

ЦИТОКИНЫ СПОСОБНЫ РЕГУЛИРОВАТЬ ПРОЦЕССЫ РЕПЛИКАЦИИ ВИЧ-1 И АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ *IN VITRO*

Сергей Васильевич Бойчук*, Павел Дмитриевич Дунаев, Ильшат Ганиевич Мустафин

Казанский государственный медицинский университет

Реферат

Цель. Изучение способности цитокинов интерлейкина-2, интерлейкина-4, интерлейкина-7 и фактора некроза опухоли альфа регулировать процессы репликации вируса иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1) и апоптоза лимфоцитов *in vitro*.

Методы. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли центрифугированием на градиенте плотности раствора фиколл-пак. Лимфоциты культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением L-глутамина, эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотиков и цитокинов (интерлейкинов-2, -4, -7, фактора некроза опухоли альфа). Для инфицирования лимфоцитов использовали лабораторный штамм ВИЧ-1 NL4-3 (NIH Res&Reag. Prog., США). Репликацию ВИЧ-1 оценивали по уровню вирусного белка p24^{agg} в супернатантах культур (иммуноферментный анализ) и его внутриклеточному содержанию в лимфоцитах (проточная цитометрия). Апоптоз лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии по следующим параметрам: (1) снижение трансмембранного митохондриального потенциала; (2) повышение экспрессии молекул фосфатидилсерина. Активацию лимфоцитов оценивали по экспрессии молекул CD25 и HLA-DR (проточная цитометрия).

Результаты. Цитокины индуцируют репликацию ВИЧ-1 в лимфоцитах *in vitro*. Репликация ВИЧ-1 отмечалась только при наличии в культуре активированных лимфоцитов. В то же время среди лимфоцитов-продуцентов ВИЧ-1 присутствовали клетки, не экспрессировавшие классические активационные маркеры CD25 и HLA-DR, что свидетельствовало о наличии альтернативного механизма вирусной репликации, то есть не зависящего от активации клеток. Данный факт также может свидетельствовать о процессах вирусной репликации в пуле латентно инфицированных клеток, не экспрессирующих, как известно, классические активационные маркеры. Вышеназванные цитокины также способствовали гибели неинфицированной популяции лимфоцитов по механизму апоптоза, поддерживая жизнеспособность инфицированных клеток, тем самым способствуя репликации ВИЧ-1.

Выводы. Цитокины (интерлейкины-2, -4, -7 и фактор некроза опухоли альфа), являющиеся факторами, направленными на поддержание гомеостаза иммунной системы и формирование иммунного ответа, при ВИЧ-инфекции могут играть негативную роль – индуцировать вирусную репликацию в лимфоцитах и, возможно, приводить к реактивации пула латентно инфицированных клеток, а также вызывать гибель неинфицированной популяции лимфоцитов, что приводит к нарастанию лимфопении и прогрессированию заболевания.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, цитокины, вирусная репликация, апоптоз, лимфоциты, латентно инфицированные клетки.

ЦИТОКИНЫ РЕГУЛИРУЮТ ВИЧ-1 РЕПЛИКАЦИЮ И ЛИМФОЦИТНУЮ АПОПТОЗИНУ *IN VITRO* S.V. Boichuk, P.D. Du-naev, I.G. Mustafin. Kazan State Medical University, Kazan, Russia. **Aim.** To study the ability of cytokines – interleukin-2, interleukin-7 and tumor necrosis factor alpha to induce human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication and lymphocyte apoptosis *in vitro*. **Methods.** Peripheral blood mononuclears were separated by centrifugation on a ficoll paque solution specific density gradient. Lymphocytes were cultivated in RPMI 1640 medium with addition of L-glutamine, embryonal bovine serum, antibiotics and cytokines (interleukines-2, -4, -7, tumor necrosis factor alpha). To infect the lymphocytes, a laboratory strain of HIV-1 NL4-3 (NIH Res&Reag. Prog., USA) was used. HIV-1 replication was assessed by p24^{agg} viral protein level in culture supernatants (ELISA) and its cytozolic level in lymphocytes (flow cytometry). Lymphocyte apoptosis was assessed by flow cytometry using the following parameters: (1) decrease of transmembrane mitochondrial potential; (2) increase in phosphatidyl serine molecules expression. Lymphocyte activation was assessed by CD25 and HLA-DR molecules expression (flow cytometry). **Results.** Cytokines induce the HIV-1 replication in lymphocytes *in vitro*. HIV-1 replication was noted only if inactivated lymphocytes were present in the culture. At the same time, lymphocytes not expressing the classical activation markers (CD25 and HLA-DR) were present among the lymphocytes producing HIV-1 indicating the possible alternative mechanism of HIV-1 replication, not dependent on cell activation. This fact might also be an evidence of viral replication processes in the pool of latently-infected lymphocytes, not expressing the classic activation markers. The abovementioned cytokines promote apoptotic death of uninfected lymphocytes *in vitro*, backing up the infected cells viability and thus promoting HIV-1 replication. **Conclusion.** Cytokines (interleukines-2, -4, -7, tumor necrosis factor alpha) which are known as factors supporting the immune system homeostasis and immune response formation, might also play a negative role in HIV-1 pathogenesis – induce HIV-1 replication in lymphocytes and, probably, lead to reactivation of the pool of latently-infected lymphocytes, deepening the lymphopenia and leading to disease progression. **Keywords:** HIV-infection; cytokines; viral replication; lymphocytes, apoptosis, HIV latently-infected cells.

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в последнее время в области терапии инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), патогенез заболевания остаётся предметом научных дискуссий, что обуславливает актуальность проведения дальнейших научных исследований. К примеру, на наш взгляд,

актуально исследование роли цитокинов в регуляции вирусной репликации и апоптоза лимфоцитов (ЛФ), поскольку именно данные процессы способствуют развитию иммунодефицита и прогрессированию заболевания [6]. Показано, что в плазме крови ВИЧ-инфицированных по мере прогрессирования заболевания изменяются концентрации цитокинов. В частности, отмечено снижение содержания интерлейкина-2 (ИЛ-2), а

Адрес для переписки: boichuksergei@mail.ru

также повышение количества ИЛ-4, ИЛ-7 и фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α) [3, 7, 10]. Следовательно, данные цитокины можно рассматривать в качестве потенциальных факторов, способных оказывать влияние на репликацию ВИЧ-1 и апоптоз Лф. Вышеизложенное стало основанием для проведения настоящего исследования по изучению роли цитокинов ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7 и ФНО- α в патогенезе ВИЧ-инфекции, а именно в регуляции процессов репликации ВИЧ-1 и апоптоза Лф.

Предметом изучения были Лф периферической крови 30 здоровых доноров (17 мужчин и 13 женщин) в возрасте от 25 до 50 лет. Мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК) выделяли центрифугированием на градиенте плотности раствора фиколл-пак («Sigma», США). С помощью камеры Горяева определяли количество МНПК в 1 мл питательной среды RPMI 1640 («Биолот», г. Санкт-Петербург). В стерильных условиях ламинарного бокса («Labconco», США) МНПК вносили в лунки 24-луночных плоскодонных планшетов («Orange Scientific», Бельгия) в конечной концентрации 500×10^3 клеток/мл и культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением L-глутамина, эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Санкт-Петербург) и антибиотиков («Sigma», США). В культуры Лф вносили цитокины в следующих концентрациях: 10 МЕ/мл ИЛ-2 («Sigma», США), 3 нг/мл ИЛ-4, 2,5 нг/мл ФНО- α («Biosource», США), 15 нг/мл ИЛ-7 («National Cancer Institute», США). Концентрации цитокинов определялись на основании литературных данных и соответствовали их физиологическим значениям [8, 9].

Культивирование клеток проводили при 37 °C в CO₂-инкубаторе («Joan», США) в течение 11 дней. На 3-й, 6-й, 9-й и 11-й дни проводили забор части клеточной суспензии на предмет анализа учётных признаков Лф: общее количество клеток, экспрессия активационных маркёров и маркёров апоптоза. В отдельные 24-луночные планшеты помещали МНПК с целью моделирования ВИЧ-инфекции *in vitro*. Инфицирование клеток производили сразу же в 1-й день через 2 ч после добавления цитокинов. Для инфицирования использовали лабораторный штамм ВИЧ-1 NL43 (NIH AIDS Research & Reference Reagents Program, США). Культивирование Лф и анализ их учётных признаков проводили аналогично неинфицированным культурам.

Определение в культуре клеток количества активированных Лф проводили, используя соответствующие моноклональные антитела (мкАТ): (1) мкАТ к молекуле CD25, конъюгированные с флюорохромом FITC («Сорбент», Москва), (2) мкАТ к молекулам HLA-DR, конъюгированные с флюорохромом PE («Сорбент», Москва). Для определения активационного статуса инфицированных Лф (клеток с активной вирусной репликацией) проводили окрашивание клеточной суспензии на поверхностные активационные маркёры CD25 и HLA-DR с последующим

внутриклеточным выявлением вирусного белка p24^{gag} с помощью соответствующих мкАТ («Beckman Coulter», США). Оценку результатов осуществляли методом проточной цитометрии на приборе «Facs Calibur» («Becton Dickinson», США).

В качестве критериев, использованных для оценки апоптоза Лф, были выбраны следующие: снижение величины трансмембранного митохондриального потенциала ($\Delta\psi_m$) на фоне одновременной экспрессии молекул фосфатидилсерина [1]. Для этого использовали соответствующие флюорохромы: DiOC₆ и MC 540 («Sigma», США), а также Annexin V («PharMingen», США), конъюгированный с флюорохромом FITC (AnnV-FITC). Апоптоз инфицированной популяции Лф исследовали следующим образом: 1-й этап — окрашивали клетки с помощью флюорохрома AnnV-FITC; 2-й этап — клетки отмывали, затем проводили внутриклеточное окрашивание на наличие белка ВИЧ-1 p24^{gag} с помощью соответствующих мкАТ, конъюгированных с флюорохромом PE («Beckman Coulter», США). Оценку результатов проводили на проточном цитометре «Facs Calibur».

Репликацию ВИЧ-1 оценивали методом иммуноферментного анализа по содержанию вирусного белка p24^{gag} (пкг/мл) в супернатантах инфицированных культур. Для этого применяли тест-систему «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ-скрин» («Диагностические системы», Нижний Новгород) и использовали стандарт с концентрацией белка p24^{gag} 11 нг/мл («Bio-Rad», Франция). Учёт результатов проводили на планшетном фотометре «Multiskan EX» («Thermo LabSystem», Финляндия).

Полученные экспериментальные данные были подвергнуты статистической обработке с помощью компьютерной программы BIOSTATISTICA (S.A. Glantz, McGraw Hill). Уровень статистической значимости (p) считали равным 0,05. Связь между признаками оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r).

Внесение ВИЧ-1 в культуры Лф, инкубированные в отсутствие цитокинов, не приводило к его репликации, в то время как после внесения ВИЧ-1 в культуры Лф, инкубированные с цитокинами ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7 и ФНО- α , отмечалась вирусная репликация (p < 0,05). Пик репликации ВИЧ-1 возникал на 6-й день культивирования: (1) в присутствии ИЛ-7 (p24^{gag} — 526 ± 146 пкг/мл); (2) в присутствии ИЛ-2 (p24^{gag} — 3974 ± 115 пкг/мл); (3) в присутствии ИЛ-4 (p24^{gag} — 2769 ± 223 пкг/мл); (4) в присутствии ФНО- α (p24^{gag} — 2695 ± 288 пкг/мл). Таким образом, по способности индуцировать репликацию ВИЧ-1 изучаемые цитокины располагаются в следующей последовательности: (1) ИЛ-7 — наибольшие значения вирусной репликации; (2) ИЛ-2; (3) ИЛ-4 и ФНО- α — наименьшие значения вирусной репликации.

После установления того, что исследуемые цитокины индуцируют репликацию ВИЧ-1 в Лф, была поставлена задача выяснить причину данного феномена. Для этого изучали

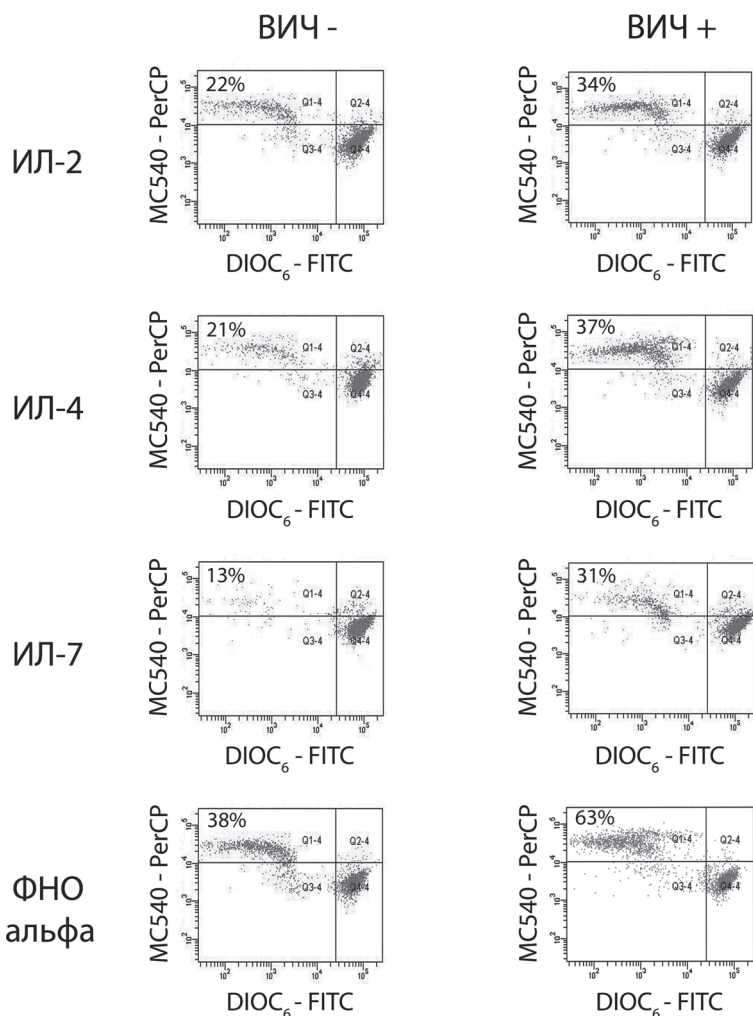


Рис. 1. Апоптоз лимфоцитов в неинфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-) и инфицированных (ВИЧ+) культурах, инкубированных в присутствии интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7) и фактора некроза опухоли (ФНО) альфа – 6-й день культивирования. Лимфоциты с признаками апоптоза (%) – в левом верхнем квадрате.

способность цитокинов вызывать активацию Лф. Известно, что именно активированные клетки являются основными источниками репликации ВИЧ-1 [2]. Уровень активации Лф оценивали по экспрессии поверхностных маркёров (см. выше). В отсутствие цитокинов количество активированных Лф было минимальным (не более 2,5%) как в неинфицированных, так и в инфицированных культурах. В присутствии цитокинов ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7 и ФНО- α происходила активация Лф как в неинфицированных, так и в инфицированных культурах ($p < 0,05$). Было обнаружено, что Лф с активной вирусной репликацией ($p24^{agg}$ -позитивные) представляют собой гетерогенную популяцию клеток. Среди них присутствовали как Лф, экспрессирующие классические маркёры активации CD25 и HLA-DR, так и клетки без признаков активации.

Проведённые исследования также показали,

что во всех инфицированных культурах, инкубированных с цитокинами, была выявлена прямая зависимость между уровнем репликации ВИЧ-1 и количеством активированных Лф ($r > 0,74$, $p < 0,05$), а также между уровнем репликации ВИЧ-1 и количеством инфицированных ($p24^{agg}$ -позитивных) клеток ($r > 0,74$, $p < 0,05$).

Цитокины ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7 и ФНО- α в отсутствие инфицирования ВИЧ-1 поддерживали жизнеспособность Лф в культуре (на заключительный 11-й день количество Лф соответствовало их количеству на начальных этапах культивирования). Напротив, при инфицировании Лф в присутствии цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7 и ФНО- α) наблюдалась их гибель по механизму апоптоза. В инфицированных культурах количество Лф с признаками апоптоза достоверно отличалось от неинфицированных культур (рис. 1). Статистический анализ полученных результатов

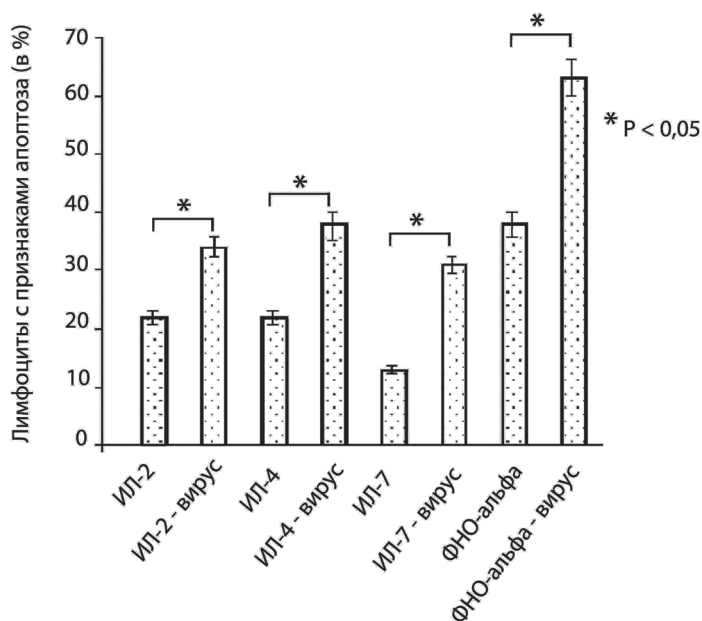


Рис. 2. Апоптоз лимфоцитов в неинфицированных и инфицированных ВИЧ-1 культурах, инкубированных в присутствии цитокинов – интерлейкинов (ИЛ) и фактора некроза опухоли (ФНО) альфа, 6-й день культивирования.

показал, что в присутствии цитокинов количество Лф с признаками апоптоза было достоверно больше в инфицированных культурах, чем в неинфицированных (рис. 2). По способности индуцировать апоптоз Лф в инфицированных культурах цитокины располагаются в следующей последовательности: (1) ФНО- α – в культурах отмечено наибольшее количество Лф с признаками апоптоза; (2) в присутствии ИЛ-2, ИЛ-4 и ИЛ-7 обнаружено одинаковое количество Лф с признаками апоптоза.

В инфицированных культурах в присутствии цитокинов (ИЛ-2 и ИЛ-7) по механизму апоптоза погибали преимущественно неинфицированные Лф, в то время как Лф с активной репликацией вируса оставались жизнеспособными.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что цитокины ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7 и ФНО- α индуцируют репликацию ВИЧ-1 в Лф. Репликация ВИЧ-1 отмечена только при наличии в культуре активированных Лф. Цитокины вызывали активацию Лф, в результате в культурах происходила вирусная репликация. Инфицирование культур неактивированных Лф (то есть инкубированных в отсутствие цитокинов) не индуцировало репликацию ВИЧ-1, так как не обеспечивало активацию данных клеток.

В литературе продемонстрировано, что активация Лф – один из пусковых факторов репликации ВИЧ-1 [2]. В то же время полученные результаты свидетельствуют, что Лф с активной репликацией ВИЧ-1 представляют собой гетерогенную популяцию клеток. Среди них присутствовали как Лф, экспрессирующие классические маркеры активации CD25 и HLA-DR, так и клетки, не имеющие данных маркеров. Сле-

довательно, можно предположить, что наряду с классическим механизмом репликации ВИЧ-1 в Лф существует альтернативный, то есть не зависящий от активации Лф, что требует дальнейшего изучения.

Данный факт заслуживает особого внимания, так как свидетельствует об альтернативных молекулярных механизмах репликации ВИЧ-1 в Лф, не связанных с активацией клеток-мишеней. Кроме того, продукция ВИЧ-1 в Лф, не экспрессирующих активационных маркеров, может также свидетельствовать о произошедшей реактивации пула латентно инфицированных клеток, не экспрессирующих, как известно, классические активационные маркеры. Дальнейшие запланированные исследования по изучению механизмов латентности при ВИЧ-инфекции и, в частности, по изучению фенотипа, характерного для пула латентно инфицированных Лф, могут подтвердить правомочность данного положения.

Полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в инфицированных *in vitro* ВИЧ-1 клеточных культурах цитокины ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7 и ФНО- α индуцируют гибель Лф по механизму апоптоза (см. рис. 1 и 2). Более чувствительны к апоптозу были неинфицированные Лф, в то время как инфицированные клетки оставались жизнеспособными. Этот факт может быть объяснен следующими механизмами. Показано, что активация Лф повышает их чувствительность к развитию апоптоза [4]. Следовательно, исследуемые цитокины, вызывая активацию Лф, способствовали развитию их программированной гибели. В инфицированных культурах под влиянием цитокинов накапливались свободные вирионы и вирусные белки. В то

же время известно, что некоторые белки ВИЧ-1 (Env, Nef, Tat, Vpr, протеаза) способны индуцировать гибель неинфицированных Лф по механизму апоптоза [6]. Высвобожденные из инфицированных Лф вирусные белки запускают апоптоз неинфицированных клеток при контактном взаимодействии с ними. Механизмы действия данных белков весьма разнообразны. В частности, некоторые из них (белки Env, Nef, Tat) способны индуцировать активацию Лф и, следовательно, повышать чувствительность данных клеток к развитию активационного апоптоза [6].

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что инфицированные Лф (клетки с активной вирусной репликацией) оставались жизнеспособными в присутствии цитокинов. Показано, что в возникновении данного феномена также важную роль играют вирусные белки. В частности, белок вируса Tat повышает в клетке активность белка-ингибитора апоптоза c-FLIP [5]. В то же время результаты настоящего исследования показали, что в данном процессе также немаловажную роль играют и клеточные факторы, в частности цитокины ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7 и ФНО- α . Они, действуя в совместно с вирусными белками, обуславливают оптимальный для жизнедеятельности инфицированных Лф особый активационный статус, проявляющийся при отсутствии экспрессии классических маркеров CD25 и HLA-DR. Перечисленные особенности, вероятно, препятствуют развитию активационного апоптоза инфицированных Лф. Для подтверждения правомочности данной гипотезы необходимо проведение дальнейших исследований.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что цитокины, содержание которых повышается в плазме крови больных при прогрессировании ВИЧ-инфекции (то есть ИЛ-4, ИЛ-7 и ФНО- α), индуцируют репликацию ВИЧ-1 в Лф *in vitro*, а также способствуют гибели неинфицированной популяции Лф по механизму апоптоза. При этом цитокины поддерживают жизнеспособность инфицированных Лф и тем самым способствуют формированию вирусных резервуаров в организме ВИЧ-инфицированных. Следовательно, повышение уровней ИЛ-4, ИЛ-7 и ФНО- α в плазме ВИЧ-инфицированных больных можно рассматривать в качестве маркеров неблагоприятного течения заболевания. Таким образом, цитокины ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7 и ФНО- α , являющиеся факторами, направленными на поддержание гомеостаза иммунной системы и формирование адекватного иммунного ответа, при ВИЧ-инфекции могут играть негативную роль.

ВЫВОДЫ

1. Интерлейкины-2, -4, -7 и фактор некроза опухоли альфа индуцируют репликацию ВИЧ-1 в лимфоцитах. Наиболее эффективные индукторы вирусной репликации — интерлейкины-7 и -2.
2. В инфицированных *in vitro* ВИЧ-1 клеточных культурах цитокины (интерлейкины-2, -4, -7 и фактор некроза опухоли альфа) поддерживают жизнеспособность инфицированных лимфоцитов (клеток с активной вирусной репликацией), в то же время индуцируя гибель неинфицированной популяции лимфоцитов по механизму апоптоза. Наиболее эффективный индуктор апоптоза лимфоцитов — фактор некроза опухоли альфа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №13-04-97034 p_поволжье_a.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бойчук С.В., Мустафин И.Г., Фассахов Р.С. Апоптоз: характеристика, методы изучения и его роль в патогенезе атопических заболеваний // Казан. мед. ж. — 2000. — №3. — С. 217-222.
2. Бойчук С.В., Мустафин И.Г. Роль эндотелиальных клеток и ВИЧ-1 белка Nef в патогенезе ВИЧ-инфекции: новые механизмы репликации ВИЧ-1 // Мед. иммунол. — 2004. — №6. — С. 499-506.
3. Дунаев П.Д., Бойчук С.В., Мустафин И.Г. Свойства и роль фактора некроза опухолей альфа в патогенезе ВИЧ-инфекции // Казан. мед. ж. — 2012. — №2. — С. 290-293.
4. Alderson M.R., Tough T.W., Davis-Smith T. et al. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes // J. Exp. Med. — 1995. — Vol. 181, N 1. — P. 71-77.
5. Gibellini D., Re M.C., Ponti C. et al. HIV-1 Tat protein concomitantly downregulates apical caspase-10 and upregulates c-FLIP in lymphoid T cells: a potential molecular mechanism to escape TRAIL cytotoxicity // J. Cell. Physiol. — 2005. — Vol. 20, N 3. — P. 547-556.
6. Shedlock D.J., Hwang D., Choo A.Y. et al. HIV-1 viral genes and mitochondrial apoptosis // Apoptosis. — 2008. — Vol. 13, N 9. — P. 1088-1099.
7. Sirskij D., Theze J., Kumar A. et al. Disruption of the γ_c cytokine network in T cells during HIV infection // Cytokine. — 2008. — Vol. 43, N 8. — P. 1-14.
8. Unutmaz D., Pileri P., Abrignani S. Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination // J. Exp. Med. — 1994. — Vol. 180, N 3. — P. 1159-1164.
9. Unutmaz D., Kewal Ramani V.N., Marmon S., Littman D.R. Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes // J. Exp. Med. — 1999. — Vol. 189, N 11. — P. 1735-1746.
10. Vandergeeten C., Fromentin R., Chomont N. The role of cytokines in the establishment, persistence and eradication of the HIV reservoir // Cytokine & Growth Factor Reviews. — 2012. — Vol. 23, N 4-5. — P. 143-149.