеток в крови ВИЧ-инфицированных лиц ассоциируется с увеличением вирусной нагрузки (Bridgeman et al. 2015). Дальнейшая работа в этом направлении способна пролить свет на механизмы взаимодействия ДК и ВИЧ.

Модель Т-клеточного истощения как ключевого патогенетического момента ВИЧ-инфекции, предложенная Ameisen J. и Carгон A. в 1991 году, говорит о том, что ВИЧ повышает чувствительность CD4⁺ Т-клеток к активационно-индуцированному апоптозу (Ameisen J. et al., 1991). Последующие исследования Romero-Alvira D. с соавт. (1998), Brown S.B. с соавт. (2000), Yoshino N. с соавт. (2000) подтвердили, что именно гиперактивация апоптоза иммунокомпетентных клеток, является основным фактором непосредственного формирования иммуносупрессии при ВИЧ-инфекции. Однако, несмотря на многочисленные исследования, механизм, посредством которого ВИЧ вызывает усиление апоптоза, все еще не расшифрован окончательно. Одним из объяснений является то, что при связывании растворимого гликопротеина ВИЧ gp120 с рецептором CD4 и ко-рецепторами (CXCR4, CCR5) инициируется апоптоз

неинфицированных клеток (Nardacci et al., 2015). Это, в свою очередь, делает их чувствительными к индукции апоптоза при последующей антигенной стимуляции (Nardacci et al., 2015). Badjey A.D. (1999) установил, что Т-клетки ВИЧ-инфицированных пациентов подвержены спонтанному апоптозу, неадекватно восприимчивы к активационно-индуцированной клеточной смерти в ответ на связывание Fas-рецептора, а также вследствие цитокинового дисбаланса. Таким образом, ведущая роль процессов апоптоза в иммунопатогенезе ВИЧ-инфекции признается сегодня большинством ученых (Idziorek et al., 1989, Bagetta G. et al., 1999, Chang K.N. et al., 2000). Поэтому чрезвычайно важно исследование процессов апоптоза в различных стадиях ВИЧ-инфекции, определение роли апоптоза в формировании быстрого и замедленного типов течения заболевания, что дает возможность также оценивать эффективность проводимой терапии.

Данное исследование имеет принципиальное значение для расшифровки механизмов и этапов патогенеза ВИЧ-инфекции на клеточном и молекулярном уровне. В связи с этим, ДК, оказывающие существенный вклад в работе иммунной системы человека, могут осуществлять депонирование и миграцию ВИЧ в различные лимфоидные органы, что может послужить новой вехой в поиске методов лечения данного заболевания.

Целью работы явилось: Определить значимость плазмцитоподобных дендритных клеток в патогенезе ВИЧ-инфекции.

Основные задачи исследования:

1. Провести сравнительную оценку количества плазмцитоподобных дендритных клеток в периферической крови у ВИЧ-инфицированных лиц и условно здоровых доноров.
2. Определить количество плазмцитоподобных дендритных клеток в кишечнике у ВИЧ-инфицированных лиц и условно здоровых доноров.
3. Исследовать уровень экспрессии маркеров CD11c, CD303, CD123, CD80, Ki-67, CD56, CD4, гранзим В в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта при ВИЧ-инфекции.
4. Изучить механизмы гибели плазмцитоподобных дендритных клеток при ВИЧ-инфекции.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Фазы тяжелого иммунодефицита у больных ВИЧ-инфекцией протекают на фоне низкой активности плазмцитоподобных дендритных клеток периферической крови с одновременным ростом числа пДК в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки.

2. В желудочно-кишечном тракте больных ВИЧ-инфекцией изменяется иммунофенотип плазмоцитоидных дендритных клеток.

3. Зараженные ВИЧ моноклеарные клетки человека *in vitro*, подвергаются некротическим и позднеапоптотическим изменениям по рецептор-зависимому пути апоптоза.

Научная новизна работы. В результате проведенного иммуногистохимического анализа биопсийного материала двенадцатиперстной кишки больных ВИЧ-инфекцией выявлены следующие фенотипические характеристики плазмоцитоидных дендритных клеток: экспрессия на поверхности ДК маркеров CD 11c, CD4, CD56, CD80, Ki-56, наличие экспрессии гранзима В. Впервые показано, что у больных с ВИЧ-инфекцией в ЖКТ имеет место ко-экспрессия маркеров CD303/CD56. Впервые показано, что в слизистой кишечника больных ВИЧ присутствуют пДК предшественники клеток из костного мозга, экспрессирующие маркер CD11c. Достоверное увеличение плазмоцитоидных дендритных клеток в желудочно-кишечном тракте в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки при ВИЧ-инфекции одновременно коррелировало со сниженными показателями абсолютного количества CD4+ клеток и увеличенным уровнем вирусной нагрузки у ВИЧ-инфицированных лиц в периферической крови. Впервые показана экспрессия в слизистой 12-перстной кишки у ВИЧ-инфицированных пациентов гранзима В. Было показано, что при инкубировании культуры клеток человека с ВИЧ в условиях *in vitro*, клетки подвергаются рецептор-зависимому сигнальному пути апоптоза.

Впервые показана преимущественная инфицируемость вирусом иммунодефицита человека плазмоцитоидных дендритных клеток по сравнению с общей популяцией моноклеарных клеток человека.

Определены возможные механизмы гибели плазмоцитоидных дендритных клеток при их инфицировании ВИЧ-1. Выявлено, что гибель дендритных клеток, подвергшихся инфицированию ВИЧ *in vitro*, связана с апоптотическими изменениями моноклеарных клеток крови человека.

Установлено, что в слизистой желудочно-кишечного тракта больных ВИЧ-инфекцией пДК экспрессируют маркер CD11c, характерный для незрелых дендритных клеток. Показано, что пДК в ткани кишечника активнее экспрессируют маркер активации CD80, чем аналогичные клетки периферической крови, что может свидетельствовать о миграции активированных пДК в слизистую. При иммуногистохимическом анализе слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки ВИЧ-инфицированных пациентов было обнаружено снижение экспрессии CD123 на дендритных клетках.

Научно-практическая значимость. Апробированные методы выделения и культивирования плазмоцитоидных дендритных клеток, а также их

инфицирование ВИЧ-1 в модели *in vitro* могут быть использованы при разработке методов скрининга веществ, обладающих потенциальной антиретровирусной активностью.

Применение полученных результатов в области биологического феномена перераспределения дендритных клеток позволит выяснить новые механизмы вирусной репликации и иммунодефицита у таких больных.

Практическая значимость работы. Полученные результаты позволяют рекомендовать определение интенсивности процессов апоптоза и активации пДК для оценки тяжести и стадии ВИЧ-инфекции. Данные по изучению этих процессов могут быть использованы для прогноза инфекционного процесса и анализа эффективности специфической противовирусной терапии.

Личный вклад диссертанта в исследования

Данные, приведенные в работе, получены при непосредственном участии диссертанта на всех этапах проведения исследования, а именно: составление плана работы, подготовка и проведение экспериментов, анализ и систематизация полученных данных, а также оформление публикаций.

Достоверность полученных данных

Достоверность полученных данных основана на репрезентативном объеме полученных результатов исследований, использовании адекватных и информативных методологических подходов, а также статистической обработке полученных результатов.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на: научно-практических конференциях молодых ученых Казанского государственного медицинского университета (Казань, 2011, 2012 гг.), Международном молодежном научном форуме «Ломоносов» (Москва, 2013г.), IV Российском съезде врачей общей практики I 2013, V Всероссийской научно-практической конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (Москва, 2013г.), Современных проблемах фундаментальной медицины и биологии (Казань, 2013г.), II Международной научно-практической конференции «Естественные и медицинские науки: актуальные проблемы и перспективы развития» (Казань, 2013г.), III Заочной международной научно-практической конференции «Медицина: актуальные вопросы и тенденции развития» (Москва, 2013г.), на 18 международной конференции SymBioSe 2015 (Александрополис, 2015 г.)

Реализация результатов исследования

Основные результаты диссертационного исследования отражены в 7 научных работах, в том числе 4-х статьях в ведущих рецензируемых научных журналах,

рекомендованных Высшей аттестационной комиссией для защиты кандидатских и докторских диссертаций, 3 тезиса докладов на Международных и Всероссийских конференциях, конгрессах и симпозиумах.

Полученные данные могут представлять интерес для патофизиологов, инфекционистов, клеточных биологов. Результаты исследования используются при чтении лекций на кафедре «детские инфекции» ГБОУ ВПО Казанский ГМУ Минздрава России, использованы в практике деятельности ООО «ГенДжин».

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация оформлена на 103 страницах текста. Состоит из введения, обзора литературы, методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка иллюстративного материала и списка литературы. Список цитируемых источников включает 150 работ, из них 9 – отечественных и 141 – иностранных авторов. Диссертация содержит 16 рисунков и 5 таблиц.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Периферическую кровь больных ВИЧ-1 получали из наблюдательного отделения ГУЗ РКИБ РТ. Больные не принимали АРВТ последние 4 месяца перед забором крови. В данной работе было исследовано 23 больных с диагнозом ВИЧ-инфекция, 8 из которых были женщины (36%) и 15 (64%) мужчин. Средний возраст исследуемых лиц составил 35,6 лет. Пути передачи инфекции включали половой контакт 10 случаев (48%) и гемоконтактный путь в 13 случаях (52%). При этом 16 больных (69,5%) получали противовирусное лечение, в то время как 7 пациентов (30,4%) не принимали АРВТ. В АРВТ входили нуклеозидные и не нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, а также ингибиторы протеазы. Средняя вирусная нагрузка составила $412,1 \pm 342$ копий/мл ($n=23$), в 8 случаях (34,7%) имели вирусную нагрузку выше, чем 250 копий/мл; в 12 (52,1%) – менее 200 копий/мл. Среднее количество CD4+ клеток было $306,1 \pm 56$ клеток/мл ($n=23$). По мере развития заболевания, у ряда больных диагностировали оппортунистические инфекции, среди которых были кандидоз и волосистая лейкоплакия слизистых, туберкулез органов дыхания, что соответствует 3 и 4 стадиям заболевания ВИЧ-инфекцией по И.В. Покровскому. В контрольной группе было 10 здоровых людей. Средний возраст 26,5 лет: 3 женщины (30%) и 7 мужчин (70%). Все лица контрольной группы не имели каких-либо инфекционных заболеваний, а результаты лабораторных исследований на ВИЧ-1 были отрицательными. Мононуклеарную фракцию выделяли в градиенте плотности фиколла ($\rho=1,077$ г/см³) по ранее описанной методике (Kanof et al., 2009). Таким же образом выделяли МКПК от здорового донора. Вирус

иммунодефицита человека получали по стандартной методике (Hanneke et al., 2005). Супернатант, содержащий ВИЧ собирали, центрифугировали и измеряли титр при помощи иммуноферментного анализа на сердцевинный белок ВИЧ p-24 (Вектор Бест, Уфа). Полученный вирус переносили в 1,5 мл в криопробирки и хранили при -80°C .

Для определения титра вирусного стока использовали набор для иммуноферментного анализа (ИФА) и подтверждения наличия антигена p24 ВИЧ-1 (Вектор Бест, Уфа). Результаты регистрировали с помощью спектрофотометра (TECAN Infinite M200PRO).

Инфицирование мононуклеаров периферической крови человека ВИЧ

Культуру клеток МКПК от здорового донора стимулировали фитогемаглютинином (ФГА, ПанЭко), в концентрации 10 МЕ/мл в среде RPMI 1640 (ПанЭко). Клетки культивировали 24 часа в инкубаторе при 37°C с 5% содержанием CO_2 . На следующие сутки в культуру клеток вносили вирус в конечной концентрации 1100 пкг/мл и инкубировали при 5% содержании CO_2 в течение 120 часов.

Выделение плазмоцитоидных дендритных клеток методом отрицательной магнитной сепарации

Клетки выделяли из свежих образцов крови при помощи седиментации в градиенте плотности фикола ($\rho=1,077$ г/мл). Затем отмывали фосфатно-солевым буфером, эритроциты лизировали в гипотоническом растворе (0,7% натрия хлорида), далее мононуклеарные клетки использовали для инфицирования вирусом (Hawley and Totowa, 2004). При помощи отрицательной иммуномагнитной сепарации были выделены плазмоцитоидные дендритные клетки из фракции МКПК здорового донора по протоколу описанному производителем набора Biotec, 2013 (plasmacytoid dendritic cell isolation kit, 130-092-207).

Прижизненная биопсия двенадцатиперстной кишки с помощью фиброгастроуденоскопии

Процедура забора биоматериала была проведена на базе ГАУЗ РКИБ РТ им. Проф. А.Ф. Агафонова (г. Казань) в отделении гастроскопии при учете всех необходимых условий, согласно ранее опубликованному протоколу проведения фиброгастроуденоскопии (ФГДС) (Langenberg et al.1990). У 6 пациентов с диагнозом ВИЧ-инфекция и 6 пациентов из контрольной группы была проведена ФГДС, с последующей прижизненной биопсией двенадцатиперстной кишки. Было получено информированное согласие от каждого пациента в соответствии с

протоколом (статья 20 Федерального закона "О праве граждан об охране здоровья Российской Федерации" N323-ФЗ, 11.21.2011).

Гистологические и микроскопические методы исследования

Флуоресцентная иммуногистохимия.

Было проведено иммунотипирование дендритных клеток, методом иммунофлуоресцентного окрашивания продольных срезов биопсийного материала (Akhtar et al., 2007) 12-перстной кишки по следующим маркерам: к рецептору пДК – CD303-FITC (mouse anti-human (clone AC144), 1:500, MiltenyiBiotec, Auburn, CA, USA), к специфическому маркеру активации Т-лимфоцитов – CD80-PE (mouse anti-Human (clone 2D10), 1:500, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), к рецептору ИЛ-3 – CD123 (mouse anti-human (clone AC145), 1:500; MiltenyiBiotec, Auburn, CA, USA), к маркеру Т-лимфоцитов – CD4-PE (mouse anti-human (clone VIT4), 1:500, MiltenyiBiotec, Auburn, CA, USA), к рецептору Гранзима В (PE Mouse anti-Human GZMB IgG1 (clone GB11) 1:500, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), к маркеру CD56 (PE Mouse Anti – human CD56 IgG1 (clone AF127H3) 1:500, Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) и к маркеру клеточной пролиферации Ki-67 (PE Mouse anti Ki-67 IgG1, (clone B56), BD Pharmingen, San Jose, CA, USA). Результаты оценивали методом флуоресцентной микроскопии на приборе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss) с компьютерной системой фотодокументации.

Методы проточной цитофлуориметрии

Проточная цитофлуориметрия образцов крови больных ВИЧ-инфекцией

100 мкл цельной крови были проинкубированы с антителами anti-human CD45-PerCP (Mouse anti-human (clone Ros220), разведение 1:10), anti-human CD303-APC (mouse anti-human (clone AC144) разведение 1:10) и anti-human CD123-PE (Mouse anti-human (clone AC145), разведение 1:10). Клетки анализировали методом проточной цитометрии FACS CantoII, используя программу FACS Diva (BD Biosciences). Плазмоцитоидные дендритные клетки были идентифицированы благодаря экспрессии CD45+, CD303+, CD123+. Статистический анализ проводили с использованием теста Манна-Уитни U для сравнений между отдельными экспериментальными группами (инфицированных и неинфицированных, отдельно мужчины и женщины).

Проточная цитофлуориметрия мононуклеарных клеток периферической крови человека для определения количества пДК и ВИЧ-инфицированных клеток

Культуру клеток отмывали центрифугированием при помощи стерильного раствора фосфатно-солевого буфера Дульбекко (ФСБД, (ПанЭко). Использовали антитела к поверхностному маркеру пДК CD303-FITC Anti-human CD303 (BDCA-2, Antibody, 2371035, BioLegend) и антитела к внутриядерному белку ВИЧ-1 p-24

(Santa Cruz, sc-69728). Результаты оценивали при помощи метода проточной цитометрии FACS CantoII, используя программу FACS Diva (BD Biosciences).

Исследование апоптоза методом окрашивания Annexin-V FITC и PI. Через 120 часов культивирования МКПК с ВИЧ, клетки собирали центрифугированием 5 мин при $500 \times g$, промывали два раза стерильным раствором ФСБД и окрашивали Annexin-V FITC / PI (согласно протоколу фирмы-производителя (Sigma)).

Статистический анализ результатов

Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего арифметического. Обработку результатов выполняли в Statsoft Statistica 6.0 и Microsoft Excel 2007. Для оценки значимости использовали t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна-Уитни для выборок с Гауссовым или непараметрическим распределением. Значимыми считали отличия с $p < 0,05$ (при необходимости вводили поправку Бонферрони).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и титрование ВИЧ «дикого типа»

Внесением МКПК ВИЧ-инфицированного пациента в культуру МНПК донора (ко-культивирование) добивались заражения здоровых клеток вирусом иммунодефицита человека. Инфицирование ВИЧ-1 через 72 часа ко-культивирования моноклеарной фракции здорового и ВИЧ-инфицированного пациента было подтверждено по факту обнаружения вирусного белка p-24 в супернатантах клеточных культур, что составляло $567 \pm 106,0$ пкг/мл. В ходе проведенной амплификации вируса в клетках периферической крови удалось добиться увеличения его концентрации. Содержание белка p24 в супернатантах ($n=3$) моноклеарной фракции периферической крови человека составляло $1100 \pm 116,0$ пкг/мл и $2308 \pm 97,5$ пкг/мл, на 5 день и 8 день, соответственно. Таким образом, был получен и амплифицирован дикий (природный) изолят ВИЧ-1, который использовался в дальнейшей работе в концентрации 1100 пкг/мл.

Была проведена оценка уровня экспрессии ядерного белка ВИЧ-1 p24 в пДК, входивших в состав МКПК. Клеточную культуру инкубировали 120 часов с изолятом ВИЧ-1.

Преимущество применения природного изолята ВИЧ в работе обусловлено приближенными экспериментальными условиями в изучении патогенеза заболевания *in vitro*.

Анализ инфицирования моноклеарных клеток периферической крови человека ВИЧ

Для определения числа клеток с активной вирусной репликацией проводили окрашивание антителами анти-CD303 (маркер плазматоидных ДК), с FITC меткой и ядерному белку ВИЧ-1 p-24, меченых PE. При оценке числа инфицированных клеток методом проточной цитофлуориметрии было

установлено, что процент р24-позитивных клеток в общей популяции МКПК был менее 1% (Рисунок 1Б). Нами было установлено, что после инкубации мононуклеарных клеток периферической крови от здорового донора с ВИЧ *in vitro* процент инфицированных пДК составил 98,28%. Полученные данные согласуются с данными о приоритетном инфицировании пДК ВИЧ-1 (Muller-Trutwin et al., 2005).

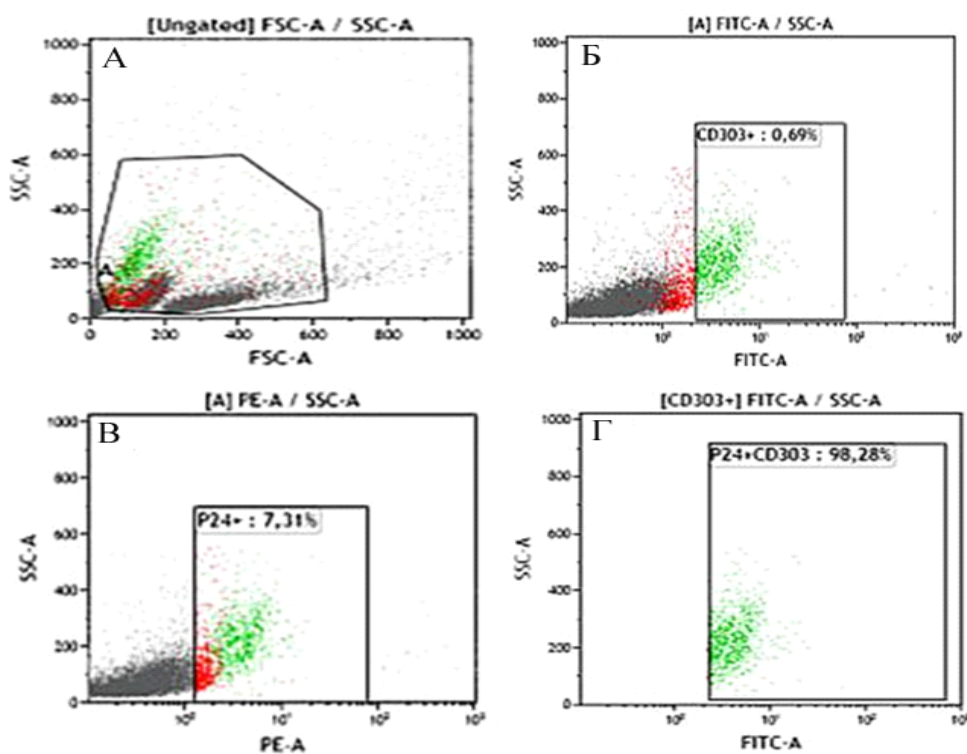


Рисунок 1 – Проточная цитометрия мононуклеарных клеток периферической крови человека, зараженных изолятом ВИЧ-1. **А.** Точечная диаграмма SSC-боковое светорассеивание (от англ. Side Scatter, SSC). Мононуклеары периферической крови человека. Зеленое свечение – окраска на CD303 FITC, Красное свечение – окрасивание на белок р-24 PE. **Б.** Точечная диаграмма флуоресценция клеток по CD303 – 0,69%. **В.** Точечная диаграмма флуоресценция клеток по р-24 красное свечение (зеленое параллельное свечение CD303) – 7,31% от общего количества клеток; **Г.** Наличие белка р-24 в плазмоцитойдных дендритных клетках – 98,28%. Инкубация клеток с вирусом 120 часов.

Плазмоцитойдные дендритные клетки в периферической крови пациентов с ВИЧ-инфекцией

Учитывая показанную возможность инфицирования ВИЧ-1 популяции пДК *in vitro*, был проведен сравнительный анализ количества пДК в периферической крови доноров и ВИЧ-инфицированных пациентов. С этой целью было произведено окрашивание клеток периферической крови доноров и ВИЧ-инфицированных с помощью меченых антител (АТ) к CD303-APC (маркер пДК) и

CD123-PE (рецептор ИЛ-3). Были выявлены достоверные различия в количестве циркулирующих плазмоцитоидных дендритных клеток лиц контрольной группы и ВИЧ-инфицированных пациентов (Рисунок 2). Количество (%) пДК у больных ВИЧ-инфекцией составило $0,044 \pm 0,084$, в то время как в контроле – $0,093 \pm 0,014$ ($p=0,0031$). Таким образом, уровень пДК по маркеру CD303 у группы здоровых лиц в среднем в два раза выше, чем у ВИЧ-инфицированных.

Уменьшение числа циркулирующих пДК у больных ВИЧ было так же ранее показано в работах O'Brien и Schmidt (O'Brien et al., 2010; Schmidt et al., 2006). Было высказано несколько гипотез, объясняющих снижение количества циркулирующих пДК при ВИЧ-инфекции, включая возможность цитопатического эффекта вируса на пДК, а так же возможное перераспределение пДК в ткани.

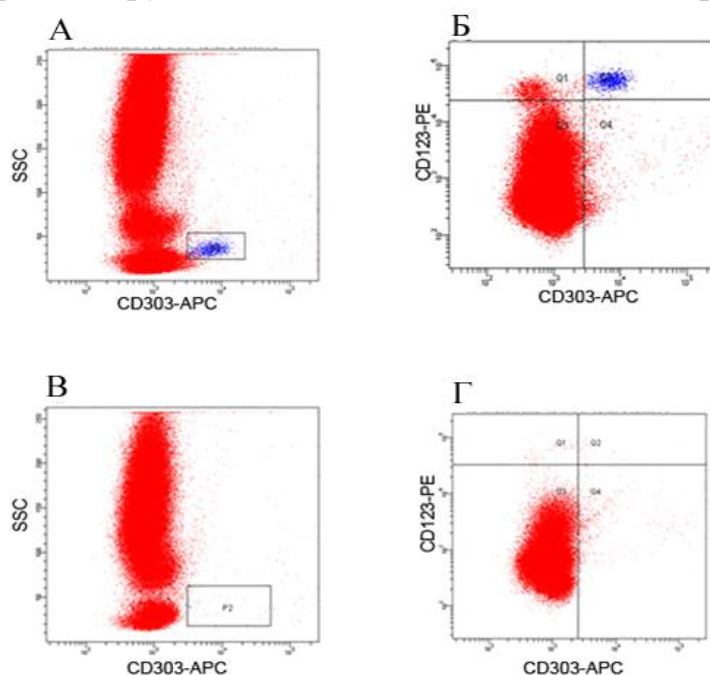


Рисунок 2 – Количественная оценка плазмоцитоидных дендритных клеток в крови больных ВИЧ-инфекцией. **А** – Точечная диаграмма. Флуоресценция клеток крови, окрашенных антителами к маркеру CD303-APC, пациенты из контрольной группы. **Б**. Точечная диаграмма. Флуоресценция клеток крови по CD303-APC и CD123-PE, пациенты из контрольной группы. **В**. Точечная диаграмма. SSC-боковое светорассеивание, флуоресценция клеток крови, окрашенных антителом к маркеру CD303-APC, пациенты с ВИЧ-инфекцией. **Г**. Точечная диаграмма. Флуоресценция клеток крови по CD303-APC и CD123-PE, пациенты с ВИЧ-инфекцией.

При оценке уровня дендритных клеток у больных на разных стадиях ВИЧ-инфекции было выявлено, что при нарастании признаков иммуносупрессии в крови пациентов, количественные показатели пДК снижаются. Статистически значимые эти различия были установлены для подгрупп пациентов-мужчин в 3 стадии ВИЧ с контролем.

Уровень CD4 положительных клеток и пДК, прямо коррелируют с уровнем вирусной нагрузки, согласно таблице 1.

Таблица 1 – Соотношение количества дендритных клеток к вирусной нагрузке

	РНК ВИЧ коп/мл М (ср.откл)/Ме	Уровень пДК % М (ср.откл)/Ме
CD4 Больше 500 n=4	70803,53 (750)	0,04 (0,06195)
CD4 200-500 n=8	81639,74 (449)	0,04 (0,08075)
CD4 Менее 200 n=11	307777,02 (13345)	0,03 (0,0248)

Наблюдались достоверные различия между контрольной группой неинфицированных людей и больных ВИЧ-инфекцией пациентов ($p \leq 0,01$), у женщин с диагнозом 4 стадия ВИЧ по классификации В.И. Покровского, 2001.

Дендритные клетки в двенадцатиперстной кишке у ВИЧ-инфицированных пациентов

Наши исследования продемонстрировали факт снижения числа пДК в периферической крови у ВИЧ-инфицированных пациентов. Это может быть обусловлено интенсивной гибелью данной популяции клеток в результате цитотоксического действия ВИЧ-1 и являться следствием перераспределения клеток, в первую очередь, в лимфоидную ткань ЖКТ. Для выяснения правомочности данных предположений были проведены следующие исследования.

Для идентификации дендритных клеток в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки было проведено иммуногистохимическое окрашивание срезов биопсийного материала двенадцатиперстной кишки у 6 пациентов с ВИЧ-инфекцией и 6 пациентов из контрольной группы с последующим фенотипированием биопсийного материала на маркеры CD303, CD123, CD80 и CD4, Гранзим В, CD56, CD11c.

Впервые проведенное исследование на пациентах выявило признаки инфильтрации плазмоцитойдными дендритными клетками ткани двенадцатиперстной кишки у больных ВИЧ-инфекцией. Выявлено 6-кратное увеличение количества пДК в слизистой двенадцатиперстной кишки у ВИЧ-инфицированных в сравнении с контролем ($p < 0,005$). Полученные данные совпадают с результатами исследований пДК при инфекции вируса иммунодефицита обезьян (ВИО), где было показано, что эти клетки инфильтрируют колоректальную область ЖКТ у ВИО-инфицированных резус-макак в остром периоде заболевания (Kannanganat et al., 2011). Схожие результаты были показаны Reeves с коллегами, где сообщалось о повышенном накоплении пДК слизистой кишечника у обезьян с ВИО (Reeves, et al., 2010). Кроме того, Liu с коллегами наблюдали четырехкратное увеличение пДК в лимфатических узлах тонкого и толстого кишечника макак-резусов, инфицированных вирусом ВИО (Liu

and Berkhout 2009). Увеличение тканевой фракции пДК сопровождается снижением количества этих клеток в циркулирующей крови у ВИЧ-инфицированных пациентов. Измененное распределение пДК у животных из крови в ткани было показано Maneglier с соавторами (Maneglier et al. 2008). Эти данные получили дальнейшее подтверждение в исследованиях Брауна с соавторами, которые наблюдали быстрое снижение циркулирующих пДК. Этот факт подтверждает их миграцию в лимфатические узлы (Wijewardana et al. 2009).

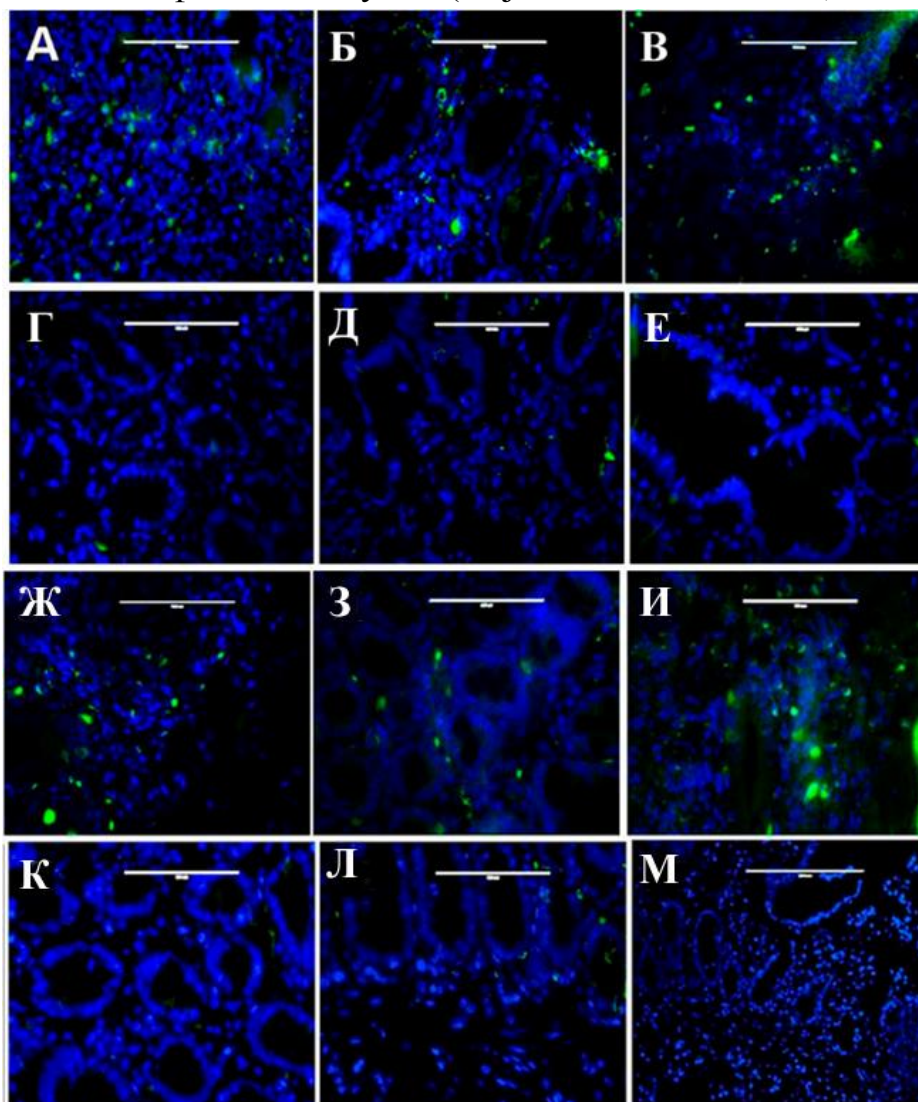


Рисунок 3 – Анализ экспрессии плазмоцитоидных дендритных клеток в двенадцатиперстной кишке больных ВИЧ. А,Б,В,Ж,З,И. Инфильтрация плазмоцитоидными дендритными клетками – экспрессия CD303-FITC (зеленое свечение) двенадцатиперстного отдела кишечника у 6 пациентов с ВИЧ-инфекцией. Г,Д,Е,К,Л,М. Биопсия от здоровых людей. Отсутствие инфильтрации плазмоцитоидными дендритными клетками. Масштаб шкалы 20 мкм

В нашем исследовании окрашенные срезы на гематоксилин-эозин слизистой двенадцатиперстной кишки больных ВИЧ-инфекцией и здоровых людей демонстрировали уровень крипт. Визуально было показано большое количество

окрашенных ядер в гистологическом препарате у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Двойное окрашивание показало, что все CD303 положительно окрашенные клетки, также положительны по маркеру активации Т-лимфоцитов CD80. При этом в группе больных ВИЧ-инфекцией значительно ниже число CD123 положительных клеток (рецептор ИЛ-3), нежели в группе контроля, что косвенно свидетельствует о снижении продукции ИЛ-3 пДК. Кроме того, известно, что предшественники пДК, производные костного мозга, не экспрессируют маркер CD303 (Хоффман и др., 2011); Таким образом, пДК в двенадцатиперстной кишке ВИЧ-инфицированных пациентов, в основном, соответствуют предшественникам пДК II или III стадии. Известно, что CD303 + пДК в ЖКТ экспрессируют маркер CD80. Ко-стимулирующая молекула B7 (CD80) активируется в период инфицирования клеток ВИЧ инфекцией *in vitro*. Циркулирующие в крови здоровых или ВИЧ-инфицированных пациентов пДК практически не экспрессируют CD80. Однако, в диссертационной работе показано, что пДК из кишечника активно экспрессируют маркер CD80, что может свидетельствовать в пользу того, что они более активированы, чем в крови.

Незначительная популяция костномозговых клеток-предшественников ДК так же экспрессируют маркер мДК CD11с. Обнаружено, что большинство пДК в двенадцатиперстной кишке в биоптатах от ВИЧ-инфицированных больных экспрессируют CD11с+ (Рисунок 4 а – в). Однако, CD303+/CD11с+ позитивные клетки не были обнаружены у здоровых людей (Рисунок 4 г – е).

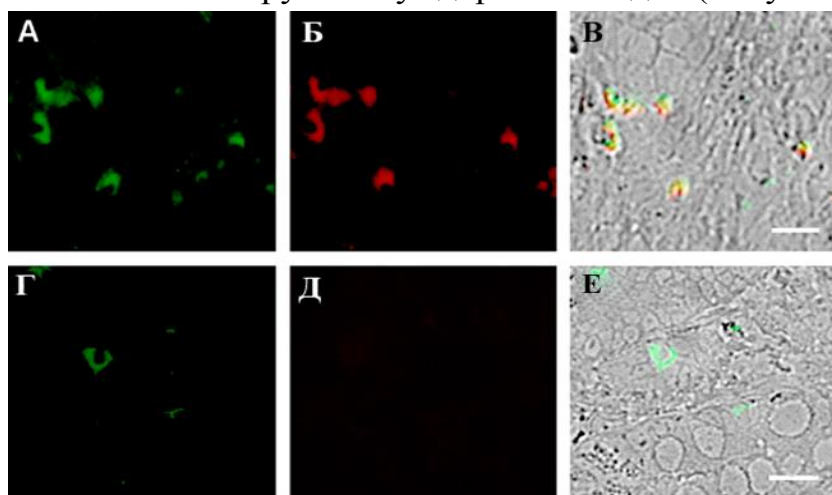


Рисунок 4 – Анализ ко-экспрессии CD 303 и CD11с в биопсийном материале двенадцатиперстной кишки больного ВИЧ-инфекцией. Экспрессия маркера CD303 (зеленое свечение) (А) и CD11с (красное свечение) (Б) и контрольной группы (Г, Д). В, Е – Объединение изображений. Масштаб шкалы, 20 мкм.

Все три популяции пДК экспрессируют маркер CD123 (ИЛ-3α). Однако экспрессия CD4 отсутствует у более ранних пДК, но появляется в более позднем периоде развития клеток (стадия II и III) (MacDonald et al., 2002). Кроме того,

маркер CD184 (CXCR4) экспрессируется на всех трех этапах развития. Эти наблюдения позволяют предполагать, что предшественники пДК могут быть инфицированы ВИЧ, по крайней мере, в начале II стадии дифференцировки клеток.

В нашей работе обнаружено положительное окрашивание клеток на маркеры CD303+/Ki-67+ (маркер пролиферации) в биоптатах ВИЧ-инфицированных, но не в контроле. Эти наблюдения соответствуют результатам, проведенным у макаки циномоглус, зараженных ВИО (Shah et al., 2011). Наличие Ki-67 свидетельствует о недавней миграции пДК из костного мозга (Li et al., 2015). Появление Ki-67 происходит в конце фазы G1, его уровень постепенно нарастает на протяжении S-фазы и достигает максимума к митозу. Увеличение экспрессии клеточного маркера пролиферации Ki-67 свидетельствует о пролиферации и делении пДК в ЖКТ у ВИЧ-инфицированных пациентов. Ранее было показано, что у инфицированных ВИО макак, пДК, находящиеся в ЖКТ экспрессируют Ki-67 (Bruehl, et al. 2014). Известно, что пДК в крови не делятся и данное наблюдение указывает на то, что пДК в ЖКТ у обезьян – это предшественники клеток из костного мозга, а не зрелые пДК крови. В литературе не описано подобных исследований для человека.

В двенадцатиперстной кишке пДК активируют гранзим В. Его наличие во время ВИЧ-инфекции может способствовать повреждению слизистой кишечника. Биопсийный материал от больных ВИЧ-инфекцией и контроль исследовали на ко-экспрессию маркера пДК CD303 и гранзима В. В ходе исследования обнаружили значительное увеличение экспрессии CD303+/ гранзима В группе ВИЧ-инфицированных. В контроле иммунореактивность отсутствовала. Известно, что гранзим В активирует маркер CD56. Поэтому дополнительно были исследованы образцы кишечника на ко-экспрессию маркеров CD56 и CD303. Показано, что у больных с ВИЧ-инфекцией в ЖКТ имеет место ко-экспрессия маркеров CD303/CD56. В контрольной же группе ко-экспрессии маркеров CD303/CD56 не наблюдалось.

Активированные пДК экспрессируют цитотоксический фермент гранзим В, однако эта экспрессия подавляется в присутствии ИНФ- α и активируется с помощью ИЛ-3 (Cavrois et al., 2006). В нашем исследовании пДК из кишечника ВИЧ-инфицированных имеют низкую экспрессию CD123, также, как и пДК-предшественники из костного мозга. Гранзим В экспрессируется цитотоксическими Т-лимфоцитами и натуральными киллерами. Существует связь экспрессии гранзима В с ИЛ-3, где чем выше экспрессия гранзима В, тем ниже продукция ИЛ-3 (Cavrois et al., 2006). Поэтому нарушение регуляции CD123 (ИЛ-3-рецептор) может потенциально активировать экспрессию гранзима В. Можно предположить, что наличие гранзима В влияет на снижение регенеративной

способности эпителия кишечника, а также способствует повышению проницаемости слизистой оболочки и формированию воспалительных изменений, обусловленных ВИЧ (Strickler, et al., 2014; Schuetz, A., et al., 2014).

Нами было показано, что большинство CD303+ клеток также экспрессируют CD56 (NCAM-1, нейрональная молекула клеточной адгезии-1). Ранее было продемонстрировано, что в пДК, активированных вакциной к вирусу клещевого энцефалита, наблюдается ко-экспрессия CD303, CD56, и гранзима В (Tan, et al., 2013).

Таким образом, снижение числа плазмоцитоидных дендритных клеток у ВИЧ-инфицированных в крови является многофакторным процессом и включает в себя перераспределение в ткани, репопуляцию и миграцию.

Оценка жизнеспособности культур клеток, инфицированных ВИЧ-1

Учитывая многочисленные и противоречивые данные об имеющихся нарушениях в регуляции программы апоптоза в инфицированных клеточных популяциях, а также принимая во внимание полученные нами данные о значительном снижении количества пДК у ВИЧ-инфицированных, представляло интерес изучение возможных механизмов гибели пДК.

Низкий процент пДК в культурах МКПК доноров, а также высокая вероятность межклеточных взаимодействий различных популяций клеток, изучение механизмов гибели пДК предполагало выделение “чистой” популяции пДК.

Оценка уровня инфицирования выделенной культуры плазмоцитоидных дендритных клеток ВИЧ

Из МКПК здорового донора при помощи магнитной сепарации была получена обогащенная (свыше 90%) культура пДК. При культивировании была продемонстрирована высокая жизнеспособность клеточной популяции. При инфицировании ВИЧ-1 пДК показали низкую инфицируемость по сравнению с культурой клеток МКПК. Через 120 часов инкубирования клеточной культуры с вирусом клетки подверглись инфицированию всего на 10%, что согласуется с литературными источниками. Su и коллеги установили, что пДК инфицируются вирусом значительно выше в присутствии CD4 Т-клеток, по сравнению с отдельным культивированием пДК с вирусом (Su et al., 2014).

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали перераспределение пДК в крови ВИЧ-инфицированных в слизистую кишечника. Заражение ВИЧ пДК *in vitro* вызывает их апоптоз. Инфицированные CD4+-клетки теряют способность к пролиферации *in vitro* и подвергаются запрограммированной гибели в ответ на определенные раздражители. В

настоящее время апоптоз считается ведущим фактором снижения численности CD4 позитивных клеток при ВИЧ-инфекции (Ameisen, Groux et al. 1992). Во время апоптоза клетки экспонируют фосфатидилсерин на клеточной поверхности. Аннексин V, являющийся фосфолипид-связывающим протеином, в присутствии ионов кальция селективно, с высокой аффинностью, связывает фосфатидилсерин. Он проявляет очень низкую аффинность к таким фракциям фосфолипидов, как фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин и фосфатидилхолин. Поэтому в завершении проведенных нами исследований, были изучены механизмы гибели пДК клеток при ВИЧ-инфекции *in vitro*. При помощи набора Annexin-V FITC/PI (Sigma), нами было показано, что под влиянием ВИЧ-инфекции снижение пДК в крови связано с явлениями апоптоза на поздней стадии, когда происходит деградация ДНК. Поскольку при некрозе происходит нарушение целостности мембраны, что может послужить причиной попадания меченного Annexin V внутрь клетки, то двойном окрашивании с красителем PI можно проследить три пула клеток. Annexin V-/PI- (живые), Annexin V+/PI- (раннеапоптотические) и Annexin V+/PI+ (некротические и позднеапоптотические) (С. В. Глушен и др., 2009). Поздняя фаза данного апоптоза, после активации каспаз 3 и 9 и образования апоптотических телец может занять от 4 до 48 часов (R. Nardacci et al., 2015). В нашей работе результаты фиксировали после 120 часов инкубации с ВИЧ, тем самым были продемонстрированы некротические и позднеапоптотические изменения в МКПК человека по рецептор-зависимому пути апоптоза (Рисунок 5 Б).

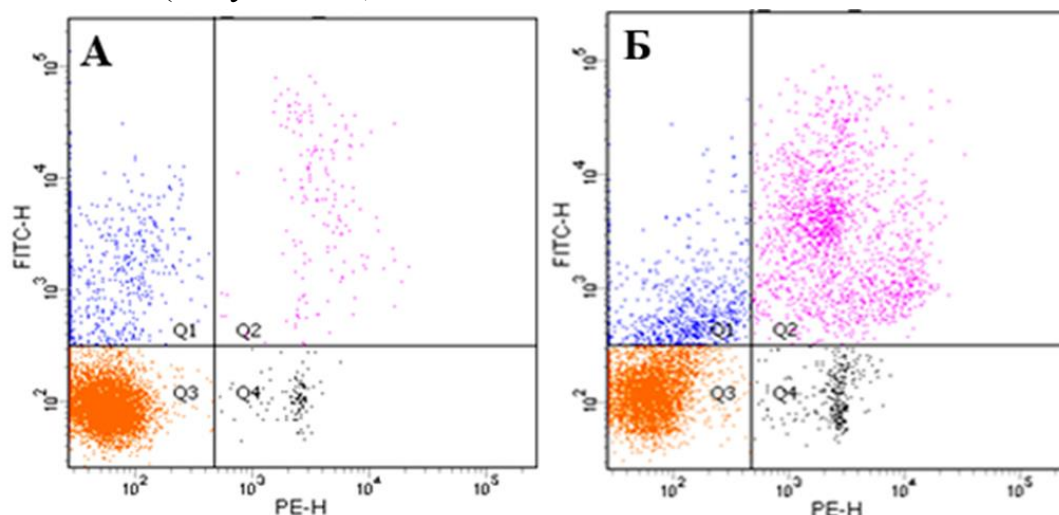


Рисунок 5 – Проточная цитофлуорометрия МКПК, после инфицирования ВИЧ на явления апоптоза. Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma). 120 часов. А – контроль культуры клеток МКПК без вируса. Ранний апоптоз (Q1) – 7,5%, Поздний апоптоз (Q2) - 2%, Живые клетки (Q3) – 89,1 %, Некроз (Q4) – 1,4%; В – Культура клеток МКПК, после инфицирования ВИЧ, 120 часов PI.

Ранний апоптоз (Q1) - 10%, Поздний апоптоз (Q2) - 23,1%, Живые клетки (Q3) - 62,9 %, Некроз (Q4) - 4%

Таким образом, по-видимому, одними из первых заражению ВИЧ подвергаются пДК в крови и мигрируют в лимфоидную ткань ЖКТ, где поддерживают пул вируса в организме. В то же время в лимфоидной ткани у больных ВИЧ-инфекцией присутствуют пДК на разных стадиях дифференцировки, что свидетельствует о постоянной циркуляции пДК из костного мозга. Снижение иммунитета возникает на фоне уменьшения количества пДК вследствие увеличения проницаемости кишечника и миграции пДК в его слизистую, а так же активации инфицированных Т-лимфоцитов, на фоне интенсивной их гибели по рецептор-зависимому пути. Таким образом, поддерживается постоянный резервуар вируса в организме.

ВЫВОДЫ

1. При ВИЧ-инфекции происходит снижение количества плазмоцитоидных дендритных клеток в периферической крови в 2 раза ($0,044 \pm 0,084$ %, ($p=0,0031$)) и повышается их содержание в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки в 6 раз ($p < 0,005$).
2. Количественные изменения плазмоцитоидных дендритных клеток в крови при ВИЧ-инфекции находятся в обратной зависимости от вирусной нагрузки ($p=0,003$) и снижения количества CD4+ лимфоцитов ($p=0,0006$).
3. В слизистой ткани кишечника больных ВИЧ-инфекцией экспрессия маркера пДК CD303, маркера активации Т-лимфоцитов CD80, рецептор интерлейкина-3 – CD123, клеточного маркера пролиферации Ki-67, нейрональная молекула клеточной адгезии CD56, рецептор связывания ВИЧ с клеткой CD4, Гранзим В – активатор апоптоза и маркер мДК CD11c.
4. Увеличение количества плазмоцитоидных дендритных клеток в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта у больных ВИЧ-инфекцией сопровождается появлением клеток, экспрессирующих маркер CD11c, характерный для предшественников плазмоцитоидных дендритных клеток, что свидетельствует об активации этих клеток.
5. При инфицировании мононуклеарных клеток периферической крови человека ВИЧ-1 *in vitro* наблюдается их массовая гибель по рецептор-зависимому сигнальному пути апоптоза, в отличие от неинфицированных клеток в тех же условиях культивирования. Инфицированные ВИЧ-1 *in vitro* мононуклеарные клетки находились и в стадии некроза.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Апробированные методы выделения и культивирования плазмоцитоидных дендритных клеток, а так же их инфицирование ВИЧ-1 в модели *in vitro* могут

быть использованы при разработке методов скрининга веществ, обладающих потенциальной антиретровирусной активностью.

2. Полученные результаты в области биологического феномена перераспределения дендритных клеток, могут быть использованы при преподавании вопросов патогенеза ВИЧ-инфекции.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Головин Е.В. Биобезопасная клеточная модель ВИЧ-инфекции на основе рекомбинантного лентивируса / Е.В. Головин, **Е.В. Мартынова**, и др. // Врач-аспирант. – 2011. - Т.5.3, №48. - С.409-414.
2. Golovin E.V. Safe model of HIV infection to assess antiretroviral activity of medical drugs / E.V. Golovin, I.G. Mustafin, **E.V. Martynova** et al. // Современные технологии в медицине. – 2012. –V.2. – P 55-60.
3. **Martynova E.V.** Approaches to the study of the pathogenesis of HIV infection / **E.V. Martynova** // Middle East Journal of Scientific Research – 2013 – V.17 №7. – P. 976-978.
4. Лоскутова Е.Ф. Тест-система на основе рекомбинантного лентивируса для скрининга противовирусных препаратов / Е.Ф. Лоскутова, **Е.В. Мартынова**, А.А. Ризванов // Сборник тезисов I научно-практической конференции студентов и молодых ученых Института фундаментальной медицины и биологии «Современные проблемы фундаментальной медицины и биологии». – Казань, 2013. – С. 89.
5. Лоскутова Е.Ф. Создание рекомбинантного лентивируса, экспрессирующего зеленый флуоресцентный белок GFP и определение его инфекционной способности / Е.Ф. Лоскутова, **Е.В. Мартынова**, А.А. Ризванов // Сборник тезисов I научно-практической конференции студентов и молодых ученых Института фундаментальной медицины и биологии «Современные проблемы фундаментальной медицины и биологии». – Казань, 2013. – С. 91.
6. Boychuk S.V. Gut – associated plasmacytoid dendritic cells display an immature phenotype and upregulated granzyme B in subjects with HIV/AIDS/ S.V. Boychuk, S.F. Khaiboullina, B.R. Ramazanov, **E.V. Martynova** et al // Frontiers in Immunology. – 2015 – V. 6. – P. 1-12.
7. **Martynova E. V.** Role of plasmacytoid dendritic cells in pathogenesis of human immunodeficiency virus / **E. V. Martynova**, S. F. Khaiboullina, M. Musalva, S.V. Boychuk, V. A. Anokhin, A. A. Rizvanov // Abstract in symposium SymbioSe. – Greece – 2015 – V.1. P. 54-5.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АРВТ – антиретровирусная терапия;

ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия;

ВИО – вирус иммунодефицита обезьян;
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека;
ДК – дендритные клетки;
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;
ИЛ-3 – интерлейкин – 3;
ИНФ – интерферон;
ИФА – иммуноферментный анализ;
МКПК – моноклеарные клетки периферической крови;
пДК – плазмоцитоподобные дендритные клетки;
СПИД – синдром приобретенного иммунного дефицита;
ФГА – фитогемагглютинин;
ФГДС – фиброгастродуоденоскопия;
ФСБД – фосфатно-солевой буфер Дульбекко;
ЦФДА-1 – цитрат фосфатный буфер декстрозы аденина;
Vsl-2 – серин-треонин фосфотаза
NCAM 1 – (от английского neural cell adhesion molecule 1) нейрональная молекула клеточной адгезии 1;
TLR – (от английского Toll like receptor) Толл-подобный рецептор.