

- of Erythropoietin. *Bull. World Health Organ.* 1966; 35(5): 751-60.
4. Burns Chr., Tiplady R., Hockley J. WHO International Collaborative study of the proposed 3rd International Standard for Erythropoietin, recombinant, for bioassay. *Expert Committee on biological standardization.* Geneva. 2012: 1-23.
  5. Yakovlev A.K., Gayderova L.A., Podkuyko V.N., Volkova R.A., Alpatova N.A., Olefir Yu.V. The possibility of harmonizing the recombinant erythropoietin specific activity determination method with European pharmacopeia. *Standartnye obraztsy.* 2016; 3: 4-11. (in Russian)
  6. Yakovlev A.K., Alpatova N.A., Postnova E.L., Simutenko L.V., Batuashvili T.A. Study standard methodology for determining the specific activity of erythropoietin on normocytemic mice. *Meditinskaya immunologiya.* 2017; 19(S): 77-8. (in Russian)
  7. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg. 1986.
  8. Lakin G.F. *Biometry [Biometriya. Uchebnoe posobie]*. 4<sup>th</sup> ed. Moscow : Vysshaya shkola; 1990. (in Russian)
  9. USP<1033>BIOLOGICAL ASSAY VALIDATION. Available at: [https://dlscrib.com/queue/usp-1033-biological-assay-validation-pdf\\_58bf8c24e12e899a02add37d\\_pdf?queue\\_id=59a52e4ddc0d60f87c568edc](https://dlscrib.com/queue/usp-1033-biological-assay-validation-pdf_58bf8c24e12e899a02add37d_pdf?queue_id=59a52e4ddc0d60f87c568edc)[accessed 21.02.2018].
  10. USP<1032> DESIGN AND DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL ASSAYS. Available at: [https://www.ipqpubs.com/wp-content/uploads/2010/06/USP\\_1032.pdf](https://www.ipqpubs.com/wp-content/uploads/2010/06/USP_1032.pdf)[accessed 21.02.2018].
  11. Petukhov V.G. The method of parallel lines for the quantitative evaluation of the quality of standards and other medical immunobiological preparations in the enzyme immunoassay. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie.* 2004; 13(1): 19-23. (in Russian)

Поступила 15.03.18

Принята к печати 13.04.18

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:578.828.6]-092:612/017.1]-078.33

Селимова Л.М.<sup>1</sup>, Калнина Л.Б.<sup>1</sup>, Серебровская Л.В.<sup>2</sup>, Иванова Л.А.<sup>2</sup>, Носик Д.Н.<sup>1</sup>

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕОПЛАСТИЧЕСКОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ МТ-4 ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЫ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

<sup>1</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, 123098, Москва;

<sup>2</sup>ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва

*В системе in vitro на модели неопластической клеточной линии МТ-4 было изучено влияние плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов на экспрессию маркеров активации. Проведённые исследования показали изменение экспрессии таких маркеров активации, как CD28<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> и CD69<sup>+</sup>. Динамика этих показателей при использовании плазм пациентов без лечения и пациентов, принимающих антиретровирусную терапию (АРТ), показала, что перечисленные белки могут рассматриваться как маркеры для оценки уровня активации иммунной системы пациентов. Исследования показали снижение активационного потенциала клеток при использовании плазм пациентов с АРТ и повышение без лечения. Изучение экспрессии белков CD28, CD38, HLA-DR и CD69 при использовании МТ-4 клеток и плазмы пациентов с ВИЧ-инфекцией может иметь прогностическое значение для мониторинга инфекции и эффективности различных терапевтических схем.*

Ключевые слова: МТ-4 клетки; фенотипические маркеры CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>.

**Для цитирования:** Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Серебровская Л.В., Иванова Л.А., Носик Д.Н. Использование неопластической клеточной линии МТ-4 для изучения иммуномодулирующей активности плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2018; 63(7): 428-433. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-428-433>

*Selimova L.M.<sup>1</sup>, Kalnina L.B.<sup>1</sup>, Serebrovskaya L.V.<sup>2</sup>, Ivanova L.A.<sup>2</sup>, Nosik D.N.<sup>1</sup>*

APPLICATION OF MT-4 NEOPLASMIC CELL LINE FOR THE STUDY IMMUNOMODULATING ACTIVITY OF PATIENT PLASMA WITH HIV-INFECTION

<sup>1</sup>«The D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology» of «N.F. Gamaleya NRCM», Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow;

<sup>2</sup>«Central Research Institute of Epidemiology, Federal Supervision Service for Consumer Rights Protection and People's Welfare», 111123, Moscow

*It was studied in vitro the immunomodulatory effect of plasma HIV-infected individuals on expression of activation markers when used as a model neoplastic cell line MT-4. Carrying out researches indicated the variation in expression of the activation markers CD28<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> and CD69<sup>+</sup>. Change dynamics of these indices showed that these proteins can to consider as markers for*

*level evaluation of patients immune system during used of plasma HIV-infected individuals with and without antiretroviral treatment (ART). Analysis revealed reduction of cells activation potential in plasma of patients with ART presence and rise without treatment. Examinations of the expression proteins CD28, CD38, HLA-DR u CD69 MT-4 cells and plasma of patients with HIV-infection application can have prognostic value for infection monitoring and efficacy of different therapeutic approaches.*

**Key words:** MT-4 cells; phenotyping markers CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>.

**For citation:** Selimova L.M., Kalnina L.B., Serebrovskaya L.V., Ivanova L.A., Nosik D.N. Application of MT-4 neoplasm cell line for the immunomodulating activity study of patients plasma with HIV-infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018;63(7): 428-433 (in Russ.). DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-428-433>

**For correspondence:** Selimova L.M., doctor of biological sciences, leading researcher; e-mail: [lselim@mail.ru](mailto:lselim@mail.ru)

**Information about authors:**

Selimova L.M., <http://orcid.org/0000-0003-3709-770X>

Kalnina L.B., <http://orcid.org/0000-0002-2702-8578>

Serebrovskaya L.V., <http://orcid.org/0000-0003-1679-3300>

Ivanova L.A., <http://orcid.org/0000-0002-7397-0652>

Nosik D.N., <http://orcid.org/0000-0001-5757-5671>

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgments.** The study had no sponsor support.

Received 12.03.2018

Accepted 10.04.2018

**Введение.** Одним из главных иммунологических критериев течения ВИЧ-инфекции служит уменьшение в крови пациентов количества CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, которые к тому же служат биологической мишенью для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Этому компоненту клеточного звена иммунитета отводится важная роль в регуляции нормального функционирования всех звеньев системы. Снижение количества CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов происходит не только из-за непосредственной цитопатической активности вируса, но и гибели компонентов этого клеточного звена благодаря развитию иммунопатологических процессов, обусловленных биогенетическими особенностями ВИЧ-1. В результате взаимодействия вируса и иммунной системы в организме пациента развивается хроническая гиперактивация всех её звеньев и как следствие возникает иммунодефицит, течение ВИЧ-инфекции осложняется появлением оппортунистических инфекций различной этиологии. Все перечисленные факторы приводят к критическому падению функциональной активности иммунной системы и смерти пациента [1, 2]. Применяемые в настоящее время различные схемы высокоактивной антиретровирусной терапии (АРТ) позволяют добиться существенного подавления репликации вируса и повышения уровня клеток CD4<sup>+</sup> у пациентов даже с высоким уровнем вирусной нагрузки и низким числом клеток CD4<sup>+</sup>. Но полное восстановления функциональной активности компонентов иммунной системы не происходит даже на фоне успешной АРТ [3, 4].

Поэтому понимание всех механизмов организации и поддержания эффективного иммунного ответа при ВИЧ-инфекции представляется важной задачей, необходимой для создания вакцинных препаратов, поиска эффективных иммунотерапевтических подходов и дополнительных методов оценки функциональной активности иммунной системы. Сложность регуляции работы всех многокомпонентных звеньев иммунитета, а также полифункциональность факторов гуморального иммунного ответа существенно усложняют изучение особенностей патогенеза ВИЧ-инфекции. Несмотря на более чем 30-летний период интенсивных исследований, проблема взаимоотношения вируса с иммунной системой хозяина остаётся изученной недостаточно. Высокий уровень активации Т-клеточного звена иммунитета является ключевым в развитии патогенеза ВИЧ-инфекции, а механизмы, вызывающие различные уровни активации Т-клеток, неизвестны. Иммунная

активация оценивается путём анализа маркёров активации, экспрессируемыми клеточной мембраной и растворимыми молекулами, секретлируемыми активированными клетками. Маркёры иммунной активации имеют важное прогностическое значение для оценки развития инфекции и мониторинга антиретровирусной терапии. В связи с этим использование различных подходов к созданию экспериментальных моделей изучения особенностей патогенеза ВИЧ-инфекции представляется очень важным.

Одним из подходов при изучении особенностей регуляции клеток иммунной системы может служить анализ влияния плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов на экспрессию основных иммунологических маркёров и маркёров активации клетками периферической крови [5]. В продолжение этого исследования мы изучили влияние плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов на экспрессию маркёров активации неопластическими клетками MT-4. Эти клетки являются Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup>, трансформированными ретровирусом дельта, называемым Т-лимфотропным вирусом человека 1-го типа (ТЛВЧ-1). По фенотипическим характеристикам они относятся к активированным Т-лимфоцитам CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> [6, 7]. Ранее нами был показан высокий уровень экспрессии ими таких маркёров активации, как CD28<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup> [8]. Все эти белки играют важную роль в регуляции механизмов функционирования иммунной системы человека [9]. При использовании этой клеточной линии не нужен этап получения донорских клеток, их культивирование не требует факторов роста. Активированный статус и фенотип CD4<sup>+</sup> делают клетки MT-4 подходящей моделью для изучения различных веществ, влияющих на экспрессию маркёров активации Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup> [10]. В связи с этим нами было изучено влияние плазмы пациентов с ВИЧ-инфекцией, получающих и не получающих АРТ, на экспрессию фенотипических маркёров CD28<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup> клетками MT-4.

**Материал и методы.** В работе использовали образцы плазмы периферической крови пациентов с хронической инфекцией, находящихся на диспансерном наблюдении в Специализированном научно-исследовательском отделе эпидемиологии и профилактики СПИД (СНИО ЭП СПИД). 14 образцов (4 женщины, 10 мужчин) бы-

ли получены от пациентов без терапии и 21 образец (7 женщин, 14 мужчин) – от пациентов, принимающих АРТ, 10 образцов (5 женщин и 5 мужчин) – от условно здоровых лиц (группа норма). АРТ проводили в соответствии с рекомендациями, принятыми в Российской Федерации [11]. Возраст пациентов без терапии был от 27 до 68 лет ( $\mu 39,1 \pm 13,4$ ), с терапией – от 17 до 63 лет ( $\mu 36,7 \pm 10,7$ ), условно здоровых лиц – от 19 до 64 лет ( $\mu 31,7 \pm 13,8$ ). Кровь отбирали в вакутейнеры, содержащие К2ЭДТА (BD Vacutainer, Великобритания). Осаждали при 2000 об/мин в течение 20 мин при 20°C и отбирали плазму для инкубации с клетками МТ-4. Клетки культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% сыворотки эмбриона коровы, 2 мМ L-глутамина и 50 мкг/мл гентамицина в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37°C. Клетки пересевали через 3–4 дня, плотность при пересеве составляла 2,5x10<sup>5</sup> клеток/мл. Для изучения влияния плазмы пациентов на экспрессию маркёров активации через 1 день после пересева клетки в концентрации 1x10<sup>6</sup> клеток/мл культивировали в присутствии плазмы пациентов или доноров, или стандартной культуральной среде в течение 48 ч (контроль). Для анализа наружных фенотипических маркёров клетки окрашивали следующими моноклональными антителами фирмы Beckman Coulter (США): CD4 (PE или PC5), CD25 (PE), CD28 (PC5), CD38 (PC5), CD62L (PE), CD69 (PC5), CD95 (PE), HLA-DR (PE). Суспензию клеток предварительно отмывали 3 раза в 0,01М фосфатно-солевом буферном растворе (рН 7,2) путём центрифугирования (800 об/мин, 6 мин) и суспендировали в том же растворе при концентрации 2x10<sup>6</sup> клеток/мл. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре EPICS XL (Beckman Coulter, США).

Индекс изменения экспрессии (ИИЭ) для каждого маркёра активации определяли по следующей формуле:

$$\frac{\% \text{ количества клеток в контроле}}{\% \text{ количества клеток в присутствии плазмы}}$$

В числителе – значения медианы, полученные при анализе клеток, культивируемых в культуральной среде, в знаменателе – значения медианы, полученные при анализе клеток, культивируемых в плазме пациентов, не получающих и получающих АРТ, и плазме условно здоровых лиц (норма).

Статистический анализ данных проводили с использованием программы BioStat 2009 (AnalystSoft). Уровень значимости ( $\alpha$ ) был равен 0,05.

**Результаты и обсуждение.** В табл. 1 и 2 представлены результаты изучения влияния плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов и условно здоровых лиц (норма) на экспрессию маркёров активации.

В табл. 2 использованы показатели ИИЭ. Значение 1 свидетельствует о том, что экспрессия маркёра не изменяется, значение больше 1 – о том, что экспрессия снижается, меньше 1 – экспрессия повышается. Неопластические клетки в отличие от нормальных, имеют свой баланс между активностью генов, регулирующих пролиферацию [12]. Эти клетки представляют аутокринную систему, в которой функционируют внутренние конститутивные нерегулируемые сигналы роста и для них характерна генетическая нестабильность в экспрессии генов, управляющих их жизнеспособностью. В них изменены механизмы, отвечающие за апоптоз. При культивировании *in vitro* баланс между экспрессией различных генов и их белковых продуктов может меняться, но оставаться в рамках, необходимых для поддержания жизнеспособности клеток. Существенное изменение

уровня экспрессии некоторых белков в процессе культивирования можно считать одним из недостатков при использовании линии МТ-4 в качестве модельной системы, так как это может ограничивать набор экспериментальных мишеней в случае их низкой экспрессии.

Из полученных результатов видно (см. табл. 1 и 2), что при использовании всех групп плазм экспрессия белков CD25 и CD95 не изменяется. Ранее нами было показано, что в популяции линии МТ-4 практически все клетки, кроме основного фенотипического маркёра CD4<sup>+</sup>, экспрессируют такие белки активации, как CD25 и CD95. Это, очевидно, необходимо для поддержания их неопластических свойств. Маркёр CD25<sup>+</sup> служит  $\alpha$ -цепью рецептора Т-клеточного фактора роста IL-2 [7]. Этот белок экспрессируется трансформированными ТЛВЧ-1 клетками в больших количествах [13], и клетки МТ-4 принято обозначать как популяцию CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Считается, что CD95 играет большую роль в регуляции иммунной системы, управляя гомеостазом, периодом полужизни клеток и скоростью обновления клеточной популяции. Его активация может служить ко-стимулирующим сигналом для пролиферации клеток и продукции цитокинов либо сигналом развития апоптоза. Показано, что проапоптотическая активность этого белка может подавляться различными механизмами с участием протеинкиназ [14]. Клетки МТ-4 имеют свои особенности регуляции на молекулярно-биологическом уровне, и проапоптотическая активность этого белка в них, вероятно, подавлена. Экспрессия же таких маркёров активации, как CD28<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup> может существенно изменяться в процессе культивирования клеток [8].

В случае с белком CD28 наблюдаются незначительные колебания в сторону как увеличения, так и уменьшения. Экспрессия его падает на ~22% в присутствии плазм от пациентов с АРТ и усиливается на ~12% в пробе норма по сравнению с контролем. Уровень белка CD69 во всех случаях высокий даже в контроле, а в присутствии плазм пациентов и нормы незначительно увеличивается в ~1,12–1,16 раз. Такая высокая экспрессия этого белка, очевидно, является следствием особенностей регуляции его синтеза в активированных клетках. Экспрессия белка CD38 существенно падает для всех групп плазм, причём в случае АРТ в наибольшей степени (~90%). Экспрессия маркёра CD62L<sup>+</sup> падает в группе АРТ и усиливается в группах норма и без лечения. Однако данные об изменении этого маркёра нельзя считать достоверными, так как экспрессия этого белка была очень низкая (см. табл. 1). Экспрессия белка HLA-DR для всех категорий плазм существенно усиливалась. Это связано, скорее всего, с тем, что маркёр HLA-DR<sup>+</sup> относится к группе белков главного комплекса гистосовместимости. Тем не менее в случае плазм с АРТ это усиление было наименьшим (~44%), а без терапии – наибольшим (~56%). В целом, можно сказать, что при культивировании клеток МТ-4 с плазмами пациентов с АРТ наблюдалось явное снижение активационного потенциала клеток по маркёрам CD28<sup>+</sup> и CD38<sup>+</sup>.

Для более детального анализа этих данных был определён уровень взаимосвязи отдельных пар белков для каждой группы плазм с использованием коэффициента корреляции Пирсона. Эти результаты представлены в табл. 3.

Как видно, взаимосвязь белков для каждой группы плазм различна. Исключение составляет пара белков CD38-CD28. Во всех группах плазм она была высокой и прибли-

Таблица 1

**Экспрессия фенотипических маркёров активации клетками МТ-4 в присутствии плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов\***

Фенотипический маркёр	Контроль медиана (Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub> )	Без терапии медиана (Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub> )	АРТ медиана (Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub> )	Норма медиана (Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub> )
CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup>	97,9 (97,8–8,1)	98,1(97,5–98,4)	98,1(97,6–98,3)	98(97,9–98,5)
CD4 <sup>+</sup> /CD95 <sup>+</sup>	98,6(98,1–98,9)	98(98–98,3)	98,4(98,2–98,5)	98(97,8–98,5)
CD4 <sup>+</sup> /CD28 <sup>+</sup>	39,2(23,3–61)	39(21,2–55,2)	30,5(13,3–57,8)	44,4(20,6–53,6)
CD4 <sup>+</sup> /CD38 <sup>+</sup>	10,7(2,7–19,2)	5,6(0,43–11,4)	1,1(0,03–15,1)	4,5(1,2–18,7)
CD4 <sup>+</sup> /CD62L <sup>+</sup>	0,48(0,26–0,85)	1,02(0,62–1,9)	0,4(0,3–1,2)	0,9(0,2–1,1)
CD4 <sup>+</sup> /HLA-DR <sup>+</sup>	38,5(31–62,3)	87,5(56–93)	68,1(40,8–88,6)	76,4(47,2–91)
CD4 <sup>+</sup> /CD69 <sup>+</sup>	80,5(58,3–86,5)	92,7(87–96)	90(62,3–95,3)	92,4(90–95)

Примечание. \* – количество клеток, содержащих фенотипический маркёр, в %.

жалась к группе норма, где корреляция была полная. Это свидетельствует о том, что высокий уровень корреляции биосинтеза этих белков служит необходимым условием нормального функционирования клеток МТ-4. При сравнении показателей в группах плазм пациентов без лечения и с лечением видно, что по некоторым парам белков корреляция повышается для последней группы и приближается к соответствующим показателям нормы. А по парам CD28-HLA-DR, CD28-CD69 и HLA-DR-CD69 существенно отличается от неё. На основании представленных данных о коэффициентах корреляции Пирсона для изученных групп плазм можно предположить, что эти биологические жидкости содержат свой специфический набор факторов, регулирующих экспрессию маркёров активации. И они в большинстве случаев отличаются от механизмов регуляции, действующих в клетках (контроль) и плазмах нормы от плазм ВИЧ-инфицированных пациентов. Эти данные позволили нам провести дополнительный дифференцированный анализ плазм пациентов по количеству CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в крови и времени инфицирования или срокам терапии. Результаты представлены на рисунке, а. Как видно на рисунке, б, при делении плазм пациентов по количеству клеток CD4<sup>+</sup> в крови в выделенных категориях пациентов без терапии увеличение количества клеток CD4<sup>+</sup> в крови сопровождалось снижением экспрессии белка CD38 (от ~34% до ~40%) относительно контроля. Относительно нормы количество этого белка было выше в обеих категориях, но при CD4<sup>+</sup> ≥ 500 кл/мкл увеличение было на ~7% ниже. Экспрессия белка HLA-DR увеличена относительно контроля и нормы и, как уже говорилось выше, это связано, скорее всего, с его свойствами как антигена главного комплекса гистосовместимости. Количество белка CD69 было незначительно выше, чем в контроле (~11%), а относительно нормы во всех изученных группах практически не изменялось.

При использовании плазм пациентов с АРТ наблюдалось снижение экспрессии белков CD28 и CD38 и при

CD4<sup>+</sup> > 600 клеток/мкл относительно нормы на ~51 и ~90%, соответственно. Существенное увеличение уровня белка CD28 при CD4<sup>+</sup> >300 –≤600 клеток/мкл может быть связано с присутствием большого количества проб с сопутствующей микробной инфекцией в этой категории пациентов и соответственно с присутствием в плазмах повышенного количества активирующих факторов [15]. К сожалению, данных об этих инфекциях у нас нет. Несмотря на то, что белку CD28 в настоящее время уделяется большое внимание в регуляции иммунной системы [16], его биологические свойства и особенности функциональной активности остаются плохо изученными. Следует отметить, что в группе плазм, составляющих норму, его количество немного превышает контроль и сравнимо с категориями плазм без терапии. Что же касается белков HLA-DR и CD69, то экспрессия их относительно нормы, в основном снижена и повышена относительно контроля.

Анализ плазм по срокам инфицирования или срокам терапии (см. рисунок, б) показал следующее. В выделенных категориях пациентов без терапии при увеличении срока инфицирования экспрессия маркёра CD28<sup>+</sup> постепенно увеличивалась на ~13% и была сравнима с нормой. Количество маркёра CD38<sup>+</sup> было всегда ниже, чем в контроле, но выше, чем в норме, и внутри группы увеличивалось с увеличением срока инфицирования. Количество белка HLA-DR было выше, чем в контроле. Увеличение наблюдалось и относительно нормы. Количество белка CD69 было незначительно выше относительно контроля и сравнимо с нормой. В группе пациентов с АРТ увеличение срока терапии сопровождалось существенным снижением экспрессии маркёров CD28<sup>+</sup> (~73%) и CD38<sup>+</sup> (~90%) относительно нормы. Количество маркёра HLA-DR<sup>+</sup> во всех категориях было выше, чем в контроле, но

Таблица 3

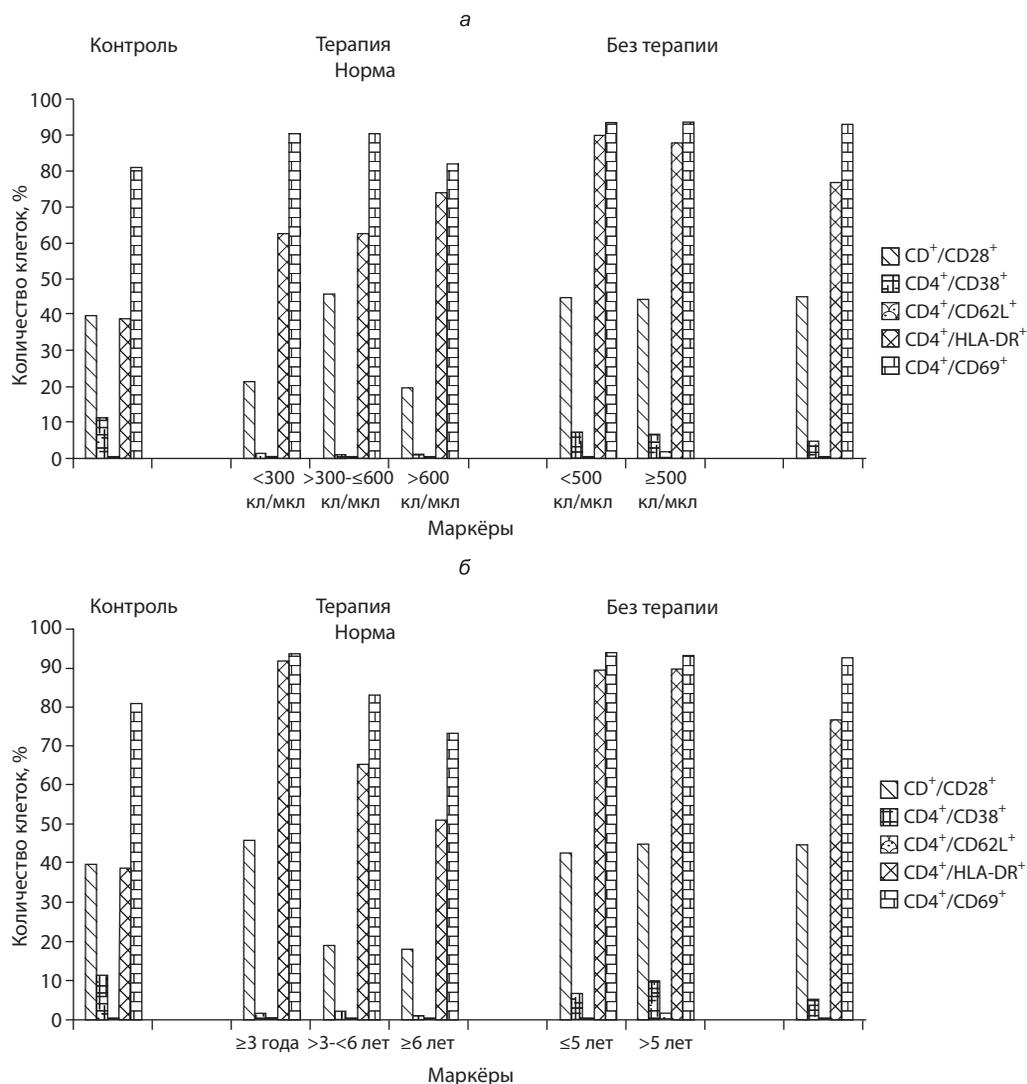
**Коэффициент корреляции Пирсона**

Маркёры	Контроль	Без терапии	АРТ	Норма
CD28 –CD38	0,8952	0,804	0,8561	1
CD28-CD62L	0,5152	0,2030	0,5731	1
CD28-HLA-DR	0,1840	0,5971	0,6918	0,3531
CD28-CD69	0,1416	0,6564	0,7735	0,4215
CD38-CD62L	0,3074	0,0575	0,6797	1
CD38-HLA-DR	-0,2407	0,2904	0,4063	0,3531
CD38-CD69	0,0962	0,4372	0,5738	0,4215
CD62L-HLA-DR	0,1732	0,3226	0,2395	0,3531
CD62L-CD69	0,1493	0,0106	0,3442	0,4215
HLA-DR-CD69	0,5882	0,5443	0,7166	0,2949

Таблица 2

**ИИЭ маркёров активации клетками МТ-4 в присутствии плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов**

Фенотипический маркёр	Без терапии	АРТ	Норма
CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup>	1	1	1
CD4 <sup>+</sup> /CD95 <sup>+</sup>	1	1	1
CD4 <sup>+</sup> /CD28 <sup>+</sup>	1	1,3	0,9
CD4 <sup>+</sup> /CD38 <sup>+</sup>	1,9	10	2,4
CD4 <sup>+</sup> /CD62L <sup>+</sup>	0,5	1,3	0,5
CD4 <sup>+</sup> /HLA-DR <sup>+</sup>	0,4	0,6	0,5
CD4 <sup>+</sup> /CD69 <sup>+</sup>	0,9	1,1	0,9



Влияние плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов на экспрессию маркёров активации клетками МТ-4 в зависимости от количества CD4<sup>+</sup> – клеток в крови (а) и времени инфицирования или химиотерапии (б).

при увеличении периода терапии этот показатель постепенно снижался и в категории  $\geq 6$  лет снизился на ~22% относительно категории  $\leq 3$  года. Сходная динамика наблюдалась относительно нормы. Маркёр CD69<sup>+</sup> был в начале наблюдения выше контроля (на ~14%) и нормы (на ~10%), а при увеличении периода терапии этот показатель постепенно снизился и составил ~10% и ~21% от нормы и контроля соответственно. Особенности экспрессии этого белка в представленных результатах указывают на то, что он играет более существенную роль в регуляции иммунной системы, чем представлялось ранее. В последние годы сведения о роли этого белка в регуляции иммунной системы человека существенно расширились [17]. Что же касается белка CD62L, то относительно этого компонента сложно делать выводы, так как в представленных результатах его экспрессия была очень низкой. Но можно отметить, что в случае плазм от пациентов с АРТ наблюдалась тенденция к снижению его экспрессии с увеличением периода лечения.

Полученные результаты указывают на то, что в

группе пациентов с АРТ наблюдалось выраженное снижение экспрессии белков CD28, CD38, HLA-DR и CD69. Иными словами, в плазме этой группы пациентов присутствуют биологически активные факторы, приводящие к снижению активационного потенциала клеток МТ-4. Напротив, в группе пациентов без лечения присутствуют факторы, повышающие активационный потенциал клеток. В целом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что изменение экспрессии белков CD28, CD38, HLA-DR и CD69 в клетках МТ-4 в присутствии плазмы пациентов с ВИЧ-инфекцией может рассматриваться как показатель оценки уровня активации их иммунной системы. Кроме того, эта биологическая модель может быть использована для разработки различных химиотерапевтических подходов лечения ВИЧ-инфекции, где перечисленные выше маркёры активации могут рассматриваться как терапевтические мишени.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-5, 12-17 см. REFERENCES)

5. Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Серебровская Л.В., Иванова Л.А., Гуляева А.А., Носик Д.Н. Иммуномодулирующая активность плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015;10: 45-9.
8. Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Носик Д.Н. Поверхностные маркёры неопластической клеточной линии МТ-4 и перспективы её использования в качестве модели при изучении активности иммуномодулирующих препаратов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 12: 822-5.
9. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г. Шуплецова В.В. и др. Основные поверхностные маркёры функциональной активности Т-лимфоцитов. *Медицинская иммунология*. 2014; 16(1):7-26.
10. Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Каплина Э. Н., Носик Д.Н. Влияние ферровируса на экспрессию поверхностных маркёров активации клетками неопластической линии МТ-4. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 6: 335-8.
11. Покровский В.В., ред. *ВИЧ-инфекция и СПИД: Клинические рекомендации. 2-е изд.* М.: Медицина; 2009.

REFERENCES

1. Appay V., Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J. Pathol.* 2008; 214: 231–41.
2. Douek D. C., Roederer M. and Koup R. A. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annual Review of Medicine*. 2009; 60: 471–84.
3. Robbins G.K., Spritzler J.G., Chan E.S., Asmuth D.M., Gandhi R.T., Rodriguez B.A. et al. Incomplete reconstitution of T cell subsets on combination antiretroviral therapy in the AIDS Clinical Trials Group protocol 384. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48: 350–61.
4. Kelley C.F., Kitchen C.M., Hunt P.W., Rodriguez B., Hecht F.M., Kitahata M. et al. Incomplete peripheral CD4+ cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48: 787–94.
5. Selimova L.M., Kalnina L.B., Serebrovskaya L.V., Ivanova L.A., Gulyaeva A.A., Nosik D.N. The immunomodulatory activity of

- plasma of patients infected with human HIV virus. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 10:45-9. (in Russian)
6. Manns A., Hisada M., La Grenade L. Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet*. 1999; 353:1951- 8.
  7. Hattori T., Uchiyama T., Toibana T., Takatsuki K., Uchino H. Surface phenotype of Japanese adult T-cell leukemia cells characterized by monoclonal antibodies. *Blood*. 1981; 58: 645– 7.
  8. Selimova L.M., Kalnina L.B., Nosik D.N. The superficial markers of neoplastic cell line MT-4 and perspectives of its application as a model for studying activity of immune modulating preparations. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 12:822-5. (in Russian)
  9. Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sokhonevich N.A., Kofanova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V. et al. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Meditinskaya immunologiya*. 2014; 16(1): 7-26. (in Russian)
  10. Selimova L.M., Kalnina L.B., Kaplina E.N., Nosik D.N. The effect of ferrovirus on to expression of surface markers of activation by cells neoplastic line MT-4. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 6: 355-8. (in Russian)
  11. Pokrovskiy V.V., ed. *HIV infection and AIDS: Clinical Guidelines [ВИЧ-инфекция и СПИД. Клинические рекомендации]*. 2<sup>nd</sup> ed. Moscow: Meditsina; 2009. (in Russian)
  12. Kogure Y., Kataoka K. Genetic alteration in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci*. 2017; 108: 1719-25.
  13. Waldmann T.A. The role of the multichain IL-2 receptor complex in the control of normal and malignant T-cell proliferation. *Environ Health Perspect*. 1987; 75:11-5.
  14. Brint E., O'Callaghan G., Houston A. Life in the Fas lane: differential outcomes of Fas signaling. *Cell Mol. Life Sci*. 2013; 70(21): 4085-99.
  15. Riley J.L., June C. H. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood*. 2005; 105(10): 13-21.
  16. Esensten J.H., Helou Y.A., Chopra G., Weiss A., Bluestone J.A. CD28 costimulation: from mechanism to therapy. *Immunity*. 2016; 44(5): 973-88.
  17. González-Amaro R., Cortes J. R., Sanchez-Madrid F. and Martin P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol. Med*. 2013; 19(10): 625–32.

Поступила 12.03.18  
Принята к печати 10.04.18