

ДИНАМИКА IL-2 У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ С УЧЕТОМ ЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

В.С. Елисеева¹, С.П. Кругляк¹, Л.Ф. Скляр¹, Е.В. Маркелова², Н.А. Боровская²

¹ ГБУЗ ККБ № 2 Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, г. Владивосток, Россия

² ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток, Россия

Резюме. Интерлейкин-2 (IL-2) является одним из важнейших цитокинов, участвующих в процессах регуляции врожденного и адаптивного иммунитета. Его основная иммунологическая функция состоит в регуляции специфического (антигензависимого) иммунного ответа путем стимуляции пролиферации и дифференцировки иммунных клеток, участвующих в его реализации, в том числе Т-лимфоцитов. Дисфункция клеточного звена иммунитета является основным патогенетическим механизмом развития ВИЧ-инфекции. Цель работы: выявление закономерностей изменения уровней IL-2 у ВИЧ-инфицированных пациентов на фоне сформированной лекарственной резистентности на поздних стадиях инфекции. В исследование включены 83 пациента с ВИЧ-инфекцией, получающих высокоактивную антиретровирусную терапию; контрольную группу составили 20 здоровых доноров крови. У всех пациентов проведено исследование эффективности антиретровирусной терапии, включающее оценку вирусной нагрузки ВИЧ и уровней CD4⁺ Т-лимфоцитов. У пациентов с неэффективной антиретровирусной терапией дополнительно проведено исследование лекарственной устойчивости ВИЧ методом секвенирования по Сенгеру. По результатам секвенирования генома ВИЧ-инфицированные пациенты с неэффективной антиретровирусной терапией были разделены на две подгруппы — с выявленной лекарственной резистентностью (58,5%) и отсутствием детектируемых мутаций резистентности в геноме (41,5%). У всех лиц, включенных в исследование, измерены уровни IL-2 методом иммуноферментного анализа. При сравнении уровней IL-2 между группами пациентов с сохраняющейся вирусной нагрузкой на фоне антиретровирусной терапии (вирусная нагрузка выявляется) с лекарственной устойчивостью и без нее были получены достоверные различия ($1,75 \pm 0,26$ пг/мл против $1,95 \pm 0,29$ пг/мл соответственно, $p \leq 0,05$, U-критерий). Содержание IL-2 статистически значимо ниже в группе пациентов, не достигших успеха на фоне антиретровирусной терапии, чем в группе пациентов с эффективностью лечения ($1,83 \pm 0,29$ пг/мл против $4,89 \pm 0,55$ пг/мл соответственно, $p < 0,001$, U-критерий). Таким образом, показано, что у пациентов с выявленной лекарственной резистентностью на фоне прогрессирования ВИЧ-инфекции происходит снижение уровней IL-2. Увеличение его уровней у пациентов с ВИЧ-инфекцией, достигших вирусологического и иммунологического успеха проводимой терапии связано с восстановлением числа продуцирующих данный цитокин иммунных клеток (Т-лимфоцитов). Мы предполагаем, что значительное снижение уровней IL-2 вносит дополнительный вклад в нарушение процессов пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток при ВИЧ-инфекции, что приобретает большое значение при формировании лекарственной устойчивости ВИЧ в условиях постоянно сохраняющейся вирусной репликации.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, лекарственная резистентность, цитокины, IL-2, ВААРТ, мутации.

Адрес для переписки:

Елисеева Виктория Сергеевна
690011, Россия, г. Владивосток, ул. Борисенко, 50, ГБУЗ Краевая клиническая больница № 2, Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями.
Тел.: 8 (423) 263-62-24 (служебн.).
E-mail: vic-eliseeva@mail.ru

Contacts:

Viktoria S. Eliseeva
690011, Russian Federation, Vladivostok, Borisenko str., 50, Regional Clinical Hospital No. 2, Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases.
Phone: +7 (423) 263-62-24 (office).
E-mail: vic-eliseeva@mail.ru

Библиографическое описание:

Елисеева В.С., Кругляк С.П., Скляр Л.Ф., Маркелова Е.В., Боровская Н.А. Динамика IL-2 у пациентов с ВИЧ-инфекцией с учетом лекарственной резистентности // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2. С. 187–194.
doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-187-194

Citation:

Eliseeva V.S., Kruglak S.P., Sklar L.F., Markelova E.V., Borovskaya N.A. Dynamics of IL-2 plasma levels in HIV patients with considering drugs resistance // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 187–194. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-187-194

DYNAMICS OF IL-2 PLASMA LEVELS IN HIV PATIENTS WITH CONSIDERING DRUGS RESISTANCEEliseeva V.S.^a, Kruglak S.P.^a, Sklar L.F.^a, Markelova E.V.^b, Borovskaya N.A.^b^a Center for prevention and control of AIDS and infectious diseases, Vladivostok, Russian Federation^b Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Interleukin-2 (IL-2) is one of the most important cytokines involved in the regulation of innate and adaptive immunity. Its main immunological function is to regulate a specific (antigen-dependent) immune response by stimulating proliferation and differentiation of immune cells involved in its realization, including T-lymphocytes. Dysfunction of cellular immunity is the main pathogenetic mechanism for the development of HIV infection. Objective: to identify patterns of IL-2 levels change in HIV-infected patients on the background of drug resistance at the later stages of infection. The study included 83 patients with HIV infection receiving highly active antiretroviral therapy; the control group consisted of 20 healthy blood donors. All patients underwent a study of the effectiveness of antiretroviral therapy, including an assessment of HIV viral load and CD4⁺ T lymphocyte levels. In patients with ineffective antiretroviral therapy, a study of drug resistance to HIV by Sanger sequencing was additionally conducted. According to the results of genome sequencing, HIV-infected patients with ineffective antiretroviral therapy were divided into two subgroups — with revealed drug resistance (58.5%) and absence of detectable resistance mutations in the genome (41.5%). Levels of IL-2 were measured in all persons included in the study by the method of enzyme immunoassay. When comparing the levels of IL-2 between groups of patients with continuing viral load on the background of antiretroviral therapy (viral load is detected) with drug resistance and without it, significant differences were obtained (1.75 ± 0.26 pg/ml versus 1.95 ± 0.29 pg/ml, $p \leq 0.05$, U-criterion, respectively). The content of IL-2 is statistically significantly lower in the group of patients who did not succeed with antiretroviral therapy than in the group of patients with treatment efficacy (1.83 ± 0.29 pg/ml versus 4.89 ± 0.55 pg/ml, respectively, $p < 0.001$, U-criterion). Thus, it is shown that in patients with revealed drug resistance against the background of progression of HIV infection there is a decrease in levels of IL-2. The increase in its levels in patients with HIV infection who have reached virological and immunological success of therapy is due to the reduction in the number of the cytokine-producing immune cells (T-lymphocytes). We assume that a significant decrease in the levels of IL-2 makes an additional contribution to the disruption of the processes of proliferation and differentiation of immunocompetent cells in HIV infection, which is of great importance in the formation of drug resistance of HIV in conditions of constant viral replication.

Key words: HIV infection, drugs resistance, cytokines, IL-2, HAART, mutations.

Введение

В настоящее время ВИЧ-инфекция стала управляемым заболеванием, превратившись из быстротекущего процесса в длительную хронически протекающую болезнь. Благодаря появлению новых фармакологических групп антиретровирусных препаратов и внедрению концепции высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) появилась возможность добиваться длительной супрессии репликации вируса, тем самым предотвращая дальнейшее прогрессирование инфекции [8]. Однако внедрение ВААРТ породило ряд проблем: токсичность препаратов в комбинированных схемах, необходимость их пожизненного приема, соблюдение высокой степени приверженности лечению, формирование резистентности вируса. При этом возникновение мутантных штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам (АРВП), является одной из основных причин неэффективности ВААРТ [4].

Учитывая современные тенденции развития мониторинга за течением ВИЧ-инфекции и постоянно увеличивающееся количество пациентов с большой давностью заболевания, особое внимание уделяется наблюдению за болезнью на поздних стадиях. Это позволяет устанавливать факторы, в том числе со стороны иммунной системы, влияющие на лечебно-диагностический процесс [1].

Несмотря на многочисленные исследования, механизмы повреждения иммунной системы при ВИЧ-инфекции по-прежнему до конца не ясны. Это относится и к случаям вирусологического и иммунологического неуспеха, поскольку формирование в организме больного вирусов с мутациями в геноме может иметь существенное значение при развитии иммунного ответа [6]. Связано это с тем, что изменения биологических свойств вируса, таких как фитнес, значимы для адаптации вирусной популяции и позволяют нейтрализовать противовирусную активность организма.

Феномен масштабных изменений в синтезе цитокинов иммунокомпетентными клетками при ВИЧ-инфекции получил название «цитокиновый шторм» [3]. Этот термин отражает ответ иммунной системы на внедрение и дальнейшую репликацию ВИЧ-1 и по сути своей описывает высокую степень рассогласованности в цитокиновой регуляции, в которую вмешивается инфекционный агент. Проникновение вируса в лимфоидную ткань вызывает иммунный ответ, включающий в себя в том числе синтез и продукцию цитокинов. Локальное поддержание значительных концентраций некоторых из них, а также снижение концентраций ряда других цитокинов, активирует экспрессию ВИЧ, находящегося в интегрированном состоянии в инфицированных клетках. Оппортунистические инфекции способствуют прогрессированию за-

болевания за счет дополнительной стимуляции иммунитета и влияния тем самым на синтез цитокинов. Комплекс цитокиновых эффектов даже при относительной иммунологической стабильности способствует поддержанию постоянного уровня экспрессии вируса, в том числе и на бессимптомной стадии инфекции [16].

Интерлейкин-2 (IL-2) является хорошо изученным цитокином-гемопоэтином, участвующим в процессах регуляции врожденного и адаптивного иммунитета. Основными продуцентами эндогенного IL-2 являются активированные Th1 CD4⁺-лимфоциты (90%) и CD8⁺-лимфоциты (10%), а также Т-клетки некоторых других субпопуляций лимфоцитов [14]. Основная иммунологическая функция IL-2 состоит в регуляции специфического (антигензависимого) иммунного ответа путем стимуляции пролиферации и дифференцировки иммунных клеток, участвующих в его реализации. Функционально IL-2 относится к группе провоспалительных цитокинов. IL-2 стимулирует пролиферацию и дифференцировку активированных Т-лимфоцитов в эффекторные Th-лимфоциты или цитотоксические Т-клетки, может стимулировать крупные гранулярные лимфоциты, макрофаги и В-клетки [9]. Согласно некоторым литературным данным на фоне ВИЧ-инфекции уровень эндогенного IL-2 постоянно снижается, вследствие чего нарушается регуляция иммунитета, пролиферация и дифференцировка наиболее важных иммунокомпетентных клеток [7].

В доступной отечественной и зарубежной литературе отсутствуют данные об изменениях уровней IL-2 при формировании устойчивости ВИЧ-1 к лекарственным препаратам. Таким образом, целью нашего исследования явилось выявление закономерностей изменения уровней IL-2 у ВИЧ-инфицированных пациентов на фоне сформированной лекарственной резистентности на поздних стадиях инфекции.

Материалы и методы

Под наблюдением находились пациенты (83 человек), проживающие на территории Приморского края и наблюдающиеся в Центре по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями ГБУЗ ККБ № 2 в 2013–2017 гг. Возраст пациентов составил $40,0 \pm 6,5$ лет. Распределение по полу было равноценным; так, количество мужчин составило 44 человека (53%), а женщин — 39 (47%).

В зависимости от эффективности ВААРТ, были сформированы 4 группы пациентов. Группу пациентов с вирусологическим успехом ВААРТ, у которых уровень вирусной нагрузки (ВН ВИЧ) был недетектируемым, составили 30 человек (I группа). Вторую группу составили 53 человека с вирусологическим неуспехом ВААРТ, которым было проведено исследование

лекарственной устойчивости. По результатам секвенирования генома ВИЧ-инфицированные пациенты II группы были разделены на 2 подгруппы — с выявленной лекарственной резистентностью (31 человек, 58,5%) и отсутствием детектируемых мутаций резистентности в геноме (22 человека, 41,5%). Контрольную группу составили 20 здоровых доноров крови.

Проводился клинико-лабораторный мониторинг эффективности ВААРТ с учетом приверженности к терапии. Уровни приверженности терапии оценивались анкетированием пациентов, которым было предложено ответить на вопросы о частоте и полноте приема лекарственных препаратов, наличии перерывов в приеме и соблюдении режимов питания. Стадии ВИЧ-инфекции устанавливались в соответствии с Российской классификацией ВИЧ-инфекции [5]. Лабораторные тесты контроля эффективности ВААРТ включали иммунологические (CD4⁺ Т-лимфоциты) и вирусологические (вирусная нагрузка ВИЧ) критерии оценки. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводили с помощью одноплатформенной технологии методом проточной цитофлюориметрии с использованием прибора BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson, США), оснащенного двумя диодными лазерами 488 и 635 нм. Для окрашивания лимфоцитов использовали меченые флюорохромами моноклональные антитела BD Tritest CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP (Becton Dickinson, США). Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента BD FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson, США). Определение вирусной нагрузки ВИЧ проводили с использованием системы автоматизированной пробоподготовки m2000sp и анализатора m2000rt методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, а также реагентов Abbott RealTime HIV-1 (Abbott, США).

Показанием к исследованию мутаций резистентности послужила вирусологическая неэффективность проводимого лечения. Материалом для проведения молекулярно-генетических исследований послужила плазма крови, взятая в период проведения терапии. Для выделения нуклеиновых кислот, проведения реакции обратной транскрипции, ПЦР, реакции циклического секвенирования была использована тест-система ViroSeq «HIV-1 Genotyping System» v 2.0 (Celera Diagnostics, Abbott, США), согласно инструкции производителя. Исследованию был подвергнут ген, кодирующий протеазу ВИЧ (1–99 кодоны) и две трети гена, кодирующего обратную транскриптазу (1–335 кодоны). Очистку продуктов секвенирования проводили с помощью комплекта реагентов BigDye X Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, США). Для проведения автоматического определения последовательностей методом капиллярного электрофореза

использован генетический анализатор AB 3500 (Applied Biosystems, США). Анализ полученных хроматограмм сиквенсов проводился с использованием компьютерной программы «Sequencing Analysis» v 5.4. Для выявления и анализа мутаций лекарственной резистентности ВИЧ использованы программы «ViroSeq» v 2.8 и «SeqScape» v 2.7. Полученные консенсусные последовательности сравнивались с референсными с помощью базы данных Стенфордского университета, находящейся в свободном доступе (<http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra?action=sequenceInput>).

В сыворотке крови обследованных больных и в группе контроля (доноры) уровни IL-2 определяли с использованием тест-системы «RayBiotech» (США) методом твердофазного сэндвич-ИФА, согласно прилагаемой инструкции. Учет результатов проводили с помощью планшетного спектрофотометра «Stat Fax 2100» (Awareness Technology, США). Расчет количественных параметров проводили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы. Концентрацию цитокинов выражали в пикограммах на миллилитр (пг/мл). Статистическую обработку данных осуществляли с помощью t-критерия Стьюдента, U-критерия Манна–Уитни, коэффициента корреляции Спирмена и программы SPSS 22.

Результаты

При анализе амбулаторных карт пациентов было выявлено, что давность установления диагноза ВИЧ-инфекции варьировала от 5 месяцев до 14 лет. Анализ эпидемиологического анамнеза позволил установить, что большинство пациентов были инфицированы ВИЧ половым путем — 52 человека (62,7%). Треть пациентов указывали на факт внутривенного употребления наркотиков в течение длительного времени — 31 пациент (37,4%). Все пациенты на момент проведения исследования имели 4 стадию ВИЧ-инфекции.

Длительность проведения ВААРТ значительно варьирует: от 4 месяцев до 8 лет. Наибольшее количество обследованных пациентов получали терапию в течение трех лет.

В группу обследования вошли пациенты с различным количеством ранее назначенных схем терапии. Так, за весь период наблюдения были назначены по 2 и 3 схемы двум группам пациентов — по 32% пациентов каждая соответственно. Только 7,6% обследованных пациентов было назначено максимальное количество схем

ВААРТ — пять схем — на протяжении лечения, при этом трое из четырех пациентов этой группы умерли в период наблюдения. Одну схему ВААРТ получали 20,8% пациентов.

Среди схем ВААРТ первого ряда соотношение назначенных схем, содержащих 2 НИОТ+ННИОТ и 2 НИОТ+ИП, было примерно одинаковым — 53 и 47% соответственно. Среди схем первой группы чаще всего назначалась следующая схема: ламивудин + зидовудин + эфавиренц (82%); среди схем второй группы преобладали ламивудин + зидовудин + лопинавир бустированный (67%). При последующих сменах схем ВААРТ предпочтение отдавалось схемам, содержащим бустированные ИП — лопинавир, дарунавир.

При оценке уровня приверженности к проводимой терапии было установлено, что у большей части больных из группы со сформировавшейся лекарственной резистентностью, а именно у 32 человек (60,4%), наблюдалась приверженность низкого уровня, у 18 пациентов (34,0%) — среднего. По результатам тестирования при проведении консультирования психологом только у 1 пациента уровень приверженности был оценен как 100%, а еще у 2 пациентов — как 98%. На факт самостоятельного прерывания назначенной терапии на различные промежутки времени указали 40 больных (66%).

В таблице 1 представлены данные о совокупной встречаемости резистентности ВИЧ-1 у обследованных больных к препаратам трех групп. Наиболее часто обнаруживалась резистентность одновременно к препаратам групп НИОТ и ННИОТ (26%). Резистентность к препаратам лишь одной группы встречалась реже: к НИОТ — 6%, к ННИОТ — 12%. Выявлен лишь один случай развития резистентности к препаратам группы ИП. Одновременно резистентность к препаратам трех групп выявлена в 3 случаях (6%).

Вторичные мутации резистентности к ИП выявлены у трети больных, при этом только у трех пациентов отмечены основные мутации резистентности, приводящие к формированию лекарственной устойчивости (G48V, M46I, V82F). Среди наиболее часто встречающихся вторичных мутаций к ИП можно выделить A71V, L10I, L33I, L10V. У большей части обследованных пациентов чувствительность к препаратам этого класса сохранена.

Выявляется высокая степень резистентности к препаратам группы НИОТ — ламивудину и эмтрицитабину, в меньшей степени — к абакавиру

Таблица 1. Структура резистентности к препаратам ИП, НИОТ и ННИОТ

Table 1. Structure of drug resistance to HIV protease inhibitors (PIs), nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs)

ИП PIs	ИП+НИОТ PIs+NRTIs	ИП+НИОТ+ННИОТ PIs+NRTIs+NNRTIs	НИОТ NRTIs	ННИОТ NNRTIs	НИОТ+ННИОТ NRTIs+NNRTIs	Отсутствие резистентности Lack of drug resistance mutations
1 (1,9%)	3 (5,7%)	4 (7,5%)	3 (5,7%)	7 (13,2%)	13 (24,5%)	22 (41,5%)

Таблица 2. Сравнительная оценка уровней ВН ВИЧ (копий/мл) и CD4⁺ Т-лимфоцитов (кл/мкл) у пациентов I и II группTable 2. Comparative assessment of HIV viral load levels (copy/ml) and CD4⁺ T-cells (cells/mkl) in patients of groups I and II

Группы пациентов Patients groups	ВН ВИЧ, M±S HIV viral load levels	CD4 ⁺ Т-лимфоциты, M±S CD4 ⁺ T-cells	P
I группа (n = 30)/I group (n = 30)	0	419,4±94,6	p1I-p1II*** p2I-p2II**
II группа (n = 53)/II group (n = 53)	9230,6±3976,8	355,8±97,0	

Примечания. p1 — ВН ВИЧ; p2 — CD4⁺ Т-лимфоциты. Степень достоверности различий показателей между группами: **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.
Notes. p1 — HIV viral load levels; p2 — CD4⁺ T-cells. The degree of reliability of differences of indicators between groups: **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001.

и диданозину. Среди мутаций, обуславливающих резистентность к этому классу препаратов, наиболее часто встречается мутация M184V (39%). Также часто регистрировались мутации L74V (16,3%), D67N, K70R и Y115F (по 14,9% каждая). Среди препаратов группы ННИОТ резистентность высокой степени формируется чаще всего к эфавиренцу и невирапину (более трети всех обследованных пациентов). Наиболее часто резистентность обуславливали мутации K103N (13%), а также V106M, E138A и Y181C (по 6,6% каждая).

У ВИЧ-инфицированных пациентов были оценены уровни ВН ВИЧ и CD4⁺ Т-лимфоцитов (табл. 2). Были изучены уровни IL-2 в группах пациентов в зависимости от характера ответа на ВААРТ и выявления лекарственной резистентности (табл. 3). Для изучения степени сопряженности между изучаемыми признаками был проведен расчет значений коэффициента корреляции Спирмена (табл. 4).

Обсуждение

Естественное течение ВИЧ-инфекции характеризуется стадийностью, широким диапазоном уровней CD4⁺ Т-лимфоцитов и ВН ВИЧ даже у пациентов одной стадии, а также изменением данных показателей со временем, что выявляется при динамическом наблюдении за пациентами. Коррективы вносит и назначение ВААРТ, поэтому у пациентов с вирусологически и иммунологически успешной терапией уровни CD4⁺ Т-лимфоцитов и ВН ВИЧ значительно отличаются от таковых у пациентов-неответчиков. Этим обусловлено разделение пациентов, принявших участие в нашем исследовании, на группы с учетом указанных показателей. Так, отмечена статистически достоверная разница уровней ВН ВИЧ между двумя группами пациентов (0 копий/мл, то есть недетектируемый уровень, у па-

циентов I группы против 9230,6±3976,8 копий/мл у пациентов II группы, p ≤ 0,001). Уровни CD4⁺ Т-лимфоцитов у пациентов обеих групп также достоверно различались (419,4±94,6 кл/мкл у пациентов I группы против 355,8±97,0 кл/мкл у пациентов II группы, p ≤ 0,01).

Процессы, ведущие к развитию иммунодефицита при ВИЧ-инфекции, являются чрезвычайно сложными и до конца не ясными. Тот факт, что цитокины играют важную роль в регуляции внутриклеточных функций, подчеркивает возможность их участия в модулировании или усилении патогенеза ВИЧ. Цитокины могут влиять на соотношение клеточно-опосредованных и гуморальных иммунных реакций, влияющих на репликацию ВИЧ, выживаемость клеток и появление клинических симптомов у инфицированного человека [19].

При активации иммунных клеток во время антигенной стимуляции происходит усиление продукции цитокинов. Конечным результатом действия многих цитокинов является та или иная степень репликации вируса ВИЧ, которая зависит от баланса между стимулирующим и подавляющим действием цитокинов [10]. При запуске иммунного ответа под воздействием антигенов Т-лимфоциты переходят в активированное состояние, что сопровождается синтезом IL-2. При острой ВИЧ-инфекции многими исследователями было отмечено преходящее повышение уровней различных цитокинов, в том числе и IL-2 [11, 18, 20]. При прогрессировании заболевания снижается не только абсолютное количество Т-лимфоцитов — продуцентов IL-2, но и уровень лимфоцитов, экспрессирующих IL-2 рецептор, что, в свою очередь, приводит к отсутствию реактивности к IL-2 [13]. Известно, что утрата Т-лимфоцитами способности продуцировать IL-2 не связана с влиянием вирусных белков напрямую на синтез изучаемого цитокина; сни-

Таблица 3. Уровни IL-2 в сыворотке крови больных с ВИЧ-инфекцией (пг/мл)

Table 3. IL-2 plasma levels in HIV-infected patients (pg/ml)

Контрольная группа The control group (n = 20) M±SD	I группа I group (n = 30) M±SD	II группа II group (n = 53) M±SD	Пациенты с ЛУ Drug resistance patients (n = 31) M±SD	Пациенты без ЛУ Non-drug resistance patients (n = 22) M±SD
2,0±0,20	4,89±0,55***	1,83±0,29*	1,75±0,26***	1,95±0,29ns

Примечание. Степень достоверности различий показателей по сравнению с контрольной группой: ns p > 0,05; ***p ≤ 0,001; * p ≤ 0,05.
Note. The degree of reliability of differences of indicators in comparison with the control group: ns p > 0.05; ***p ≤ 0.001; * p ≤ 0.05.

Таблица 4. Значения коэффициента корреляции Спирмена и статистическая значимость коррелятивных связей между уровнями IL-2, CD4⁺ Т-лимфоцитов и ВН ВИЧTable 3. The values of the Spearman correlation coefficient and statistical significance of the correlative relationships between the IL-2 plasma levels, CD4⁺ T-cells and HIV viral load levels

Группы пациентов Patients groups	CD4 ⁺ Т-лимфоциты CD4 ⁺ T-cells	ВН ВИЧ HIV viral load levels
I группа/I group	$r_s = 0,927$; $p = 0,01$	
II группа/II group	$r_s = 0,741$; $p = 0,01$	$r_s = 0,698$; $p = 0,01$
II группа, ЛУ+/II group, patients with drug resistance	$r_s = 0,621$; $p = 0,01$	$r_s = 0,538$; $p = 0,01$
II группа, ЛУ-/II group, patients without drug resistance	$r_s = 0,946$; $p = 0,01$	$r_s = 0,812$; $p = 0,01$

жение концентрации IL-2 опосредовано интеграцией вирусного генома в непосредственной близости от регуляторных последовательностей гена IL-2, что приводит к подавлению его синтеза [3].

В нашем исследовании было показано, что в сыворотке крови пациентов с ВИЧ-инфекцией, достигших вирусологического и иммунологического успеха ВААРТ (I группа), по сравнению с контрольной группой, отмечалось увеличение уровня IL-2 ($4,89 \pm 0,55$ пг/мл против $2,0 \pm 0,20$ пг/мл, $p < 0,001$, U-критерий) (табл. 3). Уровень IL-2 в группе пациентов с ВИЧ-инфекцией с сохраняющейся вирусной нагрузкой на фоне ВААРТ (II группа) статистически значимо снижен по сравнению с контрольной группой ($1,83 \pm 0,29$ пг/мл против $2,0 \pm 0,20$ пг/мл, $p < 0,05$, U-критерий).

При сравнении уровней IL-2 между группами пациентов с сохраняющейся вирусной нагрузкой на фоне ВААРТ (ВН+) с лекарственной устойчивостью и без нее были получены достоверные различия ($1,75 \pm 0,26$ пг/мл против $1,95 \pm 0,29$ пг/мл соответственно, $p \leq 0,05$, U-критерий). Однако по отношению ко II группе в целом значимых различий отмечено не было — как в группе пациентов с выявленной лекарственной устойчивостью ($1,75 \pm 0,26$ пг/мл против $1,83 \pm 0,29$ пг/мл, $p > 0,05$, U-критерий), так и в группе пациентов без ЛУ ($1,95 \pm 0,29$ пг/мл против $1,83 \pm 0,29$ пг/мл, $p > 0,05$, U-критерий).

При изучении содержания IL-2 в сыворотке крови с учетом выявленной лекарственной резистентности было показано, что его содержание статистически значимо ниже во II группе пациентов (не достигших успеха на фоне ВААРТ) в целом, чем в I группе ($1,83 \pm 0,29$ пг/мл против $4,89 \pm 0,55$ пг/мл соответственно, $p < 0,001$, U-критерий) (табл. 3). Наибольшее снижение уровней IL-2 выявлено у пациентов со сформированной лекарственной устойчивостью ($1,75 \pm 0,26$ пг/мл против $4,89 \pm 0,55$ пг/мл в I группе, $p < 0,001$, U-критерий).

Полученные коэффициенты корреляции Спирмена указывают на высокую тесноту связи уровней IL-2 и CD4⁺ Т-лимфоцитов у пациентов I группы, достигших ожидаемого ответа на ВААРТ ($r_s = 0,927$; $p = 0,01$), и у пациентов II группы без подтвержденной лекарственной устойчивости ВИЧ ($r_s = 0,946$; $p = 0,01$). При оценке тесноты связи между IL-2 и ВН ВИЧ высокий

коэффициент корреляции был получен только для пациентов II группы без ЛУ ($r_s = 0,812$; $p = 0,01$) (табл. 4).

Достижение эффективного ответа на ВААРТ характеризуется снижением репликативной активности вируса до минимального уровня и, как следствие, недетектируемой вирусной нагрузкой. В этих условиях формирование лекарственной резистентности ВИЧ не наблюдается. Антитретровирусная терапия способствует уменьшению пула быстро пролиферирующих клеток и восстановлению компартмента циркулирующих Т-лимфоцитов, в том числе за счет перераспределения циркулирующих клеток [17]. На фоне подавления репликации происходит восстановление популяции CD4⁺ Т-лимфоцитов — их уровень у пациентов I группы составил $419,4 \pm 94,6$ кл/мкл. Уровень IL-2 у пациентов данной группы составил $4,89 \pm 0,55$ пг/мл, что превышает значения контрольной группы практически в 2 раза.

В исследовании [21] было показано, что у пациентов с авиремией, получавших терапию в течение 6 лет и более, обнаруживались две популяции CD4⁺ Т-клеток памяти, производящих IL-2: центральные клетки памяти CD45RA⁻CCR7⁺, производящие исключительно IL-2, и эффекторные клетки памяти CD45RA⁻CCR7⁻, которые продуцировали IL-2 и интерферон-гамма (IFN γ). У пациентов с виремией на фоне ВААРТ авторы обнаружили значительные доли эффекторных клеток памяти, которые производили исключительно IFN γ . В исследовании было продемонстрировано, что только клетки, обладающие способностью продуцировать IL-2, сохраняются как долговременные клетки памяти. Авторы установили, что при постоянной циркуляции вирусных антигенов быстро индуцируется дифференциация в клетки, производящие только IFN γ , которые не обладают способностью к самообновлению. Вероятно, выявленное нами увеличение уровней IL-2 является следствием формирования описанного клеточного репертуара. Дополнительным аргументом может быть выявление низких уровней IL-2 у пациентов, не достигших вирусологического успеха на фоне ВААРТ (ВН ВИЧ $9230,6 \pm 3976,8$ кл/мкл) — $1,83 \pm 0,29$ пг/мл.

Известно, что дефицит IL-2 нарастает с прогрессией ВИЧ-инфекции и совпадает со сни-

жением количества CD4⁺ Т-лимфоцитов [12]. При этом нарушается их хелперная активность. Переключение CD4⁺ Т-лимфоцитов первого типа на второй тип сопровождается утратой клетками способности к синтезу не только IL-2, но и интерферона-альфа (IFN α), факторов, поддерживающих дифференцировку и активность другой разновидности иммунокомпетентных клеток — цитотоксических лимфоцитов [15].

У пациентов с выявленной лекарственной устойчивостью отмечались наиболее низкие уровни IL-2 среди пациентов с неэффективностью ВААРТ — 1,75±0,26 пг/мл. Известно, что в вирусном геноме мутации возникают под селективным давлением специфических CD8⁺ Т-лимфоцитов [3]. Селекция различных генетических вариантов протекает при естественном течении ВИЧ-инфекции под влиянием, с одной стороны, организма хозяина (давление со стороны иммунной системы) и, с другой, жизнеспособности самого вируса, то есть его фитнеса [2]. Таким образом, формирование мутаций полиморфизма является взаимообусловленным процессом, отражающим особенности биологии ВИЧ. Неадекватный прием АРВП создает дополнительную возможность для репликации устойчивых к определенным препаратам вирусных вариантов в присутствии фармакологического вещества. В результате этого происходит селективный отбор преобладающих резистентных вариантов — индивидуальных у каждого пациента.

На поздних стадиях ВИЧ-инфекции наблюдается снижение активности цитотоксических лимфоцитов (CTL), одной из причин которого является утрата IL-2 как фактора дифференцировки лимфоцитов. Вероятно, что сдерживающее влияние CTL на репликацию ВИЧ ослабе-

вает, и это может способствовать накоплению мутаций полиморфизма и послужить дополнительным неблагоприятным фактором в формировании лекарственной резистентности ВИЧ.

Проведенное исследование показало, что в группе лиц, достигших вирусологического и иммунологического успеха ВААРТ, отмечается увеличение показателей IL-2, что может быть связано с восстановлением числа продуцирующих данный цитокин иммунных клеток (Т-лимфоцитов). Снижение уровней IL-2 у пациентов с сохраняющейся вирусной нагрузкой сопровождается прогрессированием заболевания. Максимальное падение уровней IL-2 среди обследованных больных у пациентов со сформированной лекарственной устойчивостью, вероятно, может свидетельствовать о длительно поддерживаемой благодаря мутациям лекарственной устойчивости репликации ВИЧ, что приводит к прогрессивному постепенному падению уровней Т-лимфоцитов (основных продуцентов IL-2).

Конечно, при ВИЧ-инфекции в процесс иммунопатогенеза вовлекаются все протективные механизмы, а со стороны вируса действуют многочисленные эволюционно выработанные факторы защиты. Иммунодепрессивное действие ВИЧ проявляется на различных уровнях организации макроорганизма с вовлечением в процесс сложных патогенетических механизмов. Ни один фактор иммунной системы, будь то клеточное звено, гуморальный ответ, спектр цитокинов либо дендритные клетки, не в состоянии самостоятельно противостоять разрушающему действию ВИЧ. Изучение непростых механизмов взаимодействия иммунной системы и ВИЧ является необходимым условием в создании новых способов лечения ВИЧ-инфекции.

Список литературы/References

1. Агошков А.А., Пшеничная Н.Ю., Айдамирова Х.А., Шевченко Т.А. Клинико-лабораторные и эпидемиологические аспекты ВИЧ-инфекции в «продвинутых» стадиях в Чеченской Республике // Цитокины и воспаление. 2014. Т. 13, № 3. С. 70–71. [Agoshkov A.A., Pshenichnaya N.Y., Aidamirova H.A., Shevchenko T.A. Clinical, laboratory and epidemiological aspects of HIV-infection in the late stages in the Chechen Republic. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2014, vol. 13, no. 3, pp. 70–71. (In Russ.)]
2. Бобкова М.Р. Лекарственная устойчивость ВИЧ. М.: Человек, 2014. 288 с. [Bobkova M.R. *Lekarstvennaya ustoichivost' VICH [HIV drug resistance]*. Moscow: Chelovek, 2014. 288 p.]
3. Вирус иммунодефицита человека — медицина. Под ред. Белякова Н.А., Рахмановой А.Г. СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2010. 752 с. [Virus immunodefitsita cheloveka — meditsina. Pod red. Belyakova N.A., Rakhmanovoi A.G. [Human immunodeficiency virus — medicine. Eds. Belyakov N.A., Rakhmanova A.G.]. *St. Petersburg: Baltiiskii Meditsinskii Obrazovatel'nyi Tsentri*, 2010. 752 p.]
4. Гашникова Н.М., Богачев В.В., Барышев П.Б., Мещерякова Ю.В., Савочкина Е.Н., Черноусова Н.Я. Распространенность мутаций, ответственных за резистентность к антиретровирусным препаратам, среди вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в Новосибирской области // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2012. № 6. С. 56–60. [Gashnikova N.M., Bogachev V.V., Baryshev P.B., Mescheryakova Yu.V., Savochkina E.N., Chernousova N.Ya. Prevalence of mutations responsible for resistance to antiretroviral preparations among HIV-1 variants circulating in Novosibirsk region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2012, no. 6, pp. 56–60. (In Russ.)]
5. Покровский В.В., Юрин О.Г., Кравченко А.В., Беляева В.В., Канестри В.Г., Афонина Л.Ю., Ермак Т.Н., Буравцова Е.В., Шахгильдян В.И., Козырина Н.В., Нарсия Р.С., Зимина В.Н., Покровская А.В., Ефремова О.С. Протоколы диспансерного наблюдения и лечения больных ВИЧ-инфекцией // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2014. № 6. С. 1–43. [Pokrovskiy V.V., Yurin O.G., Kravchenko A.V., Belyaeva V.V., Kanestri V.G., Afonina L.Yu., Ermak T.N., Buravcova E.V., Shakhgildyan V.I., Kozirina N.V., Narsia R.S., Zimina V.N., Pokrovskaya A.V., Efremova O.S. Protocols dispensary observation and treatment of patients with HIV-infection. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2014, no. 6, pp. 1–43. (In Russ.)]

6. Селимова Л.М., Серебровская Л.В., Иванова Л.А., Носик Д.Н. Показатели CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов пациентов, инфицированных вариантами вируса иммунодефицита человека 1-го типа подтипа А, несущими мутации V77I в протеазе и A62V в обратной транскриптазе // Вопросы вирусологии. 2010. № 2. С. 22–26. [Selimova L.M., Serebrovskaya L.V., Ivanova L.A., Nosik D.N. CD4+ and CD8+ T-lymphocyte counts in human immunodeficiency virus type 1 subtype A-infected patients carrying mutations V77I in protease and/or A62V in reverse transcriptase. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2010, no. 2, pp. 22–26. (In Russ.)]
7. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека // Медицинский академический журнал. 2013. Т. 13, № 3. С. 18–41. [Simbircev A.S. Cytokines in the pathogenesis of infectious and noninfectious human diseases. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academical Journal*, 2013, vol. 13, no. 3, pp. 18–41. (In Russ.)]
8. Хоффман К., Рокштро Ю.К. Лечение ВИЧ-инфекции. М.: Р. Валент, 2012. 736 с. [Hoffman K., Rockstroh Yu.K. Lechenie VICH-infekcii [Treatment of HIV infection]. Moscow: R. Valent, 2012, 736 p.]
9. Шипилов М.В. Интерлейкин-2 и острые респираторные вирусные инфекции // Известия Смоленского государственного университета. 2011. № 3. С. 294–299. [Shipilov M.V. Interleukin-2 and acute respiratory viral infections. *Izvestija Smolenskogo gosudarstvennogo universiteta = Smolensk State University News*, 2011, no. 3, pp. 294–299. (In Russ.)]
10. Armah K.A., McGinnis K., Baker J., Gibert C., Butt A.A., Bryant K.J., Goetz M., Tracy R., Oursler K.K., Rimland D., Crothers K., Rodriguez-Barradas M., Crystal S., Gordon A., Kraemer K., Brown S., Gerschenson M., Leaf D.A., Deeks S.G., Rinaldo C., Kuller L.H., Justice A., Freiberg M. HIV status, burden of comorbid disease, and biomarkers of inflammation, altered coagulation, and monocyte activation. *Clin. Infect. Dis.*, 2012, vol. 55, no. 1, pp. 126–136. doi: 10.1093/cid/cis406
11. Bebell L.M., Passmore J.A., Williamson C., Mlisana K., Iriogbe I., van Loggerenberg F., Karim Q.A., Karim S.A. Relationship between levels of inflammatory cytokines in the genital tract and CD4+ cell counts in women with acute HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.*, 2008, vol. 198, iss. 5, pp. 710–714. doi: 10.1086/590503
12. Cellerai C., Harari A., Stauss H., Yerly S., Geretti A.M., Carroll A., Yee T., Ainsworth J., Williams I., Sweeney J., Freedman A., Johnson M., Pantaleo G., Kinloch-de Loes S. Early and prolonged antiretroviral therapy is associated with an HIV-1-specific T-cell profile comparable to that of long-term non-progressors. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6, iss. 4: e18164. doi: 10.1371/journal.pone.0018164
13. David D., Keller H., Naït-Ighil L., Treilhou M.P., Joussemet M., Dupont B., Gachot B., Maral J., Thèze J. Involvement of Bcl-2 and IL-2R in HIV-positive patients whose CD4 cell counts fail to increase rapidly with highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, 2002, vol. 16, no. 8, pp. 1093–1101.
14. Gaffen S.L., Liu K.D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*, 2004, vol. 28, no. 3, pp. 109–123. doi: 10.1016/j.cyto.2004.06.010
15. Gamberg J., Barrett L., Bowmer M.I., Howley C., Grant M. Factors related to loss of HIV-specific cytotoxic T lymphocyte activity. *AIDS*, 2004, vol. 18, no. 4, pp. 597–604.
16. Haas A., Zimmermann K., Oxenius A. Antigen-dependent and -independent mechanisms of T and B cell hyperactivation during chronic HIV-1 infection. *J. Virol.*, 2011, vol. 85, no. 23, pp. 12102–12103. doi: 10.1128/JVI.05607-11
17. Mohri H., Perelson A.S., Tung K., Ribeiro R.M., Ramratnam B., Markowitz M., Kost R., Weinberger L., Cesar D., Hellerstein M.K., Ho D.D. Increased turnover of T lymphocytes in HIV-1 infection and its reduction by antiretroviral therapy. *J. Exp. Med.*, 2001, vol. 194, no. 9, pp. 1277–1287. doi: 10.1084/jem.194.9.1277
18. Norris P.J., Pappalardo B.L., Custer B., Spotts G., Hecht F.M., Busch M.P. Elevations in IL-10, TNF- α and IFN- γ from the earliest point of HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retrov.*, 2006, vol. 22, no. 8, pp. 757–762. doi: 10.1089/aid.2006.22.757
19. Ostrowski S.R., Gerstoft J., Pedersen B.K., Ullum H. Impaired production of cytokines is an independent predictor of mortality in HIV-1-infected patients. *AIDS*, 2003, vol. 17, no. 4, pp. 521–530. doi: 10.1097/01.aids.0000050813.06065.ed
20. Stacey A.R., Norris P.J., Qin L., Haygreen E.A., Taylor E., Heitman J., Lebedeva M., DeCamp A., Li D., Grove D., Self S.G., Borrow P. Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viraemia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J. Virol.*, 2009, vol. 83, no. 8, pp. 3719–3733. doi: 10.1128/JVI.01844-08
21. Younes S.A., Yassine-Diab B., Dumont A.R., Boulassel M.R., Grossman Z., Routy J.P., Sekaly R.P. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J. Exp. Med.*, 2003, vol. 198, no. 12, pp. 1909–1922. doi: 10.1084/jem.20031598

Авторы:

Елисеева В.С., врач клинической лабораторной диагностики клинико-иммунологической лаборатории, ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2», Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, г. Владивосток, Россия;

Кругляк С.П., к.м.н., зав. клинико-иммунологической лабораторией, ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2», Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, г. Владивосток, Россия;

Скляр Л.Ф., д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО ТГМУ МЗ РФ, г. Владивосток, Россия; зам. главного врача ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2», Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, г. Владивосток, Россия;

Маркелова Е.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО ТГМУ МЗ РФ, г. Владивосток, Россия;

Боровская Н.А., к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО ТГМУ МЗ РФ, г. Владивосток, Россия.

Authors:

Eliseeva V.S., Doctor of Laboratory Diagnostics, Clinical and Immunological Laboratory, Regional Clinical Hospital No. 2, Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Vladivostok, Russian Federation;

Kruglak S.P., PhD (Medicine), Head of the Clinical and Immunological Laboratory, Regional Clinical Hospital No. 2, Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Vladivostok, Russian Federation;

Sklar L.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Infectious Diseases, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation; Deputy Chief Doctor of the Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Vladivostok, Russian Federation;

Markelova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;

Borovskaya N.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

Поступила в редакцию 16.08.2017
Отправлена на доработку 02.03.2018
Принята к печати 27.04.2018

Received 16.08.2017
Revision received 02.03.2018
Accepted 27.04.2018