

ВЛИЯНИЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ И ТУБЕРКУЛЕЗА НА СТЕПЕНЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Е.В. Васильева¹, И.В. Кудрявцев^{2,5,6}, Г.В. Максимов³, В.Н. Вербов⁴,
М.К. Серебрякова², А.П. Ткачук¹, Арег А. Тотолян^{4,5}

¹ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, Москва, Россия

²ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

³СПбГУЗ Городской противотуберкулезный диспансер, Санкт-Петербург, Россия

⁴ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

⁵ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁶ФГАУ ВПО Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

Резюме. Туберкулез является ведущей причиной смерти больных ВИЧ-инфекцией. В связи с этим актуальной задачей является своевременное выявление туберкулеза после установления диагноза ВИЧ-инфекции. Ранее мы показали, что диагностическая значимость *in vitro* теста QuantiFERON-TB Gold In-Tube не снижается у пациентов с туберкулезом на фоне ВИЧ-инфекции. Вместе с тем остается неясным, какие популяции клеток продуцируют IFN γ в ответ на специфическую стимуляцию антигенами *Mycobacterium tuberculosis* в тестах *in vitro* у ВИЧ-инфицированных пациентов, поскольку иммунодефицит, вызванный ВИЧ, обусловлен в первую очередь уменьшением относительного содержания и ослаблением функций CD4 Т-лимфоцитов. Целью работы было сравнение степени дифференцировки Т-лимфоцитов CD4 (Th) и CD8 (Tcyt) у больных туберкулезом легких и здоровых доноров на фоне ВИЧ-инфекции. В исследовании получены данные при обследовании 28 пациентов с туберкулезом органов дыхания без ВИЧ-инфекции (ТБ+ВИЧ–), 23 пациентов с ВИЧ-инфекцией (ТБ–ВИЧ+) и 30 пациентов с коинфекцией ВИЧ и туберкулез (ТБ+ВИЧ+). Группу сравнения составили 37 здоровых лиц (ТБ–ВИЧ–). Оценка абсолютного и относительного содержания основных субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови (на основе экспрессии маркеров CD27, CD28, CD45RA и CD62L) была проведена методом проточной цитометрии всем лицам, включенным в исследование (n = 118). Пациентам с туберкулезом легких (n = 58) был выполнен тест QuantiFERON-TB Gold In-Tube (Qiagen, QFT). Соотношение Th/Tcyt значимо не различалось в группах ТБ–ВИЧ– и ТБ+ВИЧ– (1,76 [1,51;2,30] против 1,86 [1,22;2,79], p = 0,960), в то время как для субпопуляции «терминально дифференцированных» Tcyt (Tcyt Eff, CD27–CD28–CD62L–CD45RA–) лимфоцитов и Th лимфоцитов эффекторной памяти (Th EM, CD27+CD28+CD62L–CD45RA–) были выявлены значимые различия при сравнении всех четырех исследуемых групп. Установлено разнонаправленное изменение абсолютного и относительного содержания этих популяций клеток, по сравнению со здоровыми донорами, по мере возникновения туберкулеза и ВИЧ-инфекции. Абсолютное содержание Tcyt Eff, по сравнению со здоровыми донорами (76,1 [20,7; 143,5]), увеличивается в 4 раза в группе ТБ+ВИЧ+

Адрес для переписки:

Васильева Елена Викторовна
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18,
ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.
Тел.: 8 921 931-10-21 (моб.).
E-mail: alenalenkina@gmail.com

Contacts:

Elena V. Vasileva
123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya str., 18,
N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology
and Microbiology.
Phone: +7 921 931-10-21 (mobile).
E-mail: alenalenkina@gmail.com

Библиографическое описание:

Васильева Е.В., Кудрявцев И.В., Максимов Г.В., Вербов В.Н.,
Серебрякова М.К., Ткачук А.П., Тотолян Арег А. Влияние ВИЧ-
инфекции и туберкулеза на степень дифференцировки Т-лимфоцитов
периферической крови // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2.
С. 151–161. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-151-161

Citation:

Vasileva E.V., Kudryavtsev I.V., Maximov G.V., Verbov V.N., Serebriakova M.K.,
Tkachuk A.P., Totolian Areg A. Impact of HIV infection and tuberculosis
on the peripheral blood T-cell differentiation // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 151–161.
doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-151-161

и в 2 раза в группах ТБ+ВИЧ– и ТБ-ВИЧ+. В то же время содержание Th EM увеличивается только к группе ТБ+ВИЧ–, по сравнению со здоровыми донорами. В группах пациентов с ВИЧ-инфекцией (ТБ–ВИЧ+ и ТБ+ВИЧ+) наблюдается снижение содержания этих клеток. Таким образом, в нашей работе показано, что популяции Th EM и Tcyt Eff могут потенциально рассматриваться как универсальные биомаркеры для двух социально значимых инфекционных заболеваний: туберкулеза и ВИЧ-инфекции. В следующих экспериментах необходимо провести валидацию полученных результатов и определить содержание Th EM и Tcyt Eff, специфичных к антигенам микобактерий.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, туберкулез, проточная цитометрия, субпопуляции T-хелперов, CD45RA, CD62L, QuantiFERON-TB Gold In-Tube.

IMPACT OF HIV INFECTION AND TUBERCULOSIS ON THE PERIPHERAL BLOOD T-CELL DIFFERENTIATION

Vasileva E.V.^a, Kudryavtsev I.V.^{b,c,f}, Maximov G.V.^c, Verbov V.N.^d, Serebriakova M.K.^b, Tkachuk A.P.^a, Totolian Areg A.^{d,e}

^a N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^c City Anti-Tuberculosis Dispensary, St. Petersburg, Russian Federation

^d St. Petersburg Pasteur Institute St. Petersburg, Russian Federation

^e Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^f Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Tuberculosis is the leading cause of death among HIV infected individuals. In this regard, an important task is the timely detection of tuberculosis in HIV infected patients. Previously, we have shown that the diagnostic value of in vitro test, QuantiFERON-TB Gold In-Tube is not decreased in patients with HIV infection against the background of tuberculosis. However, it remains unclear what kind of cell populations produce IFN γ in response to specific *Mycobacterium tuberculosis* antigens stimulation in vitro, because the immunodeficiency, caused by HIV, makes primarily for a decrease the abundance and attenuation functions of CD4 T-lymphocytes. The aim of this work was to compare the degree of differentiation of T-lymphocytes CD4 (Th) and CD8 (Tcyt) in patients with pulmonary tuberculosis and healthy donors against the background of HIV infection. The study data were obtained during the examination of 28 patients with pulmonary tuberculosis without HIV infection (HIV–TB+), 23 patients with HIV infection (TB–HIV+) and 30 patients coinfecting with HIV and tuberculosis (TB+HIV+). The comparison group consisted of 37 healthy individuals (TB–HIV–). Absolute and abundance (relative content) of major subpopulations of T-lymphocytes (based on the expression of CD27 marker, CD28, CD45RA and CD62L) in the peripheral blood for all patients included in the study (n = 118) were evaluated by flow cytometry approach. For patients with pulmonary tuberculosis (n = 58) QuantiFERON-TB Gold In Tube (Qiagen, QFT) test was performed. Th/Tcyt ratio was not significantly different among the groups of TB–HIV– and TB+HIV– (1.76 [1.51; 2.30] against 1.86 [1.22; 2.79], p = 0.960). At that time, the size of both subpopulations “terminally differentiated” Tcyt (Tcyt Eff, CD27–CD28–CD62L–CD45RA–) Th lymphocytes and effector memory lymphocytes (Th EM, CD27–CD28+CD62L–CD45RA–), was significantly different in all four study groups. Multidirectional changes of the absolute and abundance (relative content) in these cell populations in comparison with healthy donors for tuberculosis and HIV infection was noticed. Absolute content of Tcyt Eff, compared with healthy donors (76.1 [20.7; 143.5]), 4-fold increases in the group of HIV+TB+ and 2 times in groups TB+HIV– and TB–HIV+. Th EM content increases only at TB+HIV– group compare to healthy donors. In groups of patients with HIV infection (TB–HIV+ and TB+HIV+) a decrease in the content of these cells was observed. Thus, our work shows that the population of Th EM and Tcyt Eff could potentially be viewed as universal biomarkers for two socially significant infectious diseases: tuberculosis and HIV infection. In future experiments, it is necessary to validate these results to ensure specificity and determine the number of Th EM and Tcyt Eff specifically induced by Mtb antigens.

Key words: HIV infection, tuberculosis, flow cytometry, T-cell subsets, CD45RA, CD62L, QuantiFERON-TB Gold In-Tube.

Введение

В России туберкулез является ведущей причиной смерти больных ВИЧ-инфекцией. Так, согласно оценкам ВОЗ, 11% заболевших туберкулезом (ТБ) в 2015 г., были ВИЧ-положительными [22].

Дефицит лимфоцитов CD4, возникающий при инфекции ВИЧ, значительно увеличивает

восприимчивость к инфекции *Mycobacterium tuberculosis* [13]. В связи с этим актуальной задачей является своевременное выявление туберкулеза после постановки диагноза ВИЧ-инфекции, определение групп высокого риска заболевания туберкулезом, для последующего динамического наблюдения за ними фтизиатром.

Традиционно скрининг латентной туберкулезной инфекции (ЛТБИ) проводится с приме-

нением пробы Манту *in vivo*, при этом установленным фактом является нарастание частоты ложноотрицательных результатов у пациентов с глубокой иммуносупрессией. Ранее нами было показано, что диагностическая значимость *in vitro* теста QuantiFERON-TB Gold In-Tube не снижается у пациентов с туберкулезом на фоне ВИЧ-инфекции [1, 6]. Вместе с тем остается неясным, какие популяции клеток продуцируют IFN γ в ответ на специфическую стимуляцию антигенами *M. tuberculosis* в тестах *in vitro* у ВИЧ-инфицированных пациентов, поскольку иммунодефицит, вызванный ВИЧ, обусловлен в первую очередь уменьшением относительного содержания и ослаблением функций CD4 Т-лимфоцитов [18].

На сегодняшний день установлено, что по мере дифференцировки Т-лимфоцитов их функциональная активность, как правило, увеличивается [2, 5, 14]. Поэтому степень дифференцировки является важным показателем состояния Т-клеточного иммунитета. Этот показатель характеризует функциональную активность эффекторных Т-клеток и позволяет оценить тяжесть (активность) инфекционного процесса. Дифференцировка Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции [9, 17] и туберкулезе [12, 16] как моноинфекций изучена достаточно подробно, в то время как исследования синергичного взаимодействия ВИЧ и туберкулеза на дифференцировку клеток немногочисленны и нередко противоречивы.

В связи с этим целью нашего исследования было сравнить степень дифференцировки Т-лимфоцитов CD4 и CD8 у больных туберкулезом легких и здоровых доноров на фоне ВИЧ-инфекции.

Материалы и методы

За период с 2015–2016 гг. было проведено сравнительное проспективное исследование пациентов с туберкулезом органов дыхания, подтвержденным ростом *M. tuberculosis* на питательных средах, и ВИЧ-позитивных пациентов. Все лица, включенные в исследование (n = 118) были распределены на 4 группы: группу сравнения (I) составили здоровые лица (ТБ–ВИЧ–, n = 37), II — с туберкулезом без ВИЧ-инфекции (n = 28, ТБ+ВИЧ–), III — пациенты с ВИЧ-инфекцией (n = 23, ТБ–ВИЧ+), IV — с туберкулезом органов дыхания и ВИЧ-инфекцией (n = 30, ТБ+ВИЧ+). Демографические и клинические характеристики групп пациентов представлены в таблице 1.

Методом проточной цитометрии оценивалось абсолютное и относительное содержание основных субпопуляций Т-лимфоцитов (на основе экспрессии маркеров CD27, CD28, CD45RA и CD62L) в периферической крови. Пациентам с туберкулезом легких (n = 58) был выполнен тест QuantiFERON-TB Gold In-Tube (Qiagen, QFT).

Таблица 1. Клиническая и демографическая характеристика обследованных

Table 1. Clinical and demographic characteristics

		Группы			
		I ТБ–ВИЧ– ТВ–HIV– (n = 37)	II ТБ+ВИЧ– ТВ+HIV– (n = 28)	III ТБ–ВИЧ+ ТВ–HIV+ (n = 23)	IV ТБ+ВИЧ+ ТВ+HIV+ (n = 30)
Возраст Me [Q1;Q3] Age, Me [Q1;Q3]		28 [22;36]	46 [31;53]	31 [28;33]	35 [31;40]
Пол: женщины/мужчины, % Gender: men/women, %		35/65	29/71	40/60	37/66
Форма туберкулеза, % Form of tuberculosis, %	ИНФ/INF		57		53
	ДИСС/DISS	–	36	–	27
	ТБ ВГЛУ/TB ITLN		7		10
Вирусная нагрузка, копий/мл Viral load, copies/ml		–	–	16 832 [1836;47 266]	102 717 [1546;473 450]
CD4, абс. CD4, abs.	Me [Q1;Q3]	767 [693;855]	794 [545;1008]	357 [260;450]	247 [101;414]
	> 350	100%	96%	52%	37%
	200–350	0%	4%	30%	27%
	100–199	0%	0%	13%	13%
	< 100	0%	0%	4%	23%

Примечания: ИНФ — инфильтративный, ДИСС — диссеминированный, ТБ ВГЛУ — туберкулез внутригрудных лимфатических узлов.

Notes: INF — infiltrative, DISS — disseminated, TB ITLN — tuberculosis of intrathoracic lymphoid nodes.

Постановку теста QFT проводили строго согласно инструкции. Образцы цельной крови (1000 мкл), стабилизированной гепарином (50 ед/мл), культивировали при 37°C в течение 18–24 ч в присутствии антигенов *M. tuberculosis* (антигениндуцированная продукция, AG), в нулевой контрольной пробирке (отрицательный контроль, NIL) и в пробирке с митогеном (положительный контроль, MIT). После окончания культивирования отбирали плазму и определяли в ней количество IFN γ методом ИФА. Результаты теста считали положительными, если разность между антигениндуцированной и спонтанной продукцией IFN γ составляла более 0,35 МЕ/мл (14 пг/мл) и разность между митогениндуцированной и спонтанной продукцией IFN γ — более 0,5 МЕ/мл (20 пг/мл). Обработку полученных результатов проводили с применением программного обеспечения QFT 2.62, предоставленного производителем.

Подготовку проточного цитометра к работе, контроль качества входящих образцов периферической крови и ее подготовку к анализу при помощи методов проточной цитометрии проводили в соответствии с рекомендациями [7].

В основу применяемого нами подхода к анализу основных стадий созревания CD3⁺CD8⁺ и CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов периферической крови была положена оценка уровня экспрессии двух костимуляционных молекул — CD27 и CD28 [8]. Популяция CD27⁺CD28⁺ клеток получила название «ранних» или «не праймированных» клеток, которые не содержали в своих цитоплазматических гранулах перфорины и гранзимов, но были способны эффективно пролиферировать в ответ на внесение митогенов, а также экспрессировали CCR7 на своей мембране. Однако на основании наличия или отсутствия CD45RA цитотоксические Т-клетки с фенотипом CD27⁺CD28⁺ можно было разделить на две независимые группы — CD45RA-позитивные «наивные» клетки и CD45RA-негативные лимфоциты, прошедшие антиген-зависимую стадию созревания и способные специфически распознавать антигены. По мере снижения экспрессии CD27, но сохранения на поверхности CD28, CD3⁺CD8⁺ лимфоциты переходили на следующую стадию созревания, получившую название «промежуточной». Клетки этой популяции были способны проявлять цитотоксическую активность *ex vivo*, однако их цитолитический потенциал был существенно ниже такового у клеток с фенотипом CD27⁻CD28⁻. Поэтому CD27⁻CD28⁻ цитотоксические Т-клетки было предложено рассматривать в качестве «поздних» или зрелых эффекторов, содержащих в своих гранулах большое коли-

чество цитолитических молекул. В последствии даже эта популяция клеток оказалась весьма гетерогенной, поэтому для выявления эффекторных клеток было предложено применять CD45RA, экспрессия которого обнаруживается как на «наивных», так и на «терминально дифференцированных» CD3⁺CD8⁺. В ходе дальнейших исследований, среди популяции CD27⁺CD28⁺ цитотоксических Т-клеток были обнаружены лимфоциты, способные к специфическому распознаванию вируса гриппа А, некоторых этипотов цитомегаловируса и т.д. [21].

Таким образом, в настоящее время на основании экспрессии CD27, CD28, CD45RA и CD62L можно выделить следующие субпопуляции Т-лимфоцитов: фенотип «наивных» клеток можно описать как CD27⁺CD28⁺CD45RA⁺CD62L⁺, клеток центральной памяти (СМ) — CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁺, «транзиторных» или «переходных клеток памяти (ТМ) — CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁻, зрелых эффекторных клеток — CD27⁻CD28⁻ [3]. Следует отметить, что фенотип клеток эффекторной памяти (ЕМ) в случае цитотоксических Т-лимфоцитов будет CD27⁺CD28⁻, тогда как аналогичная популяция Т-хелперов будет определяться как CD27⁻CD28⁺ [11].

Для выделения популяции лимфоцитов в периферической крови применяли моноклональные антитела против CD45 человека, конъюгированные с флуоресцентным красителем Krome Orange (клон J.33, кат. № A96416). Т-лимфоциты периферической крови выявляли на основании наличия на клеточной мембране CD3, конъюгированного с APC (клон UCST1, кат. № IM2467), тогда как популяции цитотоксических Т-клеток и Т-хелперов, помимо CD3, несли на своей поверхности CD8 (конъюгированы с APC-Alexa Fluor 700, клон B9.11, кат. № A66332) и CD4 (конъюгированы с Pacific Blue, клон 13B8.2, кат. № A82789) соответственно. Для разделения CD3⁺CD8⁺ и CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов на отдельные популяции клеток, находившиеся на различных стадиях дифференцировки, применяли антитела против поверхностных CD62L-ECD (клон DREG56, кат. № IM2713U), CD28-PC5.5 (клон CD28.2, кат. № B24027), CD27-PC7 (клон 1A4CD27, кат. № A54823) и CD45RA-APC-Alexa Fluor 750 (клон 2H4LDH11LDB9 (2H4), кат. № A86050). Подбор оптимальных комбинаций антител, направленных на оценку уровня экспрессии исследованных антигенов, и конъюгированных с ними флуорохромов осуществляли в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [4, 15]. Тактика «гейтирования» приведена на рисунке 1.

Для удаления эритроцитов из образцов периферической крови использовали лизирующий раствор VersaLyse Lysing Solution (кат. № A09777), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800). Абсолютное содержание клеток исследованных популяций Т-лимфоцитов проводили с помощью реагента FlowCount™ (Beckman Coulter, США). Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенный лазерами с длинами волн испускания 405, 488 и 638 нм. Об-

работку полученных результатов проводили с использованием пакетов программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США).

Для статистической обработки полученных данных использовали пакеты программ MS Excel, Prizm 6.0 (GraphPad Software Inc.), Statistica 10.0. Данные представлены в виде медианы с указанием первого и третьего квартиля Me [Q1; Q3]. Для сравнения парных количественных значений использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

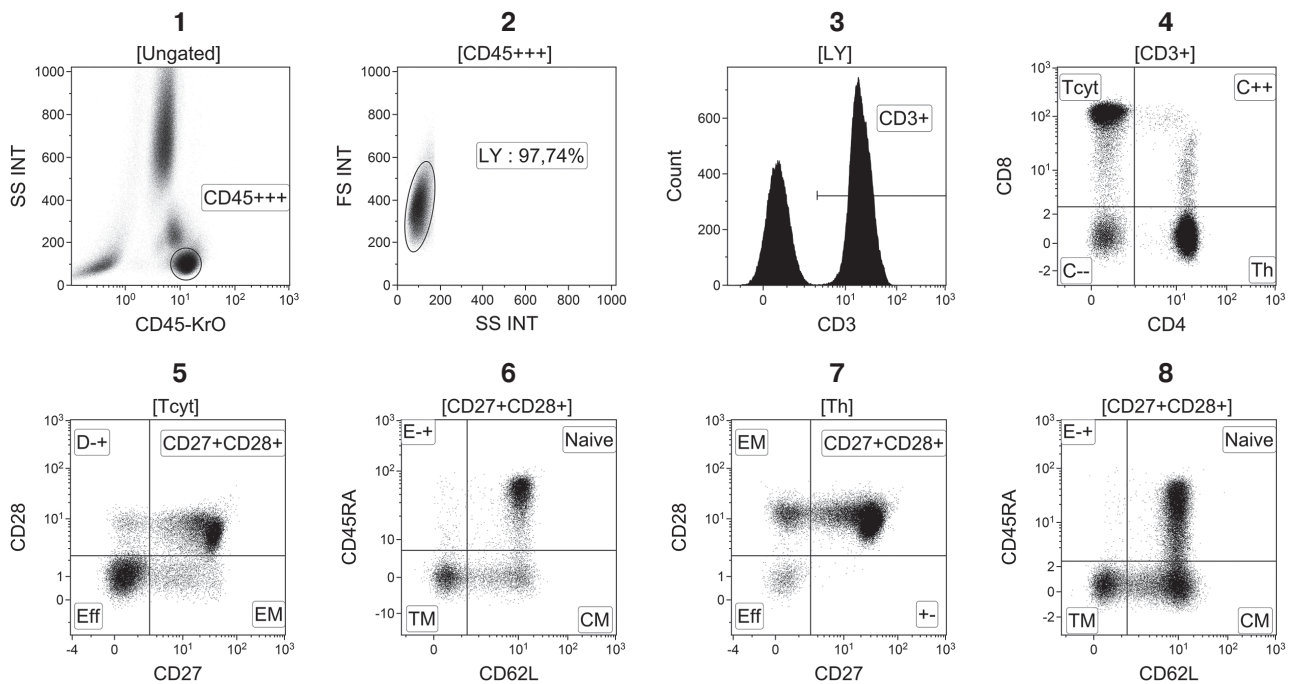


Рисунок 1. Выявление («тактика гейтирования») основных популяций Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови на основании экспрессии поверхностных антигенов CD27, CD28, CD45RA и CD62L

Figure 1. Identification («gating tactic») of the main populations of T-helper cells and cytotoxic T-lymphocytes in peripheral blood based on the expression of surface antigen CD27, CD28, CD45RA and CD62L

Примечания. Гистограмма 1 — распределение лейкоцитов периферической крови на основании бокового светорассеяния (SS INT) и плотности экспрессии CD45 (в области «CD45+++» находятся лимфоциты); гистограмма 2 — выделение лимфоцитов на основании параметров прямого (FS, относительный размер клеток) и бокового (SS, структура клеток) светорассеяния (в области «LY» располагаются лимфоциты, которые используются для дальнейшего анализа); гистограмма 3 — выявление популяции лимфоцитов на основании экспрессии CD3 (область «CD3+» содержит все Т-лимфоциты); гистограмма 4 — распределение Т-клеток по экспрессии CD4 (ось абсцисс) и CD8 (ось ординат), областях «Tcyt» и «Th» находятся цитотоксические Т-лимфоциты и Т-хелперы, которые на основании экспрессии CD27, CD28, CD45RA и CD62L при помощи гистограмм 5 и 6, а также 7 и 8 соответственно, разделяются на отдельные субпопуляции по уровню зрелости; гистограммы 5 и 7 — анализ экспрессии CD27 и CD28 цитотоксическими Т-лимфоцитами и Т-хелперами периферической крови, соответственно; гистограммы 6 и 8 — анализ экспрессии CD45RA и CD62L цитотоксическими Т-лимфоцитами и Т-хелперами периферической крови с фенотипом CD27⁺CD28⁺ соответственно.

Notes. Bar graph 1 — the distribution of leukocytes in peripheral blood based on the side light scattering (SS INT) and the density of expression of CD45 (in there are lymphocytes in the field of «CD45+++»); bar graph 2 — the determination of lymphocytes based on the parameter of direct (FS, the relative cell size) and side (SS, cell structure) light scattering (in the field «LY» there are lymphocytes which are used for further analysis); bar graph 3 — the identification of lymphocyte populations based on the expression of CD3 (the field of «CD3+» contains all the T-lymphocytes); bar graph 4 — the distribution of T-cells by CD4 expression (axis of abscissas) and CD8 (ordinate axis), and in the fields of «Tcyt» and «Th» there are cytotoxic T-lymphocytes and T helper cells, which based on the expression CD27, CD28, CD45RA and CD62L using bar graphs 5 and 6 as well as 7 and 8, respectively, are divided into subpopulations on the level of maturity; bar graphs 5 and 7 — analysis of expression of CD27 and CD28 by cytotoxic T-lymphocytes and T-helper cells in peripheral blood, respectively; bar graphs 6 and 8 — analysis of expression of CD62L and CD45RA by cytotoxic T-lymphocytes and T helper cells in peripheral blood with the phenotype of CD27⁺CD28⁺, respectively.

Таблица 2. Субпопуляции Т-лимфоцитов периферической крови, полученные при помощи поэтапного «гейтирования» на основании первоначальной оценки экспрессии CD27 и CD28 с последующей оценкой экспрессии CD45RA и CD62L на клетках с фенотипом CD27⁺CD28⁺, Me [Q1;Q3]

Table 2. Peripheral blood T-cell subsets obtained by stepwise «gating» based on the initial assessment of CD27 and CD28 expression, followed by evaluation of CD45RA and CD62L expression within CD27⁺CD28⁺ subset, Me [Q1;Q3]

Субпопуляции Т-клеток периферической крови Peripheral blood T-cell subpopulations	Группы											
	I ТБ-ВИЧ-/ТБ-HIV- (n = 37)		II ТБ+ВИЧ-/ТБ+HIV- (n = 28)		III ТБ-ВИЧ+/ТБ-HIV+ (n = 23)		IV ТБ+ВИЧ+/ТБ+HIV+ (n = 30)					
	% LY*	абс./abs.**	% LY	абс./abs.	% LY	абс./abs.	% LY	абс./abs.	% LY	абс./abs.	% LY	абс./abs.
Tcvt N	7,90 [5,74;10,33]	141 [107;179]	4,13 [2,59;7,96]	79 [44;128]	5,09 [2,96;6,38]	71 [48;85]	2,93 [1,43;4,13]	38 [15;78]				
Tcvt CM	2,35 [2,09;3,75]	46 [33;60]	1,83 [1,15;3,02]	30 [17;53]	2,18 [1,49;3,18]	28 [17;47]	2,92 [1,53;3,80]	36 [20;68]				
Tcvt TM	4,66 [3,40;6,49]	81 [56;111]	1,97 [1,50;2,88]	34 [27;47]	3,85 [3,07;7,51]	51 [38;88]	3,67 [2,12;4,72]	47 [32;75]				
Tcvt EM	2,43 [2,00;3,00]	44 [31;54]	2,57 [1,89;5,35]	51 [30;74]	16,75 [13,22;19,85]	229 [133;359]	19,97 [13,94;6,84]	312 [140;420]				
Tcvt Eff	4,18 [1,26;8,54]	76 [21;144]	7,49 [4,63;15,27]	136 [74;259]	13,72 [9,96;19,34]	197 [155;235]	22,93 [14,53;34,24]	295 [177;540]				
Tcvt	25,65 [21,19;29,62]	415 [336;498]	25,46 [18,98;29,54]	407 [317;601]	45,09 [38,47;50]	576 [508;811]	60,81 [46,07;69,79]	889 [524;1146]				
Th N	12,68 [8,20;17,28]	223 [155;323]	15,37 [7,96;21,02]	249 [133;371]	10,09 [5,44;12,17]	130 [74;188]	4,29 [2,44;6,99]	63 [16;122]				
Th CM	17,28 [15,61;20,70]	292 [256;377]	15,04 [12,15;19,49]	291 [182;344]	7,77 [5,57;12,62]	108 [73;165]	5,16 [3,53;9,84]	93 [35;134]				
Th TM	7,19 [5,86;9,20]	123 [97;167]	4,15 [2,66;8,14]	67 [51;144]	3,37 [1,61;5,50]	40 [27;66]	2,29 [1,51;3,34]	35 [12;49]				
Th EM	3,38 [2,58;4,20]	55 [38;73]	4,17 [3,65;4,98]	77 [49;100]	1,62 [1,13;2,46]	23 [15;35]	3,13 [1,55;4,61]	37 [23;57]				
Th Eff	0,23 [0,03;1,44]	4 [1;29]	0,58 [0,37;3,11]	10 [6;49]	1,24 [0,14;3,75]	14 [2;52]	0,51 [0,15;2,13]	9 [2;28]				
Th	45,42 [40,49;49,74]	767 [693;855]	44,82 [37,93;53,74]	794 [545;1008]	29,30 [18,98;36,06]	357 [260;450]	18,73 [12,67;24,53]	247 [101;414]				
Th/Tcvt	1,76 [1,51;2,30]		1,86 [1,22;2,79]		0,58 [0,39;0,91]		0,29 [0,18;0,56]					

Примечания. * — процент от лимфоцитов; ** — абсолютное значение.
Notes: * — percentage of lymphocytes; ** — absolute value.

Результаты

На первом этапе в тесте QuantiFERON-TB Gold In-Tube мы определяли уровень $IFN\gamma_{AG-NIL}$ у пациентов с туберкулезом легких (II и IV группа). Не было выявлено значимых различий ($p = 0,643$) между частотой положительных результатов КФТ в группе ТБ+ВИЧ+ (70,0 (95% ДИ: 50,6–85,3), медиана 1,36 МЕ/мл) и ТБ+ВИЧ– (64,3 (95% CI 44,1–81,4), медиана 0,92 МЕ/мл). Графическое представление данных приведено на рисунке 2.

Далее, в соответствии с использованием гистограмм 5–8 (рис. 1), все $CD3^+CD8^+$ и $CD3^+CD4^+$ лимфоциты были разделены на следующие субпопуляции: «наивные» клетки («naive») с фенотипом $CD27^+CD28^+CD45RA^+CD62L^+$, клетки центральной памяти (СМ) — $CD27^+CD28^+CD45RA^+CD62L^-$, «переходные» клетки памяти (ТМ) — $CD27^+CD28^+CD45RA^-CD62L^-$, клетки эффекторной памяти (ЕМ) — фенотип $CD27^+CD28^-$ для цитотоксических Т-клеток и фенотип $CD27^-CD28^+$ для Т-хелперов, а также зрелые эффекторные клетки (Т Eff) — $CD27^-CD28^-$ для обеих популяций Т-лимфоцитов. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Ввиду того, что большой интерес в настоящее время представляет поиск новых информативных биомаркеров туберкулеза и ВИЧ-инфекции, мы сформулировали 4 гипотезы (рис. 3А), для подтверждения каждой из которых оценили возможности изученных субпопуляций. Полученные различия представлены на рисунке 3Б.

Далее, с целью поиска универсальных биомаркеров, способных ответить на все четыре обозначенных нами вопроса, мы присваивали «1» в случае, если уровень значимости при сравнении двух независимых групп с использованием критерия Манна–Уитни составлял менее 0,05; в противном случае — «0». На рисунке 3В в последнем столбце приведена сумма результатов по всем четырем гипотезам исследования.

Важно отметить, что иммунорегуляторный индекс (Th/Tcut), который рассчитывается как соотношение Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток ($CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$) значимо не различался в группах ТБ–ВИЧ– (I) и ТБ+ВИЧ– (II) (1,76 [1,51;2,30] против 1,86 [1,22;2,79], $p = 0,960$).

Значимые различия при сравнении всех четырех групп (IV vs II, II vs I, III vs I, IV vs III) были получены для субпопуляции $CD3^+CD8^+$ «терминально дифференцированных» (Tcut Eff, $CD27^-CD28^-CD62L^-CD45RA^-$) лимфоцитов и $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов эффекторной памяти (Th EM, $CD27^-CD28^+CD62L^-CD45RA^-$). Графическое представление данных приведено на рисунке 4.

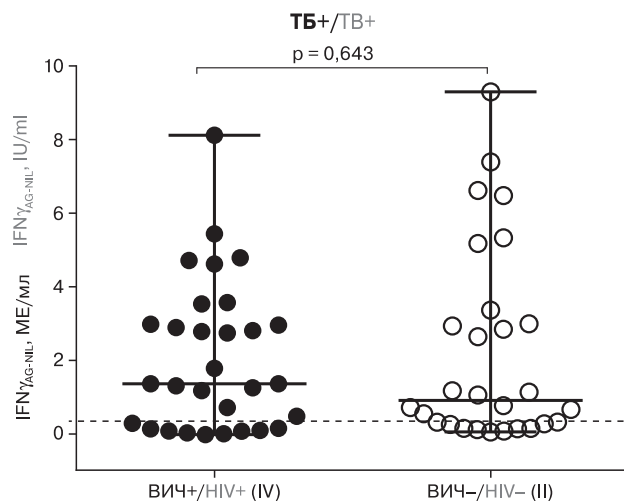


Рисунок 2. Уровень $IFN\gamma_{AG-NIL}$ в группах ТБ+ВИЧ+ (IV) и ТБ+ВИЧ– (II)

Figure 2. Level $IFN\gamma_{AG-NIL}$ in TB+HIV+ (IV) groups and TB+HIV– (II)

Примечания:

- горизонтальной линией указана медиана, диапазонами показана максимальное/минимальное значение;
- пунктирной линией обозначено пороговое значение производителя тест-системы QuantiFERON-TB Gold In-Tube (0,35 МЕ/мл);
- значимость различий между группами рассчитывалась с применением критерия Манна–Уитни.

Notes:

- the horizontal line shows the median, ranges show the maximum/minimum value;
- the dotted line represents the threshold limit value of test system producer QuantiFERON-TB Gold In-Tube (0,35 IU/ml);
- the significance of differences between groups was calculated using the Mann–Whitney test.

Установлено разнонаправленное изменение абсолютного и относительного содержания этих популяций клеток, по сравнению со здоровыми донорами, по мере возникновения туберкулеза и ВИЧ-инфекции. Абсолютное содержание «терминально дифференцированных» $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов, по сравнению со здоровыми донорами (76,1 [20,7; 143,5]), увеличивается в 4 раза в группе ТБ+ВИЧ+ (295,2 [176,7; 540,2]), и в 2 раза в группах ТБ+ВИЧ– (136,2 [73,5; 259,2]) и ТБ–ВИЧ+ (197,3 [155,5; 235,4]).

В то время, как содержание $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов эффекторной памяти увеличивается только к группе ТБ+ВИЧ– (76,6 [49,1;99,9]), по сравнению со здоровыми донорами (55,0 [37,8;72,9]), в группах пациентов с ВИЧ-инфекцией (ТБ–ВИЧ+ и ТБ+ВИЧ+) наблюдается снижение содержания $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов эффекторной памяти (22,6 [15,4;34,8] и 37,2 [23,3;56,5] соответственно).

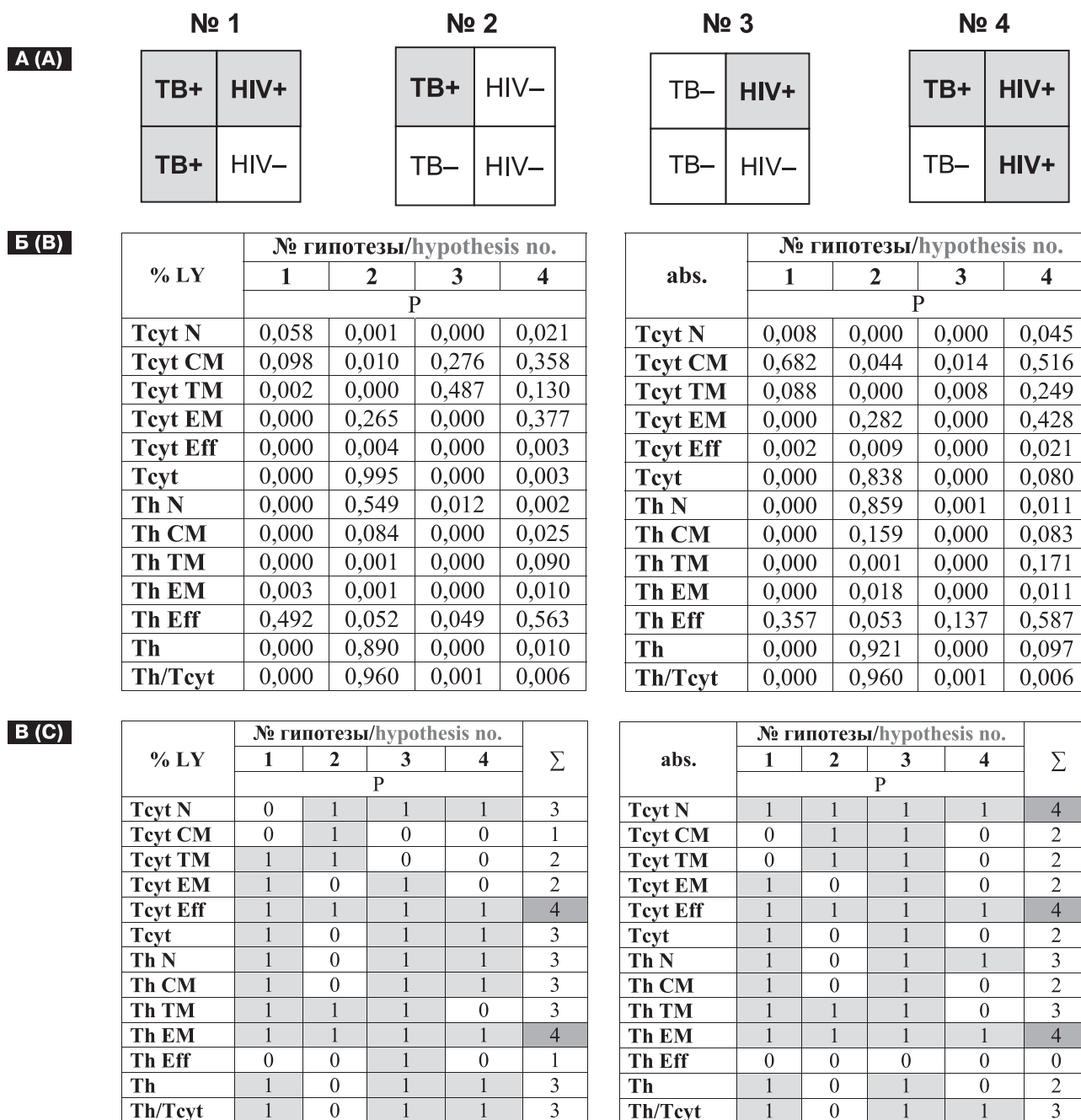


Рисунок 3. Результаты сравнения исследуемых групп между собой в соответствии с выдвинутыми гипотезами

Figure 3. The results of a comparison study groups among themselves in accordance with the hypothesis

Примечания.

А) Гипотезы исследования: 1 гипотеза — ТБ+ВИЧ+ vs ТБ+ВИЧ-; 2 гипотеза — ТБ+ВИЧ- vs ТБ-ВИЧ-; 3 гипотеза — ТБ-ВИЧ+ vs ТБ-ВИЧ-; 4 гипотеза — ТБ+ВИЧ+ vs ТБ-ВИЧ+.

Б) Уровень значимости отличий между группами, согласно выдвинутым гипотезам, с применением критерия Манна-Уитни. В) «1» присваивалась в случае, если уровень значимости составлял менее 0,05; в противном случае — «0». В последнем столбце приведена сумма результатов по всем четырем гипотезам исследования. % LY — процент от лимфоцитов, abs. — абсолютное значение.

Notes.

A) Research hypotheses: 1 hypothesis — TB+HIV+ vs TB+HIV-; 2 hypothesis — TB+HIV- vs TB-HIV-; 3 hypothesis — TB-HIV+ vs TB-HIV-; 4 hypothesis — TB+HIV+ vs TB-HIV+.

B) The level of significance of differences among groups, according to hypothesis using the Mann-Whitney test.

C) «1» is assigned if the level of significance was less than 0.05; otherwise — «0». The last column shows the sum of results for all four hypotheses in the study. % LY — percentage of lymphocyte, abs. — absolute value.

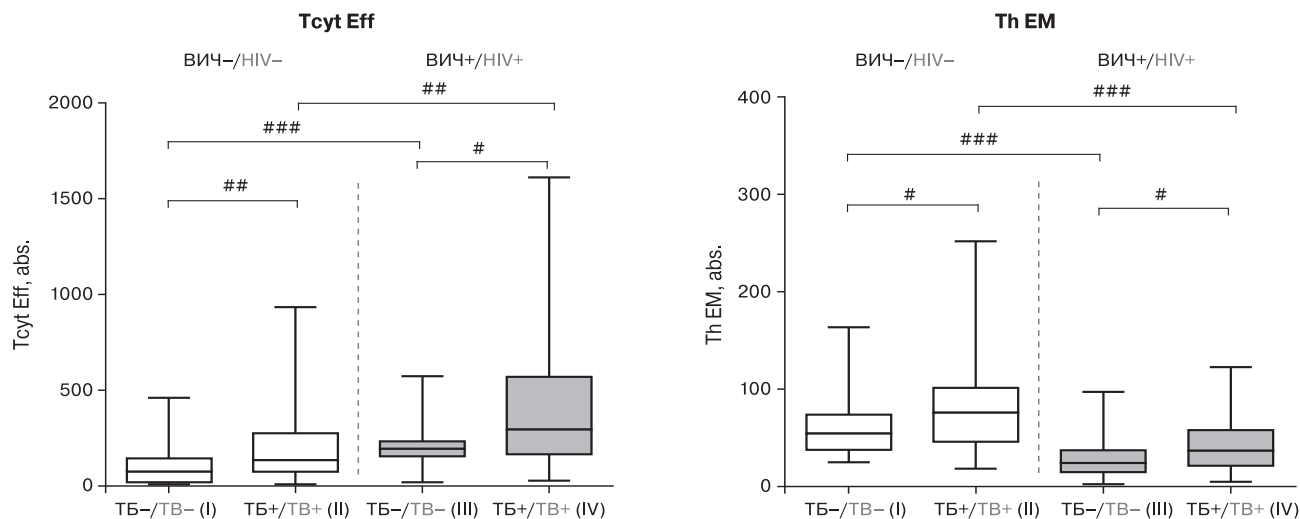


Рисунок 4. Абсолютное содержание Tcyl Eff и Th EM в периферической крови

Figure 4. The absolute content Tcyl Eff and Th EM in the peripheral blood

Примечания.

1. Горизонтальной линией указана медиана, диапазонами показана максимальное/минимальное значение.
2. Отличия между группами рассчитаны с применением критерия Манна–Уитни и обозначены следующими символами: ### — $p < 0,0005$; ## — $p < 0,005$; # — $p < 0,05$.

Notes.

1. The horizontal line shows the median, ranges show the maximum/minimum value.
2. The differences between groups were calculated using the Mann–Whitney test and were indicated by the following symbols: ### — $p < 0,0005$; ## — $p < 0,005$; # — $p < 0,05$.

Обсуждение

Истощение пула «наивных» цитотоксических Т-клеток и Т-хелперов, обладающих уникальными распознающими рецепторами, может рассматриваться в качестве негативного явления у больных разных групп, так как существенно снижает эффективность распознавания и формирования специфического иммунного ответа на новые антигены, поступающие в организм больного. Более того, на фоне инфицирования ВИЧ-ТБ этот процесс приобретает более выраженный характер по сравнению с моноинфекциями. При этом в организме больных начинают доминировать клетки более зрелых фенотипов — EM и эффекторныe клетки, которые, как показывает анализ данных литературы, обладают весьма узким спектром специфичностей Т-клеточных рецепторов [10]. Следует отметить, что присутствие в циркуляции высокого числа $CD27^+CD8^+$ лимфоцитов может рассматриваться в качестве благоприятного признака, так как именно эта когорта пациентов на фоне применения АРВТ показывает максимальные приросты по относительному и абсолютному содержанию Т-хелперов в периферической крови [19].

Принимая во внимание, что при ВИЧ-инфекции имеет место непрерывная репликация вируса, а вирусные антигены не элими-

нируются из организма, то наличие большого числа цитотоксических Т-клеток, находящихся на терминальных стадиях дифференцировки, представляется вполне логичным. С другой стороны, увеличение уровня клеток эффекторной памяти свидетельствует о незавершенности иммунного ответа, так как в норме эти клетки являются переходной стадией созревания $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов, которые еще не способны проявлять эффекторные функции (в первую очередь, запуск апоптоза) при контакте с клетками-мишенями.

Таким образом, гетерогенность иммунного ответа у пациентов с сочетанной патологией ВИЧ и ТБ, по сравнению с пациентами без ВИЧ-инфекции, диктует необходимость создания эффективного алгоритма ранней диагностики туберкулеза у лиц, живущих с ВИЧ.

В нашей работе показано, что $CD3^+CD4^+$ лимфоциты эффекторной памяти и «терминально дифференцированные» $CD3^+CD8^+$ лимфоциты могут потенциально рассматриваться, как универсальные биомаркеры для двух социально значимых инфекционных заболеваний: туберкулеза и ВИЧ-инфекции.

В следующих экспериментах необходимо провести валидацию полученных результатов и определить содержание Th EM и Tcyl Eff, специфичных к антигенам микобактерий.

Список литературы/References

1. Васильева Е.В., Паукер М.Н., Грицай И.Ю., Прибыток Е.В., Вербов В.Н., Тотолян Арег А. Возможности и ограничения теста QuantiFERON-TB-Gold In-Tube в лабораторной диагностике туберкулеза легких // Туберкулез и болезни легких. 2013. № 2. С. 13–17. [Vasilyeva E.V., Pauker M.N., Gritsai I.Yu., Pribytok E.V., Verbov V.N., Totolian Areg A. QuantiFERON-TB GOLD In-Tube test in the laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis: possibilities and limitations. *Tuberkulez i bolezni legkih = Tuberculosis and Lung diseases*, 2013, no. 2, pp. 13–17. (In Russ.)]
2. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 947–964. [Kudryavtsev I.V. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, vol. 8 (17), no. 4, pp. 947–964. (In Russ.)]
3. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 6. С. 525–538. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinec I.I., Savchenko A.A., Serebryakova M.K. Multicolor flow cytometric analysis of cytotoxic T cell subsets. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 6, pp. 525–538. doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-525-538 (In Russ.)]
4. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 1. С. 19–26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 1, pp. 19–26. doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26 (In Russ.)]
5. Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Шуплетова В.В., Литвинова Л.С. Фенотипическая характеристика и функциональные особенности Т- и В-клеток иммунной памяти // Цитология. 2015. Т. 57, № 5. С. 311–318. [Sokhonenich N.A., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Shupletsova V.V., Litvinova L.S. Phenotypic characterization and functional features of memory T- and B-cells. *Tsitologiya = Cytology*, 2015, vol. 57, no. 5, pp. 311–318. (In Russ.)]
6. Старшинова А.А., Пантелеев А.М., Васильева Е.В., Манина В.В., Павлова М.В., Сапожникова Н.В. Применение современных иммунологических методов в диагностике туберкулеза у пациентов с ВИЧ-инфекцией // Журнал инфектологии. 2015. Т. 3, № 3. С. 126–130. [Starshinova A.A., Panteleev A.M., Vasil'eva E.V., Manina V.V., Pavlova M.V., Sapozhnikova N.V. Application of modern immunological methods in the diagnosis of tuberculosis in HIV-infected patients. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2015, vol. 7, no. 3, pp. 126–130. (In Russ.)]
7. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 3. С. 255–268. [Khaydukov S.V., Baidun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Methods. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 3, pp. 255–268. doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268 (In Russ.)]
8. Appay V., Dunbar P.R., Callan M., Klenerman P., Gillespie G.M., Papagno L., Ogg G.S., King A., Lechner F., Spina C.A., Little S., Havlir D.V., Richman D.D., Gruener N., Pape G., Waters A., Easterbrook P., Salio M., Cerundolo V., McMichael A.J., Rowland-Jones S.L. Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.*, 2002, vol. 8, no. 4, pp. 379–385. doi: 10.1038/nm0402-379
9. Brenchley J.M., Karandikar N.J., Betts M.R., Ambrozak D.R., Hill B.J., Crotty L.E., Casazza J.P., Kuruppu J., Migueles S.A., Connors M., Roederer M., Douek D.C., Koup R.A. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood*, 2003, vol. 101, no. 7, pp. 2711–2720. doi: 10.1182/blood-2002-07-2103
10. Cossarizza A., Poccia F., Agrati C., D'Offizi G., Bugarini R., Pinti M., Borghi V., Mussini C., Esposito R., Ippolito G., Narciso P. Highly active antiretroviral therapy restores CD4⁺ Vbeta T-cell repertoire in patients with primary acute HIV infection but not in treatment-naive HIV⁺ patients with severe chronic infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2004, vol. 35, no. 3, pp. 213–222.
11. Curriu M., Carrillo J., Massanella M., Rigau J., Alegre J., Puig J., Garcia-Quintana A.M., Castro-Marrero J., Negro E., Clotet B., Cabrera C., Blanco J. Screening NK-, B- and T-cell phenotype and function in patients suffering from Chronic Fatigue Syndrome. *J. Transl. Med.*, 2013, no. 11: 68. doi: 10.1186/1479-5876-11-68
12. Kapina M.A., Shepelkova G.S., Mischenko V.V., Sayles P., Bogacheva P., Winslow G., Apt A.S., Lyadova I.V. CD27^{low} CD4 T lymphocytes that accumulate in the mouse lungs during mycobacterial infection differentiate from CD27^{high} precursors in situ, produce IFN-gamma, and protect the host against tuberculosis infection. *J. Immunol.*, 2007, vol. 178, no. 2, pp. 976–985. doi: 10.4049/jimmunol.178.2.976
13. Kwan C.K., Ernst J.D. HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2011, vol. 24, no. 2, pp. 351–376. doi: 10.1128/CMR.00042-10
14. Mahnke Y.D., Brodie T.M., Sallusto F., Roederer M., Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.*, 2013, vol. 43, no. 11, pp. 2797–2809. doi: 10.1002/eji.201343751
15. Mahnke Y.D., Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin. Lab. Med.*, 2007, vol. 27, pp. 469–485. doi: 10.1016/j.cll.2007.05.002
16. Nikitina I.Y., Kondratuk N.A., Kosmiadi G.A., Amansahedov R.B., Vasilyeva I.A., Ganusov V.V., Lyadova I.V. Mtb-specific CD27^{low} CD4 T cells as markers of lung tissue destruction during pulmonary tuberculosis in humans. *PLoS One*, 2012, vol. 7, iss. 8: e43733. doi: 10.1371/journal.pone.0043733
17. Papagno L., Spina C.A., Marchant A., Salio M., Rufer N., Little S., Dong T., Chesney G., Waters A., Easterbrook P., Dunbar P.R., Shepherd D., Cerundolo V., Emery V., Griffiths P., Conlon C., McMichael A.J., Richman D.D., Rowland-Jones S.L., Appay V. Immune activation and CD8⁺ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol.*, 2004, vol. 2, iss. 2: e20. doi: 10.1371/journal.pbio.0020020
18. Penn-Nicholson A., Nemes E., Hanekom W.A., Hatherill M., Scriba T.J. Mycobacterium tuberculosis-specific CD4 T cells are the principal source of IFN-γ in QuantiFERON assays in healthy persons. *Tuberculosis (Edinb)*, 2015, vol. 95, no. 3, pp. 350–351. doi: 10.1016/j.tube.2015.03.002

19. Seu L., Ortiz G.M., Epling L., Sinclair E., Swainson L.A., Bajpai U.D., Huang Y., Deeks S.G., Hunt P.W., Martin J.N., McCune J.M. Higher CD27⁺CD8⁺ T cells percentages during suppressive antiretroviral therapy predict greater subsequent CD4⁺ T cell recovery in treated HIV infection. *PLoS One*, 2013, vol. 8, iss. 12: e84091. doi: 10.1371/journal.pone.0084091
20. Siddiqui S., Sarro Y., Diarra B., Diallo H., Guindo O., Dabita D., Tall M., Hammond A., Kassambara H., Goita D., Demebele P., Traore B., Hengel R., Nason M., Warfield J., Washington J., Polis M., Diallo S., Dao S., Koita O., Lane H.C., Catalfamo M., Tounkara A. Tuberculosis specific responses following therapy for TB: impact of HIV co-infection. *Clin. Immunol.*, 2015, vol. 159, iss. 1, pp. 1–12. doi: 10.1016/j.clim.2015.04.002
21. Van Aalderen M.C., Remmerswaal E.B., Ten Berge I.J., Van Lier R.A. Blood and beyond: properties of circulating and tissue-resident human virus-specific $\alpha\beta$ CD8(+) T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2014, vol. 44, iss. 4, pp. 934–944. doi: 10.1002/eji.201344269
22. WHO. Global Tuberculosis Control: Epidemiology, Strategy, Financing. *WHO report*, 2016.

Авторы:

Васильева Е.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории трансляционной биомедицины ФГБУ ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Кудрявцев И.В., к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; старший научный сотрудник ФГАОУ ВПО Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия; доцент кафедры иммунологии, ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Максимов Г.В., к.м.н., зав. отделением № 4 для больных туберкулезом легких, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, хроническими вирусными гепатитами ГБУЗ Городской противотуберкулезный диспансер, Санкт-Петербург, Россия;

Вербов В.Н., к.х.н., начальник отдела новых технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Серебрякова М.К., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Ткачук А.П., к.б.н., зав. лабораторией трансляционной биомедицины ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Тотolian Арег А., академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Vasileva E.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Translational Biomedicine, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia; Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia; Pavlov First State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Maximov G.V., PhD (Medicine), Head of the Department No. 4, City Anti-Tuberculosis Dispensary, St. Petersburg, Russian Federation;

Verbov V.N., PhD (Chemistry), Head of the New Technologies Department, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Serebriakova M.K., Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Tkachuk A.P., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Translational Biomedicine, N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Totolian Areg A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Immunology Department, Pavlov First State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.